

· 特邀综述 ·

# 二次谐波在生物医学成像中的应用

张子一<sup>1,2</sup>, 王明雪<sup>1</sup>, 刘志贺<sup>1</sup>, 房晓峰<sup>1</sup>, 吴长锋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南方科技大学生物医学工程系, 广东 深圳 518000;

<sup>2</sup>哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150000

**摘要** 二次谐波成像是近年来发展的一种新的光学成像技术, 作为生物结构检测和耐久追踪标记的新工具已经受到广泛的关注。二次谐波成像技术避免了经典荧光探针会遇到的许多固有缺点, 是一种理想的活体成像方法, 具有很好的生物医学应用前景。本文系统介绍了二次谐波原理及其成像装置, 二次谐波介质分类及特点, 二次谐波在生物医学成像中的应用, 最后对二次谐波成像未来的机遇和将要面临的挑战进行了展望。

**关键词** 非线性光学; 二次谐波; 生物医学成像; 生物组织结构; 二次谐波探针

中图分类号 O437.4

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207008

## Application of Second Harmonic Generation in Biomedical Imaging

Zhang Ziyi<sup>1,2</sup>, Wang Mingxue<sup>1</sup>, Liu Zhihe<sup>1</sup>, Fang Xiaofeng<sup>1</sup>, Wu Changfeng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Southern University of Science and Technology, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

<sup>2</sup>School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150000, China

**Abstract** Second harmonic generation (SHG) is a novel optical imaging technology that has been recently developed. SHG has attracted considerable attention as a new tool for the biological structure and durable tracking. The SHG technology eliminates many disadvantages associated with the classical fluorescent probes. It is an ideal *in vivo* imaging method and exhibits good biomedical application prospects. In this study, we introduce the principle of SHG and its imaging device, classify the SHG media, review the application of SHG in biomedical imaging, and prospect future opportunities and challenges.

**Key words** nonlinear optics; second harmonic generation; biomedical imaging; biological organizational structure; second harmonic generation probe

**OCIS codes**

## 1 引 言

在微观尺度上对生物组织进行精准成像和治疗是现代生物医学和临床医学的重大需求。近年来, 光学成像与诊断技术获得了快速的发展和长足的进步。例如共聚焦激光扫描显微镜通过点照射的方式激发组织中二维平面上的荧光标签, 已经成为生物医学成像中广泛使用的工具<sup>[1]</sup>; 超分辨光学成像方法突破了光学衍射极限, 可以获得纳米尺度的空间分辨率, 可以在活细胞内观察到亚细胞结构和生物分子的动态行为, 极大推动了细胞生物学的发

展<sup>[2-3]</sup>。然而这些技术都要使用到荧光染料、荧光纳米晶体或遗传编码的荧光蛋白, 这些荧光物质自身的性质对于光学成像产生了固有限制: 1) 染料饱和。荧光染料在给定时间内所能发出的最大光子数是有限的。只有当一个激发电子占据激发态约 5 ns 后回到基态时, 染料分子荧光再发射才会发生。2) 染料漂白。荧光染料所能发射的光子总数是有限的。当受激发的染料分子从单线态转变为三线态时, 会发生染料的化学损伤过程。该状态的染料分子与氧分子具有高度的反应性, 从而产生单线态氧(即自由基), 永久性地破坏染料, 并且成为影响细胞

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-12-05; 录用日期: 2019-12-24

基金项目: 国家自然科学基金(81771930)、深圳市科技创新委员会(KQTD20170810111314625)

\* E-mail: wucf@sustech.edu.cn

和组织光毒性的主要来源。3) 荧光闪烁。大多数荧光染料分子即使在连续光照下, 光子发射也会间歇性地“打开”和“关闭”。“关闭”期的存在限制了长期荧光成像示踪过程, 造成了标记分子不能被连续跟踪。闪烁和染料饱和极大地限制了在给定时间段内可以检测到的光子数量, 导致图像信噪比降低。此外, 荧光材料的光毒性和光漂白也限制了生物目标可被观测的时间长度<sup>[4]</sup>。

