

· 特邀综述 ·

相干拉曼散射显微技术及其在生物医学领域的应用

李姿霖, 李少伟, 张思鹭, 沈炳林, 屈军乐, 刘丽炜*

深圳大学物理与光电工程学院, 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 相干拉曼散射显微技术作为一种新型的成像技术, 具有无标记、高特异性、非侵入等优点, 已被广泛用于化学结构及物质成分分析。近年来, 光子学、生物医学和显微成像技术等领域的相互交叉和融合发展, 极大地推动了相干拉曼散射显微成像技术在生物医学领域的应用。简要介绍了相干拉曼散射显微成像的基本原理、分类、系统构成, 同时概述了相干拉曼散射显微成像技术近年来在生物医学领域的应用, 包括检测、脂类分析和蛋白质构象变化等, 最后对其未来发展进行了展望。

关键词 生物医学; 相干拉曼散射显微技术; 相干反斯托克斯拉曼散射; 无标记成像; 受激拉曼散射成像

中图分类号 O437.3

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207005

Coherent Raman Scattering Microscopy Technique and Its Biomedical Applications

Li Zilin, Li Shaowei, Zhang Silu, Shen Binglin, Qu Junle, Liu Liwei*

Key Laboratory of Optoelectronics Devices and Systems of Guangdong Province and Ministry of Education, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract As a new imaging technique, coherent Raman scattering (CRS) microscopy has been widely used in chemical structure and composition analysis because of its advantages of label-free, high specificity, and non-invasion. In recent years, the mutual cross-over and integrated development of photonics, biomedicine, and microscopic imaging technology has greatly promoted the application of CRS microscopy in biomedicine. This paper briefly introduces the basic principle of CRS microscopy and its classification, then explains the most widely used implementation of CRS, and summarizes the recent applications of CRS microscopic imaging in biomedicine, including detection, lipid analysis, and protein conformation change. Finally, the future development of CRS is discussed.

Key words biomedicine; coherent Raman scattering microscopy technique; coherent anti-stokes Raman scattering; label-free imaging; stimulated Raman scattering imaging

OCIS codes 190.5650; 170.3880; 170.5660

1 引 言

光学显微是医学成像的主要手段, 传统的光学显微镜通常依赖于待测样品自身的一些光学性质, 如吸收、散射和折射率等, 缺乏足够的特异性。借助荧光标记技术, 对待测样品内的不同成分进行标记, 通过荧光信号可以获得不同化学成分在待测样品内

的分布。20 世纪末, 绿色荧光蛋白(GFP)的发现, 极大地推进了活细胞和生物体内动态成像研究的发展。随后, 超分辨荧光成像技术的出现, 使得人们在纳米尺度下观察活细胞和生物组织成为可能^[1]。但是荧光成像所引入的荧光探针会扰乱生物组织或细胞的结构和功能, 而且荧光信号的强度会随着光照时间的延长而减弱, 从而影响生物组织或细胞的长

收稿日期: 2019-08-22; **修回日期:** 2019-09-18; **录用日期:** 2019-09-26

基金项目: 国家自然科学基金(61525503, 61620106016, 61835009)、广东省高等学校科技创新(重点)项目(2015KJGJHZ002, 2016KCXTD007)、广东省自然科学基金创新研究团队项目(2014A030312008)、深圳市自由探索项目(JCYJ20180305124902165)

* **E-mail:** llw_cust@163.com

时间观察。另外,一些荧光探针的尺寸较大,因此对细胞内小分子的标记较为困难。

相干拉曼散射(CRS)显微成像的信号来源于分子内部振动能级的跃迁,作为一种新型的成像技术,其优势在于无标记和高特异性。相对于自发拉曼散射,CRS成像可以大大提高信号的强度,缩短图像的采集时间,使动态成像成为可能^[2]。CRS技术可以通过选择振动光谱,对生物体内的特定小分子及生物大分子进行无标记成像检测,尤其是可以对活细胞中的脂质、胶原、蛋白等的结构组成、构象变化,以及治疗过程中的药物靶点等进行定性分析。随着CRS显微技术的不断发展,其在生物医学领域的应用也取得了长足进展。本文将综述CRS显微技术及其在生物医学领域的应用,并对其存在的局限性和发展前景进行探讨。

2 CRS 成像的原理及分类

CRS主要包括相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)。

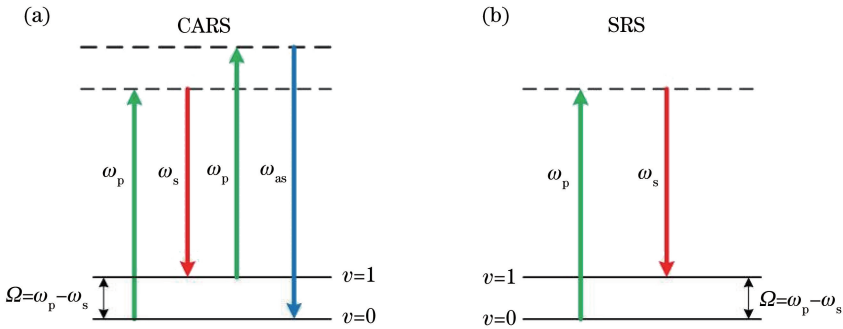


图1 CARS和SRS过程能级图。(a) CARS能级图;(b) SRS能级图

Fig. 1 Energy level diagrams of CARS and SRS processes. (a) CARS energy level diagram; (b) SRS energy level diagram

与CARS现象不同,SRS是一种非参量的耗散过程,其能级图如图1(b)所示。在SRS发生前后,光源与生物样品之间会发生能量转移。当两束满足拉曼共振条件的光入射到样品表面后,会有部分泵浦光子消失,将能量转移到分子的振动能级,从而导致斯托克斯光束强度增大和泵浦光束强度损失,分别表示为受激拉曼增益(SRG)和受激拉曼损耗(SRL)。因为SRS信号出现在与激发光源相同的波长处,所以通常使用光学调制和相敏检测技术从激光脉冲中提取SRS信号。虽然SRS现象早在1962年就被观察到了^[8],甚至早于CARS现象,但SRS显微成像技术仅在过去十几年才开始取得较大发展。2007年,Ploetz等^[9]报道了一种基于低重复频率激光器的SRS显微镜,次年,Freudiger等^[10]

