

文章编号: 0258-7025(2009)10-2477-08

相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术

尹君^{1,2} 林子扬² 屈军乐² 于凌尧² 刘星² 万辉² 牛憨笨²

¹ 华中科技大学光电科学与工程学院, 湖北 武汉 430074

² 深圳大学光电子学研究所, 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060

摘要 回顾了相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)显微成像技术的理论和技术的发展, 介绍和比较了 CARS 显微成像技术对抽运光源的要求, 以及典型的 CARS 显微成像系统。对 CARS 显微成像技术中无法避免的最重要的非共振背景噪声问题做了详细的分析, 对不同的抑制非共振背景噪声的方法进行了比较和讨论, 对 CARS 显微成像技术目前存在的问题和可能解决途径进行了简要的分析。

关键词 激光光学; 显微成像方法; 相干反斯托克斯拉曼散射; 非共振背景噪声; 超连续谱; 光子晶体光纤

中图分类号 O437.3; Q631 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093610.2477

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopic Imaging Technique

Yin Jun^{1,2} Lin Ziyang² Qu Junle² Yu Linyao² Liu Xing² Wan Hui² Niu Hanben²

¹ College of Optoelectronic Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

² Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract In this paper, theoretical and technical development of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy is reviewed. The requirements of CARS microscopy on the pump laser source and typical experimental instrumentation are discussed and compared. We investigate the non-resonance background noise which is the most critical problem and can not be avoided in the CARS microscopy. Different methods for suppressing non-resonant background noise are presented and compared. Finally, a brief analysis of existing problems in CARS microscopy and possible solutions is presented.

Key words laser optics; microscopic imaging method; coherent anti-Stokes Raman scattering; non-resonance background noise; supercontinuum; photonic crystal fiber

1 引言

光学方法在生命科学研究中占有重要的地位, 20 世纪 60 年代激光器的发明为光学方法提供了理想的高强度光源, 大大拓展了光学这一古老学科在生命科学等众多研究领域中的应用。随着超短脉冲激光、荧光探针标记、微弱信号探测和显微成像技术

的不断发展, 光学显微成像技术已经成为推动生命科学研究发展的重要动力。具有高时间和空间分辨率、高探测灵敏度和化学选择性, 又能够实时获取待测样品三维层析图像的显微成像技术成为发展的重点, 特别是通过共焦探测方式实现三维层析能力的荧光共焦显微镜^[1]和多光子激发荧光显微镜^[2,3]已

收稿日期: 2009-07-08; 收到修改稿日期: 2009-08-10

基金项目: 国家自然科学基金(60627003)、广东省高等学校科技创新团队项目(06CXTD009)和教育部高等学校博士学科点专项基金(2007059000)资助课题。

作者简介: 尹君(1975—), 男, 博士研究生, 主要从事 CARS 光谱和显微成像技术等方面的研究。

E-mail: yinjun666@163.com

导师简介: 牛憨笨(1940—), 男, 研究员, 主要从事光学工程、生物医学光子学、超快诊断、光电子材料与器件等方面的研究。E-mail: hbniu@szu.edu.cn(通信联系人)

经成为生物学、医学和生命科学强有力的研究工具^[4~9]。利用荧光探针虽然能够提供荧光显微成像技术所需的化学选择性^[10,11],但是外加的荧光标记对生物细胞自身性质的影响,以及荧光团自身的光致漂白损伤^[12]是无法回避的问题。近年来,基于物质分子固有的分子振动光谱信号的非侵入显微成像技术引起人们的广泛关注,其中红外成像^[13]及自发拉曼成像^[14]是最早提出的两种显微成像技术。但是这两种技术存在空间分辨率低、探测灵敏度差、所需激发光功率高和数据采集时间长等问题,限制了其在活体组织和活细胞研究中的应用。

通过表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)技术可以显著改善自发拉曼散射成像技术的信噪比,提供单分子探测灵敏度^[15],但是在待测样品中额外加入的胶质金属粒子也会对生物分子的性质产生影响。相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)是一种三阶非线性光学过程,通过共振激发大大提高了单分子探测的灵敏度。1965年, P. D. Maker等^[16]首次发现了这一过程,并进行了系统的研究。1974年, R. F. Begley等^[17]首次提出了CARS光谱研究技术的设想, CARS光谱仪诞生,并作为进行化学分析的光谱学分析工具得到了广泛的应用。1982年,美国海军实验室的 M. D. Duncan等^[18]通过将两台染料激光器输出的连续激光聚焦在待测样品中激发产生CARS光谱信号,首次成功地实现了CARS显微成像技术。CARS显微成像技术将CARS与传统的光学显微成像技术结合在一起,利用待测样品中特定分子所固有的分子振动光谱信号作为显微成像的对比度,能够在无需引入外源标记的条件下选择性地快速获取样品中特定分子的空间分布图像以及分子之间相互作用的功能信息。