随着飞秒激光技术应用的日趋广泛, 以飞秒脉冲激光作为光源的非线性光学成像技术引起了研究者的浓厚兴趣。受到广泛关注的非线性成像方法包括: 双光子荧光(TPEF)成像、相干反斯托克斯拉曼(CARS)成像和二次谐波(SHG)成像等<sup>[4-8]</sup>。双光子及多光子荧光成像需要借助荧光探针, 但高量子效率荧光探针的发射波长主要位于可见光区, 而可见光区荧光信号仍然受到很强的组织散射和吸收<sup>[9]</sup>。在CARS成像中, 分子振动谱的拉曼信号通常比荧光信号低得多<sup>[10-11]</sup>, 使其在探测灵敏度、采集时间、激光功率等方面多受限制, 极大地影响了CARS在活体组织成像中的应用。二次谐波使用近红外区(700~1300 nm)激发光, 检测深度可达1000 μm, 光毒性小, 点激发, 因此更适用于活组织和活体动物成像。二次谐波成像是独具优势的非线性光学成像技术, 在成像原理上与双光子荧光和相干反斯托克斯拉曼有着本质的不同, 主要表现如下: 1) SHG属于二阶非线性效应, TPEF和CARS属于三阶非线性效应。在非中心对称的材料中, 二阶非线性效应远大于三阶非线性效应。2) SHG是非线性散射过程, 样品不吸收能量, 在根本上克服了光致毒和光损伤; 而在双光子成像中, 荧光分子存在严重的光漂白现象, 能量由于振动弛豫等过程而损失。3) SHG信号严格倍频, 改变泵浦波长可获得不同波长倍频信号, TPEF相对于二倍频存在红移, 发射光

谱不变。虽然成像原理不同, 但二次谐波与双光子成像系统完全兼容。因此, 通过更换滤光片可以方便地将双光子共聚焦系统改造为二次谐波成像系统。

## 2 二次谐波的原理及装置

### 2.1 二次谐波的产生过程

二次谐波, 也称倍频, 是一种非线性光学过程, 是指具有相同频率的两个光子与非线性介质相互作用后, 产生具有初始光子二倍能量的新光子(频率翻倍, 波长减半)。二次谐波是最早被发现的非线性光学现象, 这得益于激光提供了高强度相干光源。1961年 Franken等<sup>[12]</sup>在《物理评论快报》上宣布发现了二次谐波现象, 他们将波长为694 nm的红宝石激光聚焦在石英样品上, 相纸上的光谱记录显示其输出光波长为347 nm。

传统的单光子荧光发射和非线性光学双光子荧光的过程[图1(a)], 会伴随能量吸收。而二次谐波的产生过程[图1(b)], 可以描述为两个基频入射光子在非线性介质中湮灭, 同时产生一个新的倍频光子。二次谐波产生的过程并不发生能量跃迁, 两个频率为 $\omega$ 入射光子的能量等于一个频率为 $2\omega$ 发射光子的能量。根据能量守恒, 介质分子的量子力学状态并不会发生变化(分子本身的能量和动量不变), 换言之, 被激发的样品不会吸收能量。

非线性介质的光学响应可以通过电极化强度 $P$ 与入射辐射的场强 $E$ 来确定, 总的极化强度可表示为

$$P = P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots = \epsilon_0(\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots), \quad (1)$$

式中: $\epsilon_0$ 为真空介电常数, $\chi^{(n)}$ 为介质材料的 $n$ 阶极化率, 这里 $\chi^{(1)}$ 是线性极化率, $\chi^{(2)}$ 是二阶极化率, $\chi^{(3)}$ 是三阶极化率。第一项 $\epsilon_0\chi^{(1)}E$ 对应线性光学响应中光的吸收、散射和反射; 第二项 $\epsilon_0\chi^{(2)}E^2$ 反映

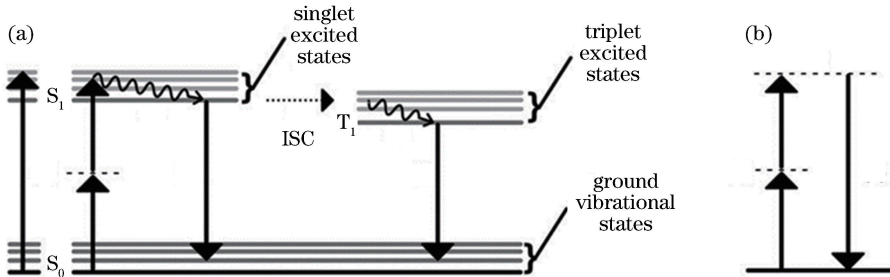


图1 单光子荧光、双光子荧光和二次谐波的原理示意图。(a)单光子荧光和双光子荧光;(b)二次谐波产生<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Principles of single-photon excited fluorescence (SPEF), TPEF and SHG. (a) Single-photon excited fluorescence, two-photon excited fluorescence; (b) second harmonic generation<sup>[4]</sup>

的是 SHG 等二阶非线性光学效应;第三项  $\epsilon_0 \chi^{(3)} E^3$  描述了双光子和三光子吸收、三次谐波、受激拉曼过程和相干反斯托克斯拉曼散射。因此二次谐波不仅与光电场的强度有关,还与介质材料的二阶极化率  $\chi^{(2)}$  有关联性。在物理学上,材料的极化率是表征光与介质间相互作用的参数,用于反映介质的折射率和空间对称性等特性,因此可以通过非线性光学现象检测介质的结构特点等信息。