CARS过程的能级图如图1(a)所示。泵浦光的频率为 ω_p ,斯托克斯光的频率为 ω_s ,如果介质中化学键的拉曼频移为 Ω ,当两束光的频率满足 $\omega_p - \omega_s = \Omega$ 时,两束光相干叠加,产生频率为 $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$ 的反斯托克斯光。福特汽车公司的研究人员于1965年第一次观察到了CARS现象^[3]。1982年,美国海军实验室首次搭建了用于生物成像的CARS系统^[4],这套系统使用可见光激光作为光源,证明了CARS作为一种成像手段的可行性。真正实用的CARS显微系统是由Zumbusch等^[5]于1999年实现的,该系统使用共线光束和紧聚焦几何结构,这项工作促进了CARS显微成像技术的发展。Cheng等^[6]采用偏振调制的方法将CARS信号从非共振背景中分离出来,进而实现了对活细胞的高灵敏度振动成像。2002年,Cheng等^[7]首次使用皮秒脉冲激光同步飞秒脉冲激光同时检测多个拉曼谱。CARS可以在C—H强的信号区域($2800 \sim 3100 \text{ cm}^{-1}$)对脂质丰富的样本(如脂质体和髓鞘)进行成像,而且可以成像的拉曼谱范围已经扩展到指纹区($500 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$)。

报道了一种高重复频率的SRS显微技术,该技术使用光电调制器将斯托克斯光调制到一个低频,光通过样品后再过滤掉斯托克斯光,最后使用锁相放大器解锁其中的SRS信号。2010年,Saar等^[11]进一步改进了信号收集方式,使SRS显微技术可以用于背向散射信号的采集,并将成像速率大幅提升至30 frame/s,使得SRS显微成像技术具有更广阔的应用前景。

相比较而言,CARS信号通常伴随有非共振背景,这个背景的产生是分子中电子对外界光场的响应造成的。而SRS信号没有非共振背景,而且可以在环境光下进行探测。此外,CARS信号与待测样品浓度之间是平方依赖关系,而SRS信号对浓度是线性依赖关系,这样便使得SRS在定量分析上更简

单直接。此外, SRS 并不是完全不受背景的影响, 自相位调制、瞬时吸收、光热效应都会影响 SRS 信号, 但 CARS 并不受这些因素的影响。

3 CRS 显微成像系统

CRS 显微成像最常采用的系统是在激光扫描

显微镜上使用两个同步脉冲。CARS 和 SRS 可以使用共同的激光光源和显微镜系统(如图 2 所示), 但它们要使用不同的信号探测装置。

此外, 目前的 CRS 显微成像系统可以用单一激光束代替泵浦光和斯托克斯光来实现 CRS 显微成像^[12-13]。

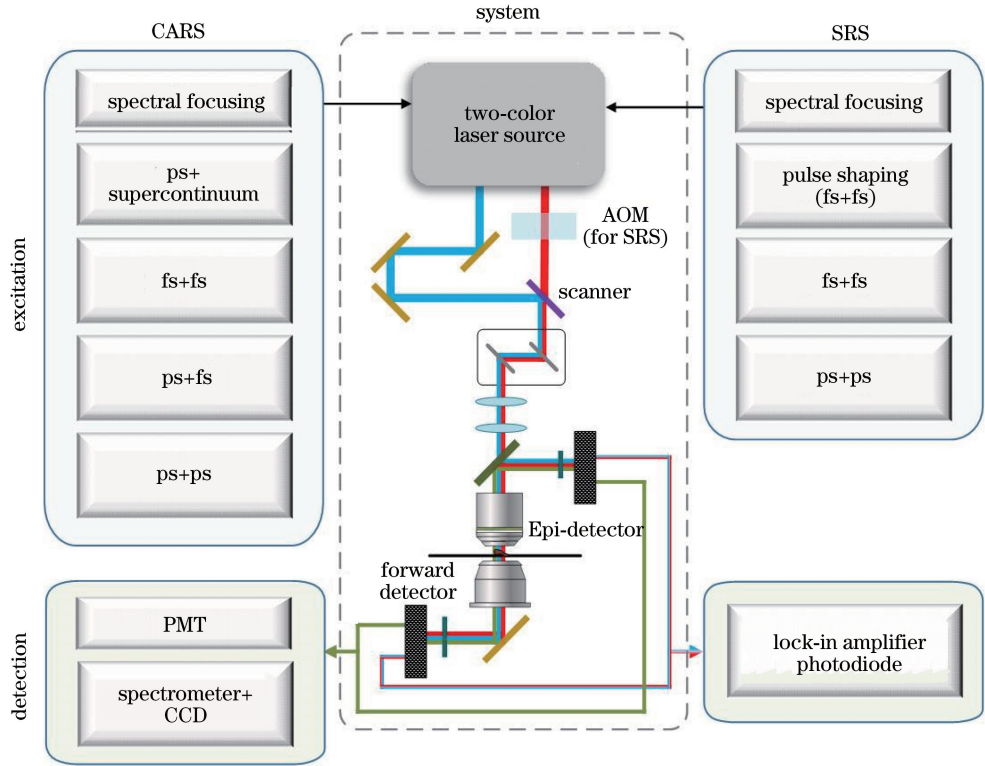


图 2 CRS 显微成像系统图

Fig. 2 Diagram of CRS microscopy imaging system

3.1 CARS 显微成像系统

传统的 CARS 显微成像系统通常由双色激光光源、显微镜和高灵敏度的光电探测器组成。常用的 CARS 成像模式有单频 CARS 显微成像、多色 CARS 显微成像和高光谱 CARS 显微成像。

与在每个像素点获取整个拉曼光谱的自发拉曼显微成像不同, CRS 显微成像通常将能量聚焦到特定的拉曼位移中, 进而获取信号。一般来讲, 将所有激光能量聚焦到某一特定的拉曼振动位移中的方法称为单频 CRS 显微成像。虽然单频 CRS 显微成像可以保证信号的强度, 但仍会受到化学特异性的限制。对于单频(或单色)CARS 成像, 使用皮秒脉冲激光器可以得到最佳的信噪比和最弱的非共振背景^[14]。在早期的 CARS 显微成像中, 激光光源是具有同步脉冲的双皮秒激光器。通常, 两束光经二向色镜(DM)后在空间和时间上重合, 被耦合进共聚焦显微镜。为了最大限度地提高 CARS 信号的收

集效率, 通常采用高数值孔径的物镜。CARS 过程中产生了比入射光波长更短的反斯托克斯光, 因此可以使用二向色镜直接将泵浦光和斯托克斯光滤除, 采集反斯托克斯信号, 之后可以用显微镜的外置 PMT(photomultiplier tube) 探测器来收集并检测 CARS 信号。

多色 CRS 显微成像利用光谱整形, 从宽带泵浦光中提取出多个频率成分, 同时使用光栅进行分光, 分别探测这几种成分对应的信号。与传统的将 PMT 作为光电探测器的 CARS 显微成像不同, 多色 CARS 显微成像通常使用光谱仪和线阵 CCD 来收集每个像素处产生的宽带频谱^[15]。在过去的 10 年中, 多色 CARS 显微成像不断发展, 最快的光谱采集时间为 3~5 ms^[16]。与视频速率的单频 CARS 成像相比, 多色 CARS 显微成像的速度在很大程度上受 CCD 读出速率的限制。