近年来,为了优化CARS显微成像系统,提高探测灵敏度,改善时间和空间分辨率,世界各国的科研工作者进行了大量卓有成效的研究和改进工作,探索使用这一方法快速获取活体组织和细胞的结构和功能图像。本文通过对CARS过程原理的介绍,分析了实现CARS显微成像技术的要求,对具有不同特点的CARS显微成像技术进行了比较。对CARS显微成像技术中至关重要的问题,非共振背景噪声抑制的解决方案进行了详细的讨论。通过对近年来利用CARS显微镜在生物学研究中所取得的研究成果的总结,说明这一技术在生物学、医学和

生命科学等众多研究领域具有广泛的应用前景;分析了CARS显微成像技术目前存在的问题,并提出了解决这些问题的可能途径。

2 理论基础

CARS过程是一个四波混频的非线性光学过程,在这一过程中包含特定的拉曼活性分子的振动模式与导致分子系统中基态至激发态振动跃迁的入射光场相互作用的过程。CARS过程原理的能级示意图如图1所示,图1(a)表示拉曼共振和非共振单光子增强对CARS过程的贡献,图1(b)表示拉曼共振和非共振双光子增强对CARS过程的贡献。图中, v 表示具有 Ω_r 振动频率的拉曼模式的振动状态, g 和 e 分别表示基态和激发态。中心频率分别为 ω_p, ω_p' 和 ω_s 的抽运(E_p)、探测(E_p')和斯托克斯(E_s) 3束激光光束入射到待测样品中,与样品中特定的具有拉曼活性的分子相互作用,入射光场与样品相互作用在焦点处激发产生的三阶非线性极化强度 $P^{(3)}$ 可以表示为^[19]

$$P^{(3)} = P^{(3)NR} + \sum_r P^{(3)R} = (\chi^{(3)NR} + \sum_r \chi^{(3)R}) E_p E_p' E_s^*, \quad (1)$$

式中 $\chi^{(3)}$ 表示三阶非线性极化系数共振部分, $\chi^{(3)R}$ 表示样品中的分子的拉曼响应,是复数量($\chi^{(3)R} = \chi^{(3)R'} + \chi^{(3)R''}$)。当 E_p 和 E_s 之间的频差与具有拉曼活性的分子的振动频率匹配时($\Omega_r = \omega_p - \omega_s$),激发产生的 $P^{(3)R}$ 得到共振增强,如图1(a)所示, CARS信号的强度正比于 $P^{(3)R}$ 。非共振部分 $\chi^{(3)NR}$ 表示单光子[见图1(a)]和双光子[见图1(b)]电子跃迁的电子响应,本质上与入射激光的频率无关,是实数量。由(1)式可以看出,当激发光与样品相互作用时,总的信号由样品的 $\chi^{(3)}$ 产生,是共振和非共振两部分叠加的结果。由于CARS过程是一个参量过程,因此需要满足相位匹配条件: $|\Delta k| \cdot l \ll \pi$, 其中 $\Delta k = k_{AS} - (k_p + k_p' - k_s)$ 是波矢失配量, l 是相互作用长

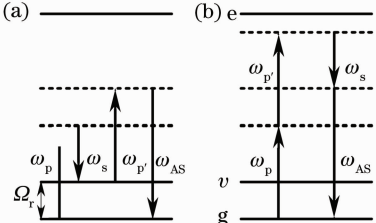


图1 CARS过程原理的能级示意图

Fig. 1 Energy level schematic of CARS process

度。通常为简化实验系统,CARS可以使用频率一致的激光光束作为 E_P 和 E_S ,即 $\omega_P = \omega_S$ 。

通过以上对 CARS 过程原理的介绍,说明了基于 CARS 过程的显微成像技术具有很多独特的优点。CARS 显微成像技术利用待测样品分子所固有的分子振动光谱信号作为显微成像的对比度,能够在无需引入外源标记的条件下快速获取分子的空间分布图像以及分子之间相互作用的功能信息。CARS 信号强度高,具有强的方向性,另一方面,CARS 信号的波长相对于激发光蓝移,因此 CARS 显微成像技术能够在高荧光背景条件下工作,并具有较高的探测灵敏度。使用大数值孔径的物镜(通常为 $d_{NA}=1.4$) 在紧聚焦条件下将共线传输激光光束聚焦在待测样品中,入射光束相互作用长度小(通常为几个微米),波矢具有较大的锥角,能够满足实现 CARS 过程的相位匹配条件。通常 CARS 显微成像技术使用高峰值功率、高重复频率的近红外波长的脉冲激光作为激发光,生物样品的吸收和散射小,减小了光致损伤,同时能够穿透较厚的生物样品获取其内部结构的三维层析图像。作为一种多光子激发过程,在紧聚焦条件下,激发光仅在光强度最高的、很小的聚焦体积中产生 CARS 信号,因此能够获得高空间分辨率图像。但是,由 CARS 过程的原理可以知道,CARS 显微成像技术无法避免非共振背景噪声的影响。由于非共振背景噪声的存在,大大降低了系统的探测灵敏度和光谱选择性,所以抑制非共振背景噪声成为 CARS 显微成像技术走向实用化之前必须解决的问题。