### 2.2 二次谐波实验装置及成像系统

基于以上原理,研究者们将二次谐波这种非线性光学特性引入到生物成像系统中。相比于常见的可观察到的 TPEF 自发荧光,SHG 信号具有光谱更窄、强度更高且严格倍频等优势。二次谐波显微镜使用近红外区的激光对样品进行激发,长波长在生物组织中将产生更深的穿透深度。二次谐波成像需要使用飞秒激光进行双光子激发,即要求两个光子在飞秒内( $10^{-15}$  s)击中样品分子。这种激发的主要优点是能够将激发区域限制在厚样品中的微小焦点体积。物镜焦点是唯一具有足够高光子密度的空间,可以用于提高信噪比和空间分辨率。荧光显微镜,如共聚焦显微镜,虽然通过针孔过滤后仅接收焦点上的发射光,但单光子激发会使样品整个  $z$  轴都发光,从而产生较大的光毒性。

二次谐波成像的基本装置要求配备有飞秒激光器作为激发光源的扫描共聚焦显微镜。目前有许多商用的多光子共聚焦显微镜可以用于 SHG 成像,也有自主组装的 SHG 成像实验装置,这些装置一般都会使用如图 2 类似的系统<sup>[13]</sup>。最常使用的激光器是 Nd:YVO<sub>4</sub> (532 nm; 5~18 W) 泵浦 Ti:蓝宝石振荡器,调谐范围约在 700~1000 nm,平均功率为 1~2 W,脉冲宽度约为 100 fs,并通过  $\lambda/2$  和  $\lambda/4$  波片对入射光的相位进行调节。SHG 信号的收集方法可分为前向检测和后向检测两种方法,普遍被使用的是后向检测。为了避免其他波段光的影响,保证收集的信号为 SHG 信号,必须使用滤光片过滤掉干扰信号。偏振方向对于成像结果会产生影响,Chen 等<sup>[14]</sup>对比了线偏振光和圆偏振光对胶原蛋白纤维激发得到的 SHG 图像,发现圆偏振光可以均匀地激发所有方向,而线偏振光更适用于研究纤维的排列方向。

### 3 二次谐波的产生介质及其成像特点

能够产生二次谐波的非线性介质需要满足以下特点:

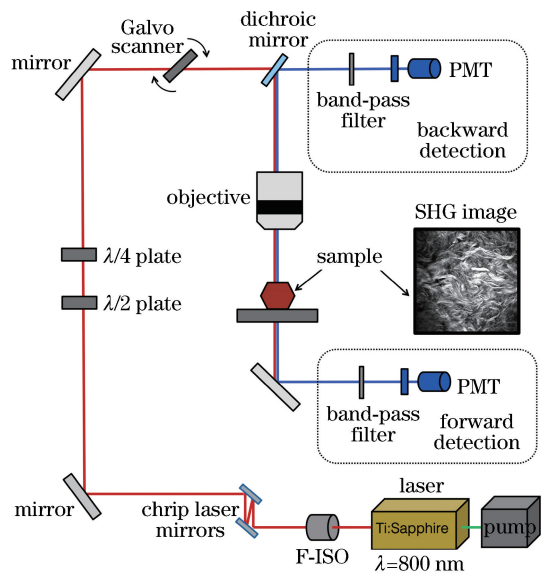


图 2 SHG 显微镜装置示意图及小鼠皮肤成像图<sup>[13]</sup>  
Fig. 2 SHG imaging schematic and example image of mouse skin<sup>[13]</sup>

1) 不具有反演对称中心。在电偶极子近似时,各向同性介质以及具有反演对称中心的样品中产生的电极化强度大小相等且方向相反,彼此之间相互抵消,故不会产生二次谐波;

2) 具有较大的二阶极化率。二次谐波的强度  $I_{\text{SHG}}$  与非线性介质的二阶极化率  $\chi^{(2)}$  的平方成正比。因此介质需具有较大的二阶极化率,才能被观测到二次谐波现象。如上条中提到的具有反演对称中心的介质,其二阶极化率为零,不会产生二次谐波;

3) 满足相位匹配条件。在相位匹配的情况下,基波与谐波间存在较强的相互耦合作用,基波功率能有效地转变为二次谐波功率,从而保证较高的 SHG 产生效率。

在生物医学成像研究中,满足以上要求且能产生二次谐波信号的介质主要分为两大类:生物材料和外源探针。生物结构蛋白通常会组装成大面积有序的且非中心对称的结构,如胶原蛋白、肌动蛋白和微管蛋白,这些结构高度极化,因而能产生 SHG 信号。在动物体中,胶原蛋白家族作为细胞外基质的主要成分,是最丰富的蛋白质种类。纤维状的胶原蛋白(I型和II型)是高度各向异性的,由胶原三螺旋重复结构紧密排列,其产生的二次谐波为研究学者提供了相关结构信息。二次谐波是偏振敏感的,对于许多 SHG 信号源的结构蛋白来说,产生的信号量与入射激光的偏振状态有关。若光平行于纤维结构( $z$  轴)偏振,则观察到的 SHG 信号最强;若垂