高光谱 CARS 显微成像通过一次扫描拉曼频

移实现光谱成像。实现高光谱 CARS 显微成像的常用方法为光谱聚焦,即适当地啁啾两个宽带激光光束,并调整它们之间的时间延迟。啁啾后,两个激光脉冲的瞬时重叠具有较低的频率带宽,从而提高了光谱分辨率^[17-18]。通过调整两个啁啾脉冲之间的时间延迟,可以改变重叠频率差,从而产生不同的拉曼位移。现在许多研究小组都将光谱聚焦的方法用于高光谱 CARS 成像^[19-22]。

由于 CARS 信号通常伴随着非共振背景,峰的位置也发生了变化,并扭曲了拉曼谱线的形状,所以 CARS 光谱需要进行处理后才能进行定量分析。为了提取实际的拉曼光谱,可以利用数学计算方法对高光谱 CARS 数据进行定量分析^[23-24]。如果 CARS 光谱的差异足够显著,就可以对高光谱 CARS 图像进行定性分析,而不需要通过复杂的计算来区分化学物质^[25]。

3.2 SRS 显微成像系统

SRS 成像可以在 CARS 成像系统的基础上,采用光学调制器、光电二极管检测器和解调器,提取与激发光波长相同的信号。采集 SRS 信号时,透过样品到达探测器的光强很高,常常达到几毫瓦甚至数十毫瓦,因而使用光电二极管作为探测器,而不使用共聚焦或者双光子显微镜中内置的探测器。通常,一束光的强度是由声光调制器或电光调制器进行高频(通常是兆赫兹级)调制的。解调器用于提取 SRL 或 SRG 引起的激发光束强度的微小变化,锁相放大器是 SRS 成像中最常见的解调器。2012 年,Slipchenko 等^[26]研发了一种可以代替传统锁相放大器的可调谐放大器(TAMP),它可以用于对大鼠脊髓中的髓磷脂和血液进行体内成像。常见的 SRS 成像系统包括高光谱 SRS 显微成像和多色 SRS 显微成像。

在拉曼光谱谱带重叠的情况下,高光谱 SRS 显微成像具有更好的化学特异性,而实现高光谱 SRS 显微成像的重点在于实现波长或拉曼频移的扫描。目前有三种方法可以通过对拉曼频移扫描实现高光谱 SRS 成像:第一种是利用皮秒脉冲在一个连续的范围内调整激光波长,可以实现多个拉曼跃迁^[27];第二种是基于宽带飞秒光源,利用脉冲整形器对宽频飞秒光谱中的窄光谱成分进行滤波扫描^[28-30];第三种方法是利用光谱聚焦^[31-32],与之前讨论的高光谱 CARS 相同。

2012 年,Fu 等^[33]展示了一种多色 SRS 显微技术,该技术将基于光栅的脉冲整形器和基于光栅的

光谱仪结合,用于组织成像和化学成分的定量分析,具有多种化学选择性。同年,Fu 研究小组报道了使用单独的锁相放大器对三个光谱通道进行并行检测的多色 SRS^[34]。

4 CRS 显微成像的应用

4.1 CARS 显微成像的应用

CARS 显微成像已被广泛用于单细胞成像^[35-38]、组织成像^[16,27,39-46]以及模型生物成像^[47-49]。在单细胞成像中,C—H 伸展区域的强 CARS 信号能提供很多有用的信息。2003 年,Nan 等^[35]使用 Oil Red 染色液对活体成纤维细胞中的中性脂滴进行染色,并观察它的荧光图像,将其与无染色中性脂滴的 CARS 成像进行对比,证实了 CARS 成像的准确性。研究人员在用 CARS 显微系统检查荧光标记过程中发现,固定细胞的 Nile Red 染色液会使中性脂滴的结构发生变化,而由于中性脂滴是疏水结构,所以用甲醛进行固定对中性脂滴的结构无太大影响。该 CARS 显微系统也被用于监测 3T3-L1 细胞的分化过程,在分化早期中性脂滴明显减少,之后,细胞开始在细胞质中以非同步的方式分化和重新积累中性脂滴。结果表明,CARS 显微系统不仅可以跟踪活细胞的动态变化,还可以同时研究 3T3-L1 细胞分化中脂滴的演化过程。2009 年,Le 等^[50]将 CARS 用于小鼠体外和体内肺癌细胞转移的研究中,发现,高脂肪饮食会促进富含脂质的肺癌细胞的转移。2012 年,Mitra 等^[36]将 CARS 用于前列腺循环肿瘤细胞的研究中,对小鼠癌症模型中富含脂质的原发性癌细胞和循环肿瘤细胞进行了 CARS 成像(结果如图 3 所示),结果发现转移性前列腺癌患者外周血中所有的前列腺循环肿瘤细胞表现出强的 CARS 信号,而所有检查的白细胞都表现出弱的 CARS 信号(前列腺循环肿瘤细胞的 CARS 信号的平均强度是白细胞信号强度的 7 倍)。2014 年,Okuno 等^[37]采用 CARS 显微光谱法系统地研究了哺乳动物细胞内表面活性剂的摄取和分解。

最近,高光谱 CARS 成像在细胞组分的无标记研究中取得了新成果。2014 年,di Napoli 等^[38]将不同比例的棕榈酸(饱和)和 α -亚麻酸(不饱和)加入到人脂肪干细胞中,研究人脂肪干细胞中中性脂滴的化学成分,并在振动指纹区域($500 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$)和 C—H 拉伸区域($2600 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$)进行双频差分 CARS 显微成像和高光谱 CARS 显微成像,定量评估和比较两者的性能。

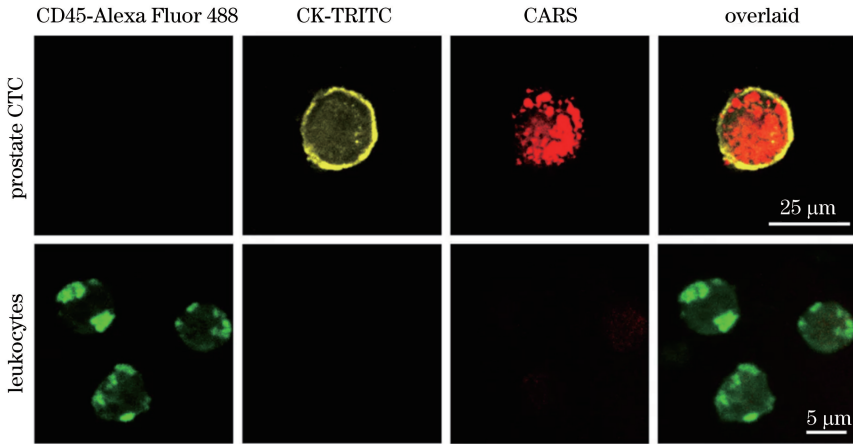


图 3 用 CARS 显微镜检测到的富含脂质的前列腺循环肿瘤细胞(上排:前列腺循环肿瘤细胞表现出由细胞内脂质积累引起的强的 CARS 信号;下排:白细胞表现出主要来自细胞膜的弱的 CARS 信号)^[36]