3 非共振背景噪声的抑制

由 CARS 过程的原理可以知道,总的 CARS 信号由样品中特定分子的三阶非线性极化率($\chi^{(3)}$)产生,它同时包含共振($\chi^{(3)R}$)和非共振($\chi^{(3)NR}$)部分,因此,激发产生的信号也是共振部分($P^{(3)R}$)和非共振部分($P^{(3)NR}$)叠加的结果。在生物样品中,样品所处的液体环境产生的非共振背景噪声常常淹没样品产生的较弱的 CARS 信号,因此,抑制来自待测样品自身的和其所处溶液环境的非共振背景噪声是提高 CARS 显微成像技术光谱选择性、探测灵敏度、时间和空间分辨率的关键。为实现这一目标,结合不同的 CARS 显微成像方法,提出了众多抑制非共振背景噪声的方案,如偏振探测^[20,21]、时间分辨探测^[22,23]、相位控制和整形^[24]及外差干涉方法^[25]等。

偏振探测方式 CARS (polarization-sensitivity

detection CARS, P-CARS) 利用共振信号和非共振背景噪声不同的偏振特性分离非共振背景噪声,达到有效抑制非共振背景噪声的目的。根据 Kleinman 对称,非共振 CARS 场的退偏振比 $\rho^{NR} = \chi_{1221}^{(3)NR} / \chi_{1111}^{(3)NR} = 1/3$ ^[26]。共振 CARS 场的退偏振比 $\rho^R = \chi_{1221}^{(3)R} / \chi_{1111}^{(3)R}$ 等于对应带宽的自发拉曼退偏振比,该值的范围是 $0 \sim 0.75$ 。通过使用偏振态之间夹角为 ϕ 的线偏振光分别作为 E_P 和 E_S ,激发产生的 $P^{(3)R}$ 和 $P^{(3)NR}$ 的偏振方向分别为 $\alpha = \arctan(\rho^{NR} \tan \phi)$ 和 $\beta = \arctan(\rho^R \tan \phi)$ 。典型的偏振探测 CARS 显微镜的结构示意图如图 2 所示,图中,P 为偏振片;HW 为半波片;OL 为物镜;S 为样品;F 为滤光片;D 为双色镜。图 2 中的插图表示的是激发光束和激发产生的非线性偏振的波矢量,通过 E_P (或 E_S) 光路中的半波片调节各光束的偏振态使 E_P 和 E_S 之间的偏振夹角 ϕ 等于 71.6° 时,能够得到最高的信噪比^[20]。调节在探测器前安装的偏振片消除偏振方向与共振信号不同的非共振背景噪声。将偏振探测方式与不同的探测方式(前向和后向探测)相结合,已经实现了具有高灵敏度的偏振探测 CARS 显微成像技术^[21]。

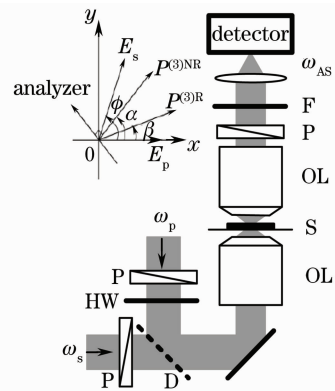


图 2 偏振探测方式 CARS 显微镜的结构示意图

Fig. 2 Schematic of the polarization-sensitivity detection CARS microscope

时间分辨 CARS (time-resolved CARS, T-CARS) 方法使用超短脉冲激光作为激发光,利用共振信号和非共振背景噪声不同的退相时间特性来消除非共振背景噪声。1980 年,美国 Rochester 大学的 F. M. Kamga 等^[22]首次利用脉冲序列技术实现了有效抑制非共振背景噪声的 CARS 光谱仪。2002 年,哈佛大学 A. Volkmer 等^[23]使用三束中心频率不同的窄线宽脉冲激光聚焦在待测样品中,通过控制 E_P 与时间一致的 E_S 之间的时间延迟实现了时间分辨 CARS 显微成像技术。在时间分辨 CARS 方法中,时

间一致的 E_p 和 E_s 入射到样品中激发具有拉曼活性的分子,产生同时包含共振和非共振部分的振动。具有零退相时间的非共振状态在频率域中具有平坦的响应特性,在时间域中具有瞬时的峰值响应特性。与非共振状态相比,共振状态包括振动状态的跃迁,并且具有与对应的自发拉曼谱带宽度相关的较长的退相时间。使用具有适当时间延迟的 E_p 探测这一振动跃迁的衰减过程能够获得分子的 CARS 信号。通过时间分辨的方法能够在时间域内将具有不同时间特性的共振信号和非共振背景噪声有效分离,达到消除非共振背景噪声的目的。如果引入的时间延迟与振动跃迁的退相时间具有同一数量级,能够获得在信号强度上具有较小损失的 CARS 信号,这依赖于激光的带宽和光谱的线宽。

相位控制和整形的方法通过对飞秒宽度的 E_p 和 E_s 进行相位整形,在不同的光谱成分的相关叠加中引入一个相位失配量,从而达到抑制非共振背景噪声的目的。2002 年,以色列的 N. Dudovich 等^[24]首次利用相位控制和整形方法实现了单光束相干控制 CARS 显微成像技术,系统的结构示意图如图 3 所示。他们使用单独一台飞秒脉冲激光器作为抽运光源,利用计算机控制的空间光调制器 (spatial light modulator, SLM) 获得的相位函数对具有一定光谱覆盖范围的飞秒激光脉冲进行相位控制和整形,在光谱带宽内的不同光谱成分之间引入相位失配,实现了对非共振背景噪声的有效抑制。这种方法使用单独一台飞秒激光器作为抽运光源,系统结构简单、操作方便,但是其光谱分辨率受到激发光谱带宽内的空间光调制器分辨率的限制。

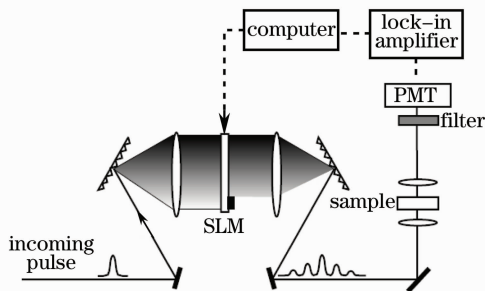


图 3 激光脉冲相位控制和整形 CARS 显微成像系统结构示意图

Fig. 3 Schematic of the CARS microscopy with phase control and shaping of laser pulse

外差干涉方法利用共振和非共振部分的本质差异,即共振是复数量,包含实部 $\{\text{Re}[\chi^{(3)R}]\}$ 和虚部 $\{\text{Im}[\chi^{(3)R}]\}$ 两部分,而非共振部分是实数量的特

点,通过使用一个局域振荡场外差混合直接提取 $\chi^{(3)R}$ 的虚部信息实现抑制非共振背景噪声的目的。2006 年, E. O. Potma 等^[25]利用外差干涉方法实现了外差干涉 CARS 显微成像技术,他们所建立的外差干涉 CARS 显微镜系统结构示意图如图 4 所示,图中, DM1, DM2 为双色镜; LP 为长波通滤光片; CBS 为分束镜; L1, L2 为显微物镜; LO 为局域振荡材料; PM 为相位调制器; det 为光电倍增管。共线传输的 E_p 和 E_s 输入一台迈克尔逊干涉仪后分成两束,其中一束通过产生局域振荡场的材料获得频率为 ω_{LO} 局域振荡场,局域振荡场作为外差干涉场与 E_p 和 E_s 同时共线送入一台显微镜系统激发产生含有局域振荡场的 CARS 信号。通过有效提取不受非共振背景噪声影响的样品分子的共振部分的虚部响应,能够直接获得样品的 CARS 图像信息。此外,通过增加局域振荡场振幅的强度能够放大较弱的 CARS 信号,从而提高探测灵敏度和图像对比度。

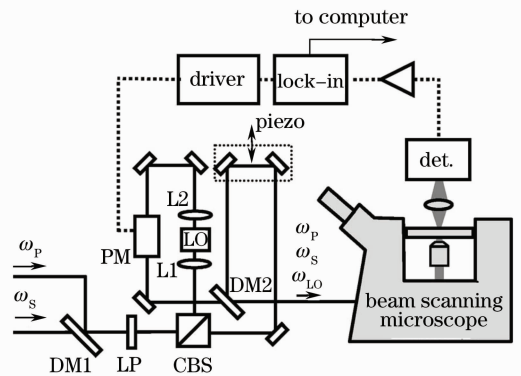


图 4 外差干涉 CARS 显微成像系统的结构示意图

Fig. 4 Schematic of the heterodyne interference CARS microscope

4 CARS 显微成像技术的实现

CARS 显微成像技术是基于 CARS 非线性光学原理的显微成像技术,这就对光源和成像系统提出了与其他显微成像技术不同的要求。使用近红外波段的超短脉冲激光不仅能够大大减少样品的吸收和散射,高相干性、高峰值功率和单脉冲能量较低的超短脉冲激光也能最大限度地减小光致损伤。同时,为满足快速获取图像的需要,要求激光器具有高的重复频率。近年来,随着激光技术的发展,高重复频率和峰值功率的超短脉冲激光器,如钛宝石锁模飞秒脉冲激光器, Nd:YAG 锁模皮秒脉冲激光器等,已经成为成熟可靠的激光光源,在 CARS 显微成像技术中得到了广泛的应用。

由于 CARS 信号是由不同波长的多束激光光束与待测样品相互作用的非线性光学过程产生的,通常情况下,一束激光作为 E_p 和 E_p ,另一束波长红移的激光作为 E_s 。因此,在传统的 CARS 实验中,需要使用至少两台超短脉冲激光器作为抽运光源,调节激光器输出的中心波长获得 E_p, E_p 和 E_s 。通过激光器抽运光参量振荡器 (optical parametric oscillator, OPO) 能够同时获得中心频率不同的两束脉冲激光用于 CARS 显微成像。使用这种光源实现 CARS 显微成像技术,大大简化了整体系统,避免了使用多台激光器时存在的同步困难和输出稳定性差异等问题。近年来,使用超短脉冲锁模激光器抽运光子晶体光纤 (photonic crystal fiber, PCF) 产生超连续谱输出引起了广泛的注意。PCF 所具有的增强非线性效应和可控色散特性使之成为产生超连续谱的有效手段^[27, 28]。根据 CARS 显微成像技术对光源光谱范围的要求,利用一台波长可调谐的锁模超短脉冲激光器抽运 PCF 产生的超连续谱作为光源在多元 CARS 显微成像技术中得到了广泛的应用^[29-31],大大简化了系统,提高了性价比,为 CARS 显微成像技术从实验室走向实际应用提供了一个很好的抽运光源的选择方案。