Fig. 3 Detection of lipid-rich prostate CTC with CARS microscopy. (Upper row: prostate CTC exhibits strong CARS signal arising from intracellular lipid accumulation; lower row: leukocytes exhibit weak CARS signal arising mainly from cellular membrane)^[36]

目前,CARS 成像技术已成为研究组织生物学和疾病诊断的独特工具。它的一个重要应用是中枢神经系统和周围神经系统中髓鞘的可视化^[41-42],这为离体研究脊髓损伤和髓鞘疾病提供了一种有效方法。2005 年,Wang 等^[43]使用激光扫描 CARS 显微镜系统在生理条件下对神经元髓鞘进行三维成像,表征了活脊髓组织中髓鞘的分子取向和振动光谱分布。CARS 显微成像也被用于鉴定患病小鼠^[27,44]和人类动脉粥样硬化组织中的胆固醇晶体^[45]。2014

年,Camp 等^[16]实现了宽带 CARS 的三维组织成像,基于其独特的光谱,研究人员能够区分蛋白质和脂质,以及胶原蛋白和 DNA。在研究中,通过非共振背景的弱拉曼跃迁的外差放大,500~3500 cm^{-1} 的宽拉曼光谱窗口被高光谱 CARS 覆盖,实现了对健康小鼠胰腺组织的三维高速化学成像(如图 4 所示),从而使得 C—H 拉伸区域和指纹区域的高质量 CARS 成像成为可能。此外,CARS 还可被用于体内皮肤活组织检查^[51]和无染色组织病理学^[46]研究。

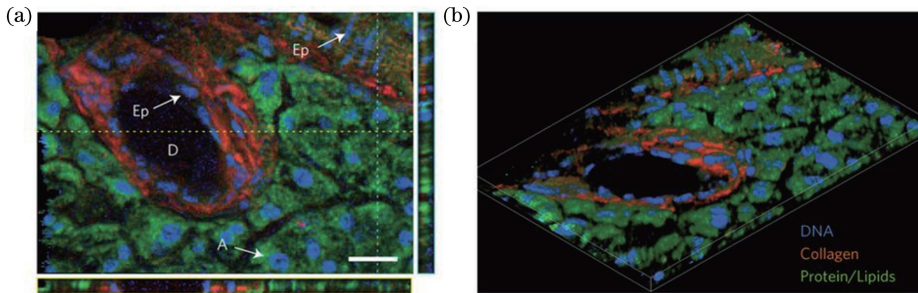


图 4 宽带 CARS 对小鼠胰管的三维组织成像^[16]。(a)伪彩色图,蓝色为细胞核(785 cm^{-1}),红色为胶原蛋白(855 cm^{-1}),绿色为脂质和蛋白质的复合物(1665 cm^{-1}),A 为腺泡细胞,D 为外分泌管,Ep 为上皮细胞;(b)小鼠胰管的三维重建图

Fig. 4 Three-dimensional tissue imaging with wideband CARS for murine pancreatic ducts^[16]. (a) Pseudo color chart, in which nuclei (785 cm^{-1}), collagen (855 cm^{-1}), and a composite of lipids and proteins (1665 cm^{-1}) are highlighted in blue, red, and green, respectively. A represents acinar cell, D represents exocrine duct, and Ep represents epithelial cell; (b) three-dimensional reconstruction result of murine pancreatic ducts

秀丽隐杆线虫作为模型生物的代表,已成为研究脂肪储存和脂质代谢的活体测试对象。2007 年,Hellerer 等^[47]使用 CARS 显微技术监测了生物体的形态和脂滴的几何排列,研究了活体秀丽隐杆线虫中脂质储存的遗传变异与代谢途径之间的关系。

2010 年,Yen 等^[48]对秀丽隐杆线虫中的脂肪储存功能分别进行染料标记成像和无标记 CARS 成像(结果如图 5 所示),并使用 CARS 成像对活体秀丽隐杆线虫中的脂肪储存进行了定量测量。脂肪储存的染料标记成像依赖于所使用的脂溶性染料,例如

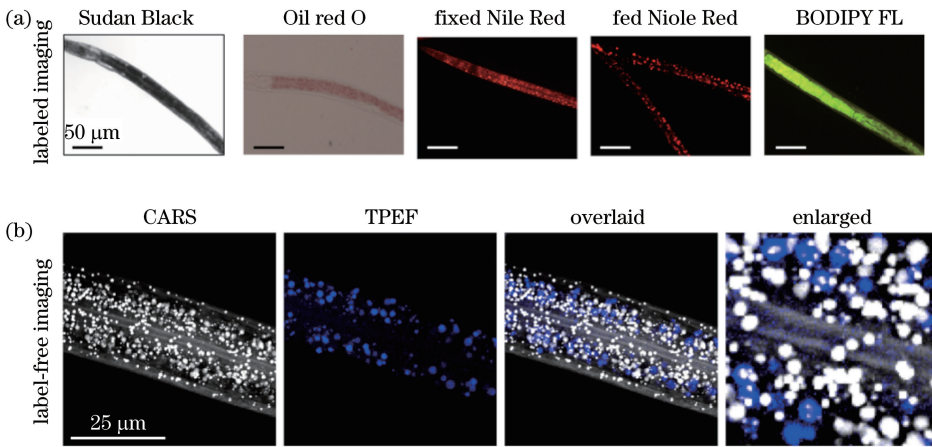


图 5 利用标记和无标记成像方法对秀丽隐杆线虫体内脂肪成像的结果^[48]。(a)采用苏丹黑、油红 O 和尼罗红对固定后的线虫进行染色的结果,以及分别采用尼罗红、BODIPY 标记的脂肪酸喂养活线虫,并对脂肪进行标记成像的结果; (b)利用 CARS 和双光子激发荧光(TPEF)对中性脂质和自发荧光颗粒进行无标记成像的结果