CARS 显微成像系统利用高灵敏度探测器在远场收集 CARS 信号,则探测位置上的强度可以表示为^[32]

$$P_{\text{CARS}} = \frac{n_{\text{AS}} c}{8\pi} \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi |E_{\text{AS}}(R)|^2 R^2 \sin(\theta), \quad (2)$$

式中 θ 表示远场探测收集角,在前向 (+ z) 探测方式中积分范围 $[\theta_1, \theta_2]$ 是 $[0, \beta_{\text{max}}]$,其中 β_{max} 是收集透镜的圆锥角,在后向 (- z) 探测方式中是 $[\pi - \alpha_{\text{max}}, \pi]$, α_{max} 是入射角, R 表示探测位置。

在入射光束共线同向传输的结构中,在紧聚焦条件下,对于位于焦点中心的两种不同形状的待测样品所产生的前向和背向 CARS 信号的强度与样品直径之间的关系如图 5 所示。对于球形样品,如图 5(a) 所示,产生的前向信号首先随直径的增加而快速增加,当样品直径大于 λ_p 时达到饱和。对于产生的背向信号,当样品直径等于 $0.3\lambda_p$ 时强度达到最大值。随着样品直径的增加,与波矢失配有关的干涉效果导致信号强度的振荡,并随着样品直径的增加而逐步减少,因此背向 CARS 信号仅产生自尺寸较小的样品。对于半球形样品,如图 5(b) 所示,背向信号产生自垂直于光轴的两端待测样品的交界

面上。由于在焦平面上两种待测样品的非线性极化系数的不连续性,使得产生的背向 CARS 信号不会随着样品直径的变大而衰减。

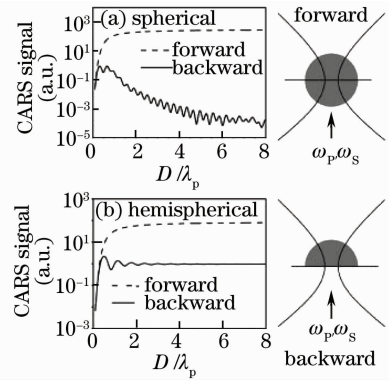


图 5 CARS 信号的强度与样品直径 D 的关系
Fig. 5 Relationship between CARS signal intensity and sample diameter D

图 6 是几种典型的 CARS 显微镜的系统结构示意图,不同的光路结构和信号探测方式适用于不同的实验环境,图中 P 为偏振片;OL 为物镜;S 为样品;F 为滤波片;D 为双色镜。图 6(a) 所示的前向探测 CARS 显微镜 (forward-detected CARS, F-CARS),能够以较小的光功率激发待测样品,产生较强的 CARS 信号。但是这种方式受到来自溶剂的和样品自身较强的非共振背景噪声的干扰,因此, F-CARS 适用于获取能够产生较大共振信号的特定分子振动图像。图 6(b) 和 (c) 所示的背向探测 CARS (epi-detected CARS, E-CARS) 和相向激发 CARS (counter propagating, C-CARS) 显微镜在光路中引入了相位失配量,因此可以有效地减少非共振背景噪声的干扰,大大改善了图像的对比度。在这两种系统中,信号产生自小的散射体或两个大小相当但具有不同 $\chi^{(3)}$ 值的样品的接触面,对于尺寸接近或小于光波长的待测样品具有很强的探测灵敏度。但是, E-CARS 系统可能会由于噪声信号的背

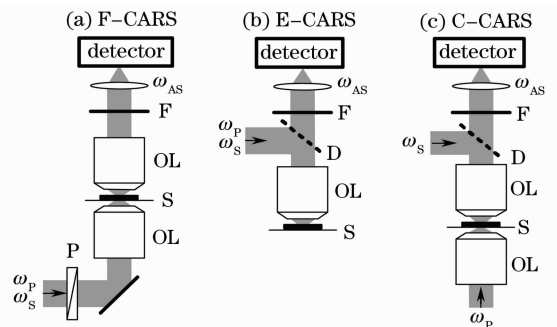


图 6 几种典型的 CARS 显微镜的系统结构示意图
Fig. 6 System schematic of typical CARS microscopes

向反射而影响系统的光谱选择性。C-CARS 避免了这种背向反射的问题,但是实验难度较大。

在传统的 CARS 显微成像技术中,为获取较大体积待测样品完整的 CARS 图像,通常采用激光光束逐点扫描并依次记录各点 CARS 信号的方式。采用这种方式虽然能够获得高空间分辨的 CARS 图像,但是无法回避的问题是扫描系统复杂,图像获取时间长。近年来,为解决上述问题提出了几种新颖的宽场 CARS 显微成像技术^[33,34],在宽场条件下能够同时激发整个视场内待测样品中所有具有拉曼活性的特定分子所产生的 CARS 信号,大大简化了系统,提高了图像获取速度,这对待测样品中动态过程的监测具有良好的应用前景。