Fig. 5 Labeled and label-free imaging for fat in *C. elegans*^[48]. (a) Labeled imaging of fat using Sudan Black, Oil Red O, and Nile Red staining of fixed worms and Nile Red and BODIPY-labeled fatty acids fed to live worms; (b) label-free imaging results of neutral lipid species and autofluorescent gut granules using CARS and TPEF

Nile Red、氟硼二吡咯(BODIPY)等。

相比之下,CARS 显微镜对脂肪储存的无标记成像依赖于 C—H 的固有分子振动,同时使用 CARS 和 TPEF 成像可以实现中性脂滴和自发荧光肠道颗粒的无标记可视化。除了可以测定总的脂肪储存量之外,CARS 成像还可以用来定量分析自发荧光颗粒、脂滴的大小和数量,以及脂质链的不饱和度。与标记技术相比,无标记 CARS 成像为活体秀丽隐杆线虫中脂肪储存量的研究提供了直接可靠的手段。2010 年,Le 等^[49]通过将 CARS 成像与指纹区共聚焦拉曼分析相结合,分析了野生型和突变体秀丽隐杆线虫中脂质的不饱和水平,并研究了遗传修饰对秀丽隐杆线虫中性脂质储存和脂质不饱和水平变化的影响。

4.2 SRS 显微成像的应用

随着 SRS 显微成像的迅速发展,其在生物医学研究中的应用越来越受到重视,已被广泛用于单细胞成像^[32,52]、组织成像^[10-11,30,53-61]以及模型生物成像^[49,62-66]。

与 CARS 显微成像相比,SRS 显微成像最重要的特点是不存在使拉曼信号失真的非共振背景。与 CARS 类似,C—H 伸缩振动产生强的 SRS 信号,可利用其特点对生物样品中的脂质和蛋白质进行无标记 SRS 成像。另外,SRS 显微成像已经被扩展至指纹区域($500 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$)。2008 年,Freudiger 等^[10]利用皮肤渗透增强剂二甲基亚砜(DMSO)和维生素 A 的代谢中间产物视黄酸(retinoic acid)分

别在 670 cm^{-1} 和 1570 cm^{-1} 有明显谱峰的特点,使用 SRS 成像技术对非标记药物在皮肤内的运输进行了追踪。DMSO 为亲水分子,可以通过蛋白穿透皮肤,所以其信号集中于角质层。与此相反,视黄酸为亲脂分子,可以通过脂质丰富的细胞间隙进行渗透,所以视黄酸的信号集中于细胞间隙。2012 年,Zhang 等^[52]在部分指纹区域(785 cm^{-1} 和 1090 cm^{-1})证明了核酸在活细胞中的分布,并分别对果蝇幼虫的单个唾液腺细胞,以及两种哺乳动物细胞——人胚肾细胞(HEK293)和乳腺癌细胞(MCF7)——进行 SRS 成像。在果蝇唾液腺细胞中可以清晰地观察到多线染色体的特殊结构。在卵巢癌细胞中检测到了在细胞间期非分裂细胞中存在的核仁,并发现了分裂细胞中发生的 DNA 浓缩水平增大的现象。这项研究表明,该技术对于鉴定活组织内经历过分裂或凋亡的细胞尤为重要。

SRS 成像已经被用来对细胞内的不同成分进行成像,如脂质、蛋白质、核酸等。Fu 等^[32]使用光谱聚焦方法,利用高光谱 SRS 显微镜观察了高浓度的伊马替尼和尼罗替尼在小鼠 BaF₃ 细胞内的无标记可视化成像(如图 6 所示),这两种药物是有效的 Abelson 酪氨酸激酶抑制剂,可用于治疗多种癌症。与仅用二甲基亚砜(DMSO)处理的细胞成像相比,研究人员在采用伊马替尼和尼罗替尼处理的细胞中都发现了几个由细胞内药物积累所致的亮点。实验中发现选定位置的 SRS 光谱与溶液中药物的 SRS 光谱相似,但与细胞质区域的光谱不同,由此证实了

细胞对药物的摄取和积累。Li 等^[55]认为脂质去饱和可作为卵巢癌干细胞的代谢标志,为癌症干细胞特异性治疗提供了新的靶点。此外,Li 等还计算了卵巢癌细胞高光谱 SRS 图像中 3002 cm^{-1} 和

2900 cm^{-1} 强度的比值,定量分析了卵巢癌细胞内脂质的组成。这项工作证明了单细胞化学成像的重要性,可以更准确地识别罕见和恶性肿瘤细胞群体,从而可针对癌症干细胞进行特异性治疗。

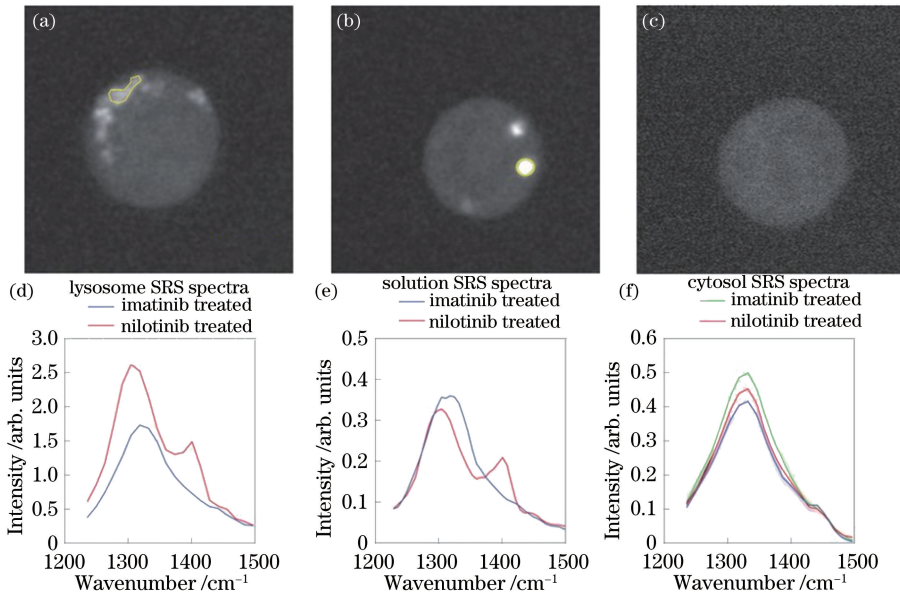


图 6 具有高浓度药物的小鼠 BaF_3 细胞的高光谱 SRS 成像^[32]。高浓度伊马替尼(a)和尼罗替尼(b)在小鼠 BaF_3 细胞内的无标记可视化成像,这与仅使用二甲亚砜处理的对照细胞(c)不同;选定位置的 SRS 光谱(d)与溶液中两种 SRS 光谱(e)相似,但与细胞质区域(f)不同

Fig. 6 Hyperspectral SRS imaging of BaF_3 cells in mouse with high concentration drug. Unlabeled visualization imaging of high concentrations of imatinib (a) and nilotinib (b) in mouse BaF_3 cells, as distinct from control cells treated with dimethyl sulfoxide alone (c); SRS spectrum (d) of the selected location shows similarity to two SRS spectra (e) in solution, but it is different from the cytoplasmic region (f)

目前,SRS 已被广泛用于组织成像的检测中。Freudiger 等^[10,53-54]首次使用 SRS 对皮肤中的脂质以及体内大脑肿瘤进行了成像(结果如图 7 所示),并将小鼠各种器官的 SRS 图像与苏木精-伊红(HE)染色的组织病理学样本进行了对比。2013 年,Wang 等^[30]利用胆固醇中的 $\text{C}=\text{C}$ 键(甾醇 $\text{C}=\text{C}$ 键)在 1669 cm^{-1} 的特征带,采用高光谱 SRS 对完整的动脉粥样硬化组织中的胆固醇晶体进行了无标记定量成像,同时记录了同一光谱窗口内包括甘油三油酸酯分子中的 $\text{C}=\text{C}$ 键(酰基 $\text{C}=\text{C}$ 键)和牛血清蛋白(BSA)中广泛存在的酰胺 I 键,并通过多元曲线分辨(MCR)分析得到了各化学键的定量化学图谱。此外,SRS 成像也被应用到了人类癌症组织的体内成像^[55]。2014 年,Yue 等^[56]采用 SRS 显微成像研究了不同阶段的人前列腺癌的组织,结果显示,前列腺癌组织与正常前列腺组织相比,其胆固醇酯的储存量会增加。2018 年,Ji 等^[57]利用 SRS 成像技术对富含错误折叠的 $\text{A}\beta$ 蛋白的淀

粉样斑块进行无标记成像,推动了阿尔兹海默症预防、治疗的进程。Yan 等^[58]利用高光谱受激拉曼散射显微技术在癌肝组织中观察到大量饱和脂肪的积累,而在大多数相邻的正常组织中却无饱和脂肪的积累,并通过质谱法进一步证实了肝癌组织中含有较高含量的甘油三棕榈酸酯。这些研究结果表明,异常积累的饱和脂肪有可能成为肝癌的代谢标志物。Zhang 等^[59]利用瞬态吸收(TA)和 SRS 成像技术,对脑组织中的血红蛋白和含铁血黄素进行了区分,并将无标记成像与 Perls 染色成像进行了比较。Zhang 等^[60]使用双相平行 SRS 检测技术,将整个小鼠脑部的成像时间从 70 min 缩短到 8 min,并对新鲜的人软骨肉瘤和肝组织进行成像,进一步验证了新鲜人体手术组织成像的方法。2019 年,Zhang 等^[61]利用 SRS 显微技术对喉鳞状细胞癌组织进行成像,发现其与传统 HE 染色具有相似的诊断特征,并构建了基于深度学习的模型,模拟了完全切除喉部边缘的术中评估。

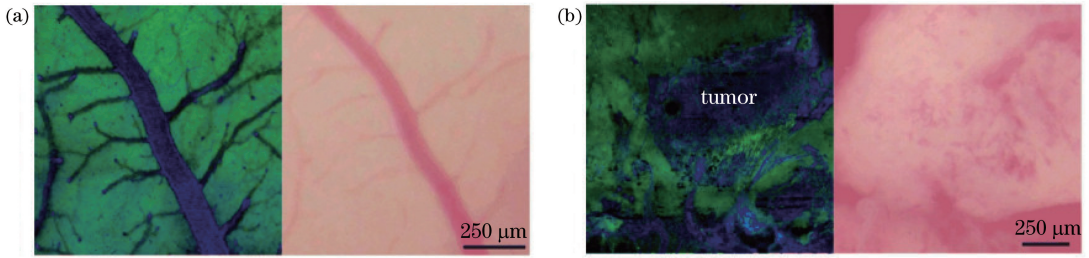


图 7 小鼠大脑肿瘤的 SRS 成像^[53]。(a)在皮层表面下方的肿瘤中,在对皮层表面成像时,SRS(左)和明场像(右)没有明显异常;(b)去除一部分皮质后可发现肿瘤区域,SRS(左)和明场像(右),能够看到肿瘤与正常大脑之间的界面
Fig. 7 SRS imaging of brain tumors in mice^[53]. (a) In tumors below the cortical surface, there were no significant abnormalities in the SRS (left) and brightfield images (right) when imaging the cortical surface; (b) after removing a part of the cortex, tumor regions can be found, and interface between the tumor and the normal brain can be seen in SRS (left) and brightfield images(right)

另外,SRS 显微成像也被广泛用来研究多模型生物。例如,Hu 等^[62]通过对 *X. laevis* 蝌蚪进行 SRS 成像来观察髓磷脂的动态行为。他们通过对髓膜中 CH₂ 键的对称拉伸成像进行观察,发现了周围神经系统中神经胶质细胞形成髓磷脂以及髓磷脂鞘降解等的过程。2011 年,Wang 等^[64]比较了秀丽隐杆线虫的 CARS 和 SRS 成像(如图 8 所示),结果发现非脂类物质也可以发出较强的荧光信号,导致

实验结果不准确。无标记 CARS 显微成像克服了与荧光染色相关联的影响,但 CARS 信号存在与脂质无关的背景噪声,对脂质的定量分析造成了困难。与 CARS 不同的是,SRS 信号与物质浓度呈线性关系,并且没有表现出非共振背景,可以通过体内成像直接量化脂肪含量。2014 年,Wang 等^[65]利用高光谱 SRS 对指纹区域成像来区分秀丽隐杆线虫中不同的化学成分。

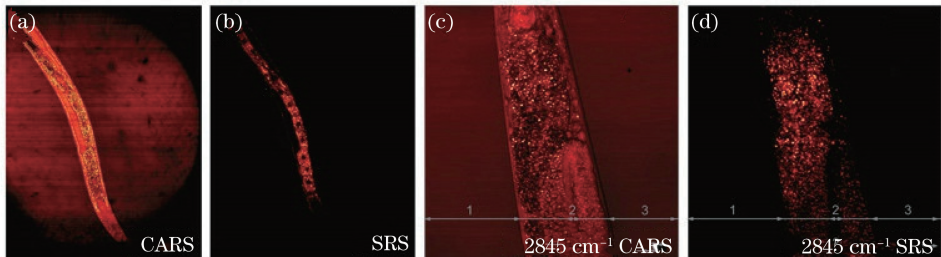


图 8 秀丽隐杆线虫的 CARS 和 SRS 成像^[64]。(a)共振背景下秀丽隐杆线虫肠细胞核的 CARS 图像;(b)秀丽隐杆线虫肠细胞中的 SRS 图像;相同位置的秀丽隐杆线虫中的 CH₂ 在 2845 cm⁻¹处的 CARS(c)和 SRS(d)放大图像
Fig. 8 CARS and SRS imaging of in *C. elegans*. (a) CARS images of *C. elegans* intestinal cells in resonance background; (b) SRS images of *C. elegans* intestinal cells; CARS (c) and SRS (d) enlarged images of *C. elegans* CH₂ at 2845 cm⁻¹ in the same location