5 CARS 显微成像技术的应用

自从 CARS 现象首次被发现以来,其作为一种具有高光谱分辨率的光谱分析工具,在温度、浓度测试,以及材料科学等领域中得到了广泛的应用。近年来,随着 CARS 显微成像技术的完善和发展,这一显微成像技术在分子生物学、细胞生物学、医学和生命科学等众多研究领域中得到了广泛的应用,并取得了众多引人注目的研究成果。

由于 CARS 显微成像技术自身所具有的无需标记的特点,在生物学研究领域中的应用受到高度的重视。第一台 CARS 显微镜通过探测细胞内和细胞周围的重水的 CARS 光谱信号,勾画出浸在重水中的洋葱表皮细胞的结构^[18]。近年来,通过利用脂肪族 C-H 振动键已经成功地获取了多种不同种类细胞结构的 CARS 图像,包括 HeLa 细胞^[35],上皮细胞^[21],NIH 3T3 细胞^[36]等。存在于脂肪细胞和肝细胞中的脂滴被认为是至关重要的能量存储器^[37],其中富含 C-H 化学键,通过 CARS 显微镜能够获取未经染色的活细胞内的脂滴的高对比度图像^[36],并能够监测细胞不同成长过程中脂滴变化的动态过程^[38]。通过把入射激光的中心频率调节至氨基 I 键和磷酸盐拉伸键的振动频率,获取了活细胞内蛋白质和 DNA 在特定种类细胞内的分布状态和运动过程的 CARS 显微图像^[21]。利用磷酸盐化学键的 CARS 信号,获得了处于生命后期的整个细胞的结构和细胞核特征的 CARS 图像^[36]。利用 DNA 的 C-O 拉伸振动的 CARS 信号揭示了细胞质和细胞核的特征^[39]。这些实验结果充分说明 CARS 显微成像技术具有对未经染色的活细胞进行选择成像,以及获取细胞内部结构图像信息的能

力,在分子生物学和细胞生物学中具有广阔的应用前景。

此外,在医学研究领域利用 CARS 显微成像技术也做了许多大胆的尝试,并在一些领域中取得了一些引人注目的进展,如肿瘤的早期发现和癌症的早期诊断^[40]、神经系统髓磷脂组织损伤^[41,42]、血管动脉粥样硬化诊断^[43],以及肥胖症的研究^[44, 45]等。为 CARS 显微成像技术从实验室逐步走向医学研究和临床诊断的实际应用奠定了坚实的基础。

6 存在的问题和解决途径

CARS 显微成像技术能够以高灵敏度获得特定分子的空间分布图像,以及对分子之间的相互作用的动态过程进行监测。传统的 CARS 显微成像技术使用窄线宽皮秒激光脉冲获得特定化学键的 CARS 图像,但是对于研究具有复杂成分和结构的分子而言,需要逐点调节激光的中心波长才能获得分子完整的 CARS 光谱信息,不仅耗时,而且不易使用。

为解决这一问题,提出了使用电子同步的一台窄带皮秒激光器和一台具有一定光谱宽度的飞秒激光器作为光源,通过与偏振探测方式、时间分辨方式等结合在一起实现了具有一定光谱探测范围的高灵敏度多元 CARS 显微镜 (Multiplex CARS, M-CARS)^[46]。但是,这些 CARS 光谱显微成像系统的带宽受到飞秒激光脉冲的光谱覆盖范围的限制,可探测光谱覆盖范围有限,无法同时获取待测样品完整的 CARS 光谱信息。例如,生物大分子的振动光谱范围为 $100\sim 3500\text{ cm}^{-1}$,对于实际的应用仍然存在一定的局限性。为了进一步扩展 M-CARS 显微成像技术的光谱探测范围,满足利用具有高灵敏度和化学选择性的 M-CARS 光谱分析和显微成像技术研究种类繁多的、具有复杂成分和结构的生物分子,同时获取未知成分或含有复杂组成成分待测样品完整的 CARS 光谱信息需求,宽光谱覆盖范围稳定的超短脉冲激光光源是必须的。近年来,使用飞秒脉冲激光器抽运锥形非线性光纤^[47]或光子晶体光纤产生超连续光谱^[29~31],实现了具有较宽探测范围的宽带 CARS 显微成像。但是,应该看到利用超连续谱作为光源实现的 M-CARS 显微镜中仍然存在着很多问题,例如,超连续谱输出的光谱分布状态、各光谱成分的时间一致性和强度稳定性对 CARS 信号的强度以及同时获取样品完整的 CARS 光谱的影响;利用超连续谱作为 M-CARS 的光源