此外,研究人员已经开发了拉曼标签,它通常具有与细胞固有拉曼信号分离的强拉曼谱带。Zhang 等^[63]利用细胞对氘代脂肪酸的摄取,对细胞内的脂质成分进行了拉曼光谱分析,氘化化合物有助于可视化细胞中的重要代谢物。Chen 等^[67]通过对碳同位素标记的细胞进行 SRS 成像研究了细胞中蛋白质的降解,他们分别用 C¹² 和 C¹³ 标记苯基丙氨酸培养 HeLa 细胞,并进行 SRS 成像,观察到了旧蛋白质的降解和新蛋白质的合成。2019 年,Li 等^[66]利用一种基于振动标签的 SRS 显微成像技术来对活体动物的脂质合成和脂质分解进行定量分析,该研究对秀丽隐杆线虫中中性脂滴的代谢动力进行了探

索,并通过对中性脂滴的 SRS 信号进行频谱分析,观察到了成年秀丽隐杆线虫中脂肪酸的去饱和作用。2019 年,Seidel 等^[68]对复杂的天然产物——抗霉素型缩酚酸肽,及其炔标记衍生物进行 SRS 成像,观察分析后认为化合物在细胞内的富集和分布是由它们的效力、特定蛋白质靶标,以及化合物的亲脂性质驱动的。

5 结束语

相干拉曼显微技术未来将在生物医学领域发挥越来越大的作用。在成像方面,虽然无标记振动成像已被广泛应用,但其检测特异性有限,而且具有相

同化学键的分子会有高度重叠的光谱,从而使得对特定分子的成像变得非常困难。为了避免这种情况,可以引入外源性化学键来实现在静默区($1800\sim 2600\text{ cm}^{-1}$)中产生较强的拉曼峰值。在生物医学应用方面,鉴于脂质在生物学中的重要性,接下来可以对脂质进行全面和系统的研究,尤其是对脂质代谢酶的功能、脂质代谢网络的相互作用,以及脂质代谢途径等进行深入研究。另外,蛋白质的结构变化也会引起显著的拉曼光谱振动,可以针对由蛋白质错误折叠引起的疾病进行深入研究。在把 CRS 推向临床使用方面,面临的最大挑战是如何用光纤激光器代替目前主要使用的固体激光器,降低系统的成本。

参 考 文 献

- [1] Deng Y Y, Ye X Q, Cao B, et al. Application of fluorescence microscopy in research of oocyte meiosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45 (5): 0507002.
邓月月, 叶贤其, 曹博, 等. 荧光显微成像用于研究卵母细胞减数分裂过程 [J]. 中国激光, 2018, 45 (5): 0507002.
- [2] Zheng S K, Yang K W, Ao J P, et al. Advances in fiber laser sources for coherent Raman scattering microscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46 (5): 0508008.
郑世凯, 杨康文, 敖建鹏, 等. 光纤式相干拉曼散射成像光源研究进展 [J]. 中国激光, 2019, 46 (5): 0508008.
- [3] Maker P D, Terhune R W. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength [J]. Physical Review, 1965, 137: 801-818.
- [4] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope [J]. Optics Letters, 1982, 7(8): 350-352.
- [5] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering [J]. Physical Review Letters, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [6] Cheng J X, Book L D, Xie X S. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. Optics Letters, 2001, 26(17): 1341-1343.
- [7] Cheng J X, Volkmer A, Book L D, et al. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2002, 106 (34): 8493-8498.
- [8] Woodbury E J, Ng W K. Ruby laser operation in near IR [J]. Proceedings of the Institute of Radio Engineers, 1962, 50(11): 2367.
- [9] Ploetz E, Laimgruber S, Berner S, et al. Femtosecond stimulated Raman microscopy [J]. Applied Physics B, 2007, 87(3): 389-393.
- [10] Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. Science, 2008, 322(5909): 1857-1861.
- [11] Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering [J]. Science, 2010, 330 (6069): 1368-1370.
- [12] Dudovich N, Oron D, Silberberg Y. Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy [J]. Nature, 2002, 418(6897): 512-514.
- [13] Bremer M T, Dantus M. Standoff explosives trace detection and imaging by selective stimulated Raman scattering [J]. Applied Physics Letters, 2013, 103 (6): 061119.
- [14] Cheng J X, Volkmer A, Book L D, et al. An ep-detected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2001, 105(7): 1277-1280.
- [15] Parekh S H, Lee Y J, Aamer K A, et al. Label-free cellular imaging by broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. Biophysical Journal, 2010, 99(8): 2695-2704.
- [16] Camp C H, Jr, Lee Y J, Heddleston J M, et al. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues [J]. Nature Photonics, 2014, 8(8): 627-634.
- [17] Rocha-Mendoza I, Langbein W, Borri P. Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion [J]. Applied Physics Letters, 2008, 93(20): 201103.
- [18] Hellerer T, Enejder A M K, Zumbusch A. Spectral focusing: high spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses [J]. Applied Physics Letters, 2004, 85(1): 25-27.
- [19] Langbein W, Rocha-Mendoza I, Borri P. Coherent anti-Stokes Raman micro-spectroscopy using spectral focusing: theory and experiment [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2009, 40(7): 800-808.
- [20] Chen B C, Sung J, Wu X X, et al. Chemical imaging and microspectroscopy with spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering [J]. Journal of Biomedical Optics, 2011, 16(2): 021112.
- [21] Masia F, Glen A, Stephens P, et al. Quantitative chemical imaging and unsupervised analysis using

- hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10820-10828.
- [22] Pegoraro A F, Ridsdale A, Moffatt D J, et al. Optimally chirped multimodal CARS microscopy based on a single Ti:sapphire oscillator[J]. *Optics Express*, 2009, 17(4): 2984-2996.
- [23] Vartiainen E M, Rinia H A, Müller M, et al. Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra [J]. *Optics Express*, 2006, 14(8): 3622-3630.
- [24] Liu Y X, Lee Y J, Cicerone M T. Broadband CARS spectral phase retrieval using a time-domain Kramers-Kronig transform[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(9): 1363-1365.
- [25] Garbacik E T, Herek J L, Otto C, et al. Rapid identification of heterogeneous mixture components with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering imaging [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2012, 43(5): 651-655.
- [26] Slipchenko M N, Oglesbee R A, Zhang D L, et al. Heterodyne detected nonlinear optical imaging in a lock-in free manner [J]. *Journal of Biophotonics*, 2012, 5(10): 801-807.
- [27] Suhaimi J L, Chung C Y, Lilledahl M B, et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2012, 102(8): 1988-1995.
- [28] Zhang D L, Wang P, Slipchenko M N, et al. Quantitative vibrational imaging by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy and multivariate curve resolution analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(1): 98-106.
- [29] Wang K, Zhang D L, Charan K, et al. Time-lens based hyperspectral stimulated Raman scattering imaging and quantitative spectral analysis[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(10): 815-820.
- [30] Wang P, Li J J, Wang P, et al. Label-free quantitative imaging of cholesterol in intact tissues by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(49): 13042-13046.
- [31] Fu D, Holtom G, Freudiger C, et al. Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering by chirped femtosecond lasers [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(16): 4634-4640.
- [32] Fu D, Zhou J, Zhu W S, et al. Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering [J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(7): 614-622.
- [33] Fu D, Lu F K, Zhang X, et al. Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(8): 3623-3626.
- [34] Lu F K, Ji M B, Fu D, et al. Multicolor stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Molecular Physics*, 2012, 110(15/16): 1927-1932.
- [35] Nan X L, Cheng J X, Xie X S. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(11): 2202-2208.
- [36] Mitra R, Chao O, Urasaki Y, et al. Detection of lipid-rich prostate circulating tumour cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 540.
- [37] Okuno M, Kano H, Fujii K, et al. Surfactant uptake dynamics in mammalian cells elucidated with quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93401.
- [38] di Napoli C, Pope I, Masia F, et al. Hyperspectral and differential CARS microscopy for quantitative chemical imaging in human adipocytes [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(5): 1378-1390.
- [39] Fu Y, Wang H F, Huff T B, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of myelin degradation reveals a calcium-dependent pathway in lyso-PtdCho-induced demyelination [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2007, 85(13): 2870-2881.
- [40] Shi Y Z, Kim S, Huff T B, et al. Effective repair of traumatically injured spinal cord by nanoscale block copolymer micelles [J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(1): 80-87.
- [41] Huff T B, Cheng J X. *In vivo* coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of sciatic nerve tissue [J]. *Journal of Microscopy*, 2007, 225(2): 175-182.
- [42] Jung Y, Ng J H, Keating C P, et al. Comprehensive evaluation of peripheral nerve regeneration in the acute healing phase using tissue clearing and optical microscopy in a rodent model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94054.
- [43] Wang H F, Fu Y, Zickmund P, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues [J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(1): 581-591.
- [44] Lim R S, Suhaimi J L, Miyazaki-Anzai S, et al. Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic mice using hyperspectral CARS imaging [J]. *Journal of Lipid Research*, 2011, 52(12): 2177-2186.
- [45] Meyer T, Chemnitz M, Baumgartl M, et al.

- Expanding multimodal microscopy by high spectral resolution coherent anti-Stokes Raman scattering imaging for clinical disease diagnostics[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14): 6703-6715.
- [46] Galli R, Uckermann O, Koch E, et al. Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(7): 071402.
- [47] Hellerer T, Axang C, Brackmann C, et al. Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(37): 14658-14663.
- [48] Yen K, Le T T, Bansal A, et al. A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12810.
- [49] Le T T, Duren H M, Slipchenko M N, et al. Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(3): 672-677.
- [50] Le T T, Huff T B, Cheng J X. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 42.
- [51] Breunig H G, Weinigel M, Bückle R, et al. Clinical coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton tomography of human skin with a femtosecond laser and photonic crystal fiber [J]. *Laser Physics Letters*, 2013, 10(2): 025604.
- [52] Zhang X, Roeffaers M B J, Basu S, et al. Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy [J]. *ChemPhysChem*, 2012, 13(4): 1054-1059.
- [53] Ji M, Orringer D A, Freudiger C W, et al. Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(201): 201ra119.
- [54] Freudiger C W, Pfannl R, Orringer D A, et al. Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging[J]. *Laboratory Investigation*, 2012, 92(10): 1492-1502.
- [55] Li J J, Condello S, Thomes-Pepin J, et al. Lipid desaturation is a metabolic marker and therapeutic target of ovarian cancer stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 303-314.
- [56] Yue S H, Li J J, Lee S Y, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI₃K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(3): 393-406.
- [57] Ji M B, Arbel M, Zhang L L, et al. Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Science Advances*, 2018, 4(11): eaat7715.
- [58] Yan S, Cui S S, Ke K, et al. Hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy unravels aberrant accumulation of saturated fat in human liver cancer [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(11): 6362-6366.
- [59] Zhang L L, Zou X, Zhang B H, et al. Label-free imaging of hemoglobin degradation and hemosiderin formation in brain tissues with femtosecond pump-probe microscopy [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4129-4140.
- [60] Zhang B H, Sun M X, Yang Y F, et al. Rapid, large-scale stimulated Raman histology with strip mosaicing and dual-phase detection [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(6): 2604-2613.
- [61] Zhang L L, Wu Y Z, Zheng B, et al. Rapid histology of laryngeal squamous cell carcinoma with deep-learning based stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Theranostics*, 2019, 9(9): 2541-2554.
- [62] Hu C R, Zhang D L, Slipchenko M N, et al. Label-free real-time imaging of myelination in the *Xenopus laevis* tadpole by *in vivo* stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(8): 086005.
- [63] Zhang D L, Slipchenko M N, Cheng J X. Highly sensitive vibrational imaging by femtosecond pulse stimulated Raman loss [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011, 2(11): 1248-1253.
- [64] Wang M C, Min W, Freudiger C W, et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(2): 135-138.
- [65] Wang P, Liu B, Zhang D L, et al. Imaging lipid metabolism in live *Caenorhabditis elegans* using fingerprint vibrations [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(44): 11787-11792.
- [66] Li X S, Li Y, Jiang M J, et al. Quantitative imaging of lipid synthesis and lipolysis dynamics in *Caenorhabditis elegans* by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2279-2287.
- [67] Chen Z X, Paley D W, Wei L, et al. Multicolor live-cell chemical imaging by isotopically edited alkyne vibrational palette [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(22): 8027-8033.
- [68] Seidel J, Miao Y P, Porterfield W, et al. Structure-activity-distribution relationship study of anti-cancer antimycin-type depsipeptides [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(63): 9379-9382.