时, CARS 信号及其系统噪声的来源等问题, 仍然有待进一步深入探讨研究。

目前, 由于 CARS 显微成像技术的空间分辨率受到衍射极限的限制, 无法通过 CARS 的方法获取细胞内部的微结构, 以及特定的分子基团和细胞器, 如蛋白质、脂肪等的高空间分辨率的 CARS 显微图像。因此, 如何有效提高 CARS 显微成像技术的空间分辨率, 快速获取活体生物组织和活细胞的内部细微结构是一项非常有意义和具有挑战性的研究工作。

7 总结与展望

CARS 显微成像技术利用待测样品特定分子所固有的分子振动光谱信号作为显微成像的对比度, 能够获取未经标记样品的高时间和空间分辨的三维层析图像, 避免了外源标记对样品自身性质的影响, 具有高灵敏度和高化学选择性。具有高重复频率和峰值功率, 且输出波长在近红外波段的超短脉冲激光器是 CARS 显微成像技术理想的抽运光源。利用超短脉冲激光器抽运 OPO 作为抽运光源已经实现了视频级的 CARS 显微成像技术。利用超短脉冲激光器抽运 PCF 实现宽带 CARS 光谱仪和显微镜, 具有快速获取样品完整 CARS 光谱的能力, 大大提高了 CARS 显微成像技术的光谱选择性。多种不同的系统结构满足了获取不同结构和尺寸的待测样品的三维 CARS 图像的需要。

非共振背景噪声是 CARS 显微成像技术无法回避的最重要的问题, 近年来提出了众多新颖的、行之有效的解决方法, 反映了 CARS 显微成像技术的快速发展。值得一提的是, 2008 年, 哈佛大学 X. Sunney Xie 教授小组的 Christian W. Freudiger 等实现了基于受激拉曼散射过程 (stimulated Raman scattering, SRS) 的非标记多光子激发三维成像技术^[48], 从本质上解决了 CARS 显微成像技术中非共振背景噪声的问题, 为基于分子的振动光谱信号获取活体生物组织和活细胞中特定分子的三维分布图像和相互作用过程的信息提供了一条新颖的途径。

在应用方面, CARS 显微成像技术对于获取活体组织和活细胞方面具有独特的优势, 尤其适用于对细胞内脂类、蛋白质和激素等分子进行非侵入式显微成像和追踪。CARS 显微成像技术在疾病诊断、药理分析等医学领域, 也具有很大的优势。随着 CARS 显微成像技术不断发展和完善, 该技术在空间分辨率、图像获取速率等方面已经接近满足活细

胞生命活动动态图像获取的要求, 已在生物学、医学和生命科学研究领域中展现出广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 T. Wilson, C. Sheppard. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy[M]. Orlando, FL: Academic, 1984. 8~12
- 2 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 3 C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear *et al.*. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy[J]. *PNAS*, 1996, **93**(20): 10763~10768
- 4 E. Kohen, J. G. Hirschberg. Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry[M]. San Diego, CA: Academic, 1989. 125~128
- 5 J. B. Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy[M]. New York: Plenum, 1995. 12~44
- 6 Li Qin, Yu Xin, Hu Xinqi *et al.*. Ultra-high sensitivity fluorescence microscope and its application in biology[J]. *Acta Optica Sinica*, 2000, **20**(4): 533~537
李 勤, 俞 信, 胡新奇等. 超高灵敏度荧光显微镜及其在生物学中的应用[J]. *光学学报*, 2000, **20**(4): 533~537
- 7 Zhang Yixin, Tao Chunksan. Review of laser multiphoton microscopy in biology[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2002, **11**(6): 458~464
张逸新, 陶纯堪. 生物科学研究中的激光多光子显微技术[J]. *激光生物学报*, 2002, **11**(6): 458~464
- 8 Zhang Ning, Chen Zhenzhen, Tang Bo. Recent applications of fluorescence imaging in bioanalysis[J]. *Chinese J. Analytical Chemistry*, 2006, **34**(7): 1030~1034
张 宁, 陈秦秦, 唐 波. 荧光成像在生物分析中的应用[J]. *分析化学评述与进展*, 2006, **34**(7): 1030~1034
- 9 Zhang Fang, Su Rongguo, Wang Xiulin *et al.*. Fluorescence characteristics extraction and differentiation of phytoplankton[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(12): 2052~2059
张 芳, 苏荣国, 王修林等. 浮游植物荧光特征提取及识别测定技术[J]. *中国激光*, 2008, **35**(12): 2052~2059
- 10 R. P. Haugland. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals[M]. Eugene, OR: Molecular Probes, 1996. 155~164
- 11 R. Y. Tsien, A. Miyawaki. Biochemical imaging: seeing the machinery of live cells[J]. *Science*, 1998, **280**: 1954~1955
- 12 J. Hoyland. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity[M]. ed. W T Mason. San Diego, CA: Academic, 1999. 88~94
- 13 H. J. Humecki. Practical Spectroscopy vol. 19[M]. ed. E G Brame Jr. New York: Dekker, 1995. 95~105
- 14 G. Turrell, J. Corset. Raman Microscopy Development and Applications[M]. San Diego, CA: Academic, 1996. 1~28
- 15 S. Nie, S. R. Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Science*, 1997, **275**(5303): 1102~1106
- 16 P. D. Maker, R. W. Terhune. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength[J]. *Phys. Rev.*, 1965, **137**(3A): 801~818
- 17 R. F. Begley, A. B. Harvey, R. L. Byer. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 1974, **25**(7): 387~390
- 18 M. D. Duncan, J. Reijntjes, T. J. Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. *Opt. Lett.*, 1982, **7**(8): 350~352
- 19 Y. R. Shen. The Principles of Nonlinear Optics[M]. New York: Wiley, 1984. 141~184
- 20 R. Brakel, F. W. Schneider. Advances in Non-Linear

- Spectroscopy[M]. ed. R. J. H. Clark, R. E. Hester. New York: Wiley & Sons, 1988, 149~185
- 21 J. X. Cheng, L. D. Book, X. S. Xie. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2001, **26**(17): 1341~1343
- 22 F. M. Kamga, M. G. Sceats. Pulse-sequenced coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy: a method for suppression of the nonresonant background[J]. *Opt. Lett.*, 1980, **5**(3): 126~128
- 23 A. Volkmer, L. D. Book, X. S. Xie. Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: imaging based on Raman free induction decay [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2002, **80**(9): 1505~1507
- 24 N. Dudovich, D. Oron, Y. Silberberg. Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy [J]. *Nature*, 2002, **418**(6897): 512~514
- 25 E. O. Potma, C. L. Evans, X. S. Xie. Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(2): 241~243
- 26 D. A. Kleinman. Nonlinear dielectric polarization in optical media[J]. *Phys. Rev.*, 1962, **126**(6): 1977~1979
- 27 J. C. Knight, T. A. Birks, P. St. J. Russell *et al.*. All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding[J]. *Opt. Lett.*, 1996, **21**(19): 1547~1549
- 28 J. C. Knight, P. St. J. Russell. New ways to guide light[J]. *Science*, 2002, **296**(5566): 276~277
- 29 H. Kano, H. Hamaguchi. Near-infrared coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using supercontinuum generated from a photonic crystal fiber[J]. *Appl. Phys. B*, 2005, **80**(2): 243~246
- 30 Murugkar Sangeeta, Brideau Craig, Ridsdale Andrew *et al.*. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using photonic crystal fiber with two closely lying zero dispersion wavelengths [J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(21): 14028~14037
- 31 Y. J. Lee, M. T. Cicerone. Vibrational dephasing time imaging by time-resolved broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *App. Phys. Lett.*, 2008, **92**(4): 041108
- 32 J. X. Cheng, Andreas Volkmer, X. S. Xie. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2002, **19**(6): 1363~1375
- 33 Christoph Heinrich, Stefan Bernet, Monika Ritsch-Marte. Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2004, **84**(5): 816~818
- 34 I. Toytman, K. Cohn, T. Smith *et al.*. Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with non-phase-matching illumination[J]. *Opt. Lett.*, 2007, **32**(13): 1941~1943
- 35 A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, **82**(20): 4142~4145
- 36 J. X. Cheng, Y. K. Jia, G. Zheng *et al.*. Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and application to cell biology[J]. *Biophys. J.*, 2002, **83**(1) 502~509
- 37 D. J. Murphy. The biogenesis, functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms [J]. *Prog. Lipid Res.*, 2001, **40**(5): 325~438
- 38 X. L. Nan, J. X. Cheng, X. S. Xie. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *J. Lipid. Res.*, 2003, **44**(11): 2202~2208
- 39 A. Volkmer, J. X. Cheng, X. S. Xie. Vibrational imaging with high sensitivity via epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **87**(2): 23901-1~4
- 40 Thuc T. Le, T. B. Huff, J. X. Cheng. CARS imaging reveals the roles of lipid in cancer metastasis[J]. *BMC Cancer*, 2009, **9**(42): 1~14
- 41 H. Wang, Y. Fu, P. Zickmund *et al.*. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues [J]. *Biophys. J.*, 2005, **89**(1): 581~591
- 42 Y. Fu, T. B. Huff, H. W. Wang *et al.*. Ex-vivo and in-vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(24): 19396~19409
- 43 Thuc T. Le, Ingeborg M. Langohr, Michael Sturek *et al.*. Label-free molecular imaging of atherosclerotic lesions using multimodal nonlinear optical microscopy [J]. *J. Biomedical Optics*, 2007, **12** 054007
- 44 Thuc T. Le, J. X. Cheng. Non-linear optical imaging of obesity-related health risks: review[J]. *J. Innovative Optical Health Science*, 2009, **2**(1): 9~25
- 45 HanWei Wang, Yan Fu, Terry B. Huff *et al.*. Chasing lipids in health and diseases by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, **50**(1): 160~167
- 46 J. X. Chen, A. Volkmer, L. D. Book *et al.*. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**(34): 8493~8498
- 47 T. W. Kee, M. T. Cicerone. Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(23): 2701~2703
- 48 Christian W. Freudiger, Wei Min, Brian G. Saar *et al.*. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Science*, 2008, **322**(5909): 1857~1861