直于纤维结构 ( $x$  轴) 偏振, 则观察到的 SHG 信号最弱: 如图 3 所示。这一特点意味着, 可以通过测量

SHG 信号的偏振依赖性来研究组织内结构蛋白的排列取向。

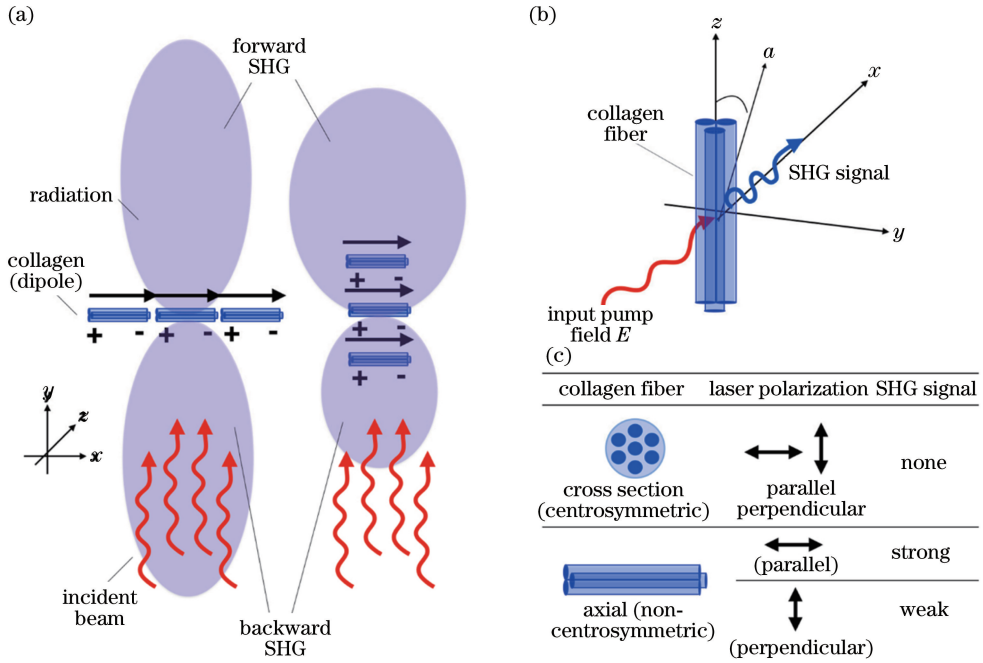


图 3 纤维状的胶原蛋白产生 SHG 信号的原理。(a)(b) 胶原纤维作为偶极子; (c) 不同偏振方向产生的 SHG 信号量<sup>[13]</sup>

Fig. 3 SHG signaling generation principle for collagen fibers. (a)(b) Collagen fibers acting as dipoles;

(c) the amount of SHG signal produced for different polarization orientations<sup>[13]</sup>

除了生命体中部分组织和结构能受激产生内源性二次谐波信号, 大多数体内组织和细胞均无法产生足够强度以供检测的二次谐波。为了增强信号, 采用一些纳米探针对细胞进行标记, 这是目前二次谐波活细胞及活体组织成像的一种通行办法。基于二次谐波产生介质的特点, 已开发了各种无机二次谐波纳米晶, 如  $\text{KNbO}_3$ 、 $\text{BaTiO}_3$  和  $\text{BiFeO}_3$  等<sup>[15-19]</sup>。无机纳米晶体的 SHG 信号光谱带宽窄, 易于辨析。除了无机材料外, 有机材料也显现出极好的二次谐波性质<sup>[20-24]</sup>。用于 SHG 成像的有机染料在设计时需要微调分子性质, 使其发色团在激发波长下具有较高的极化率。有机化合物的非线性效应是由于非局域的  $\pi$  电子受激发所致, 因此强极性的  $\pi$  共轭体系组成的分子表现出最高的二次超极化率。此外, 分子的排序也很重要, 如在生物膜上规则分子排列能增强染料的 SHG 信号强度。表 1 中列举了应用于生物医学成像研究的二次谐波探针, 及其二阶极化率  $\chi^{(2)} = \beta$  和二阶极化率最大波长  $\lambda_{\max}$ , 表中 esu 为高斯单位制, 其表示二阶极化率的单位为  $(10^7 \text{ cm}^3 \cdot \text{J}^{-1})^{1/2}$ 。

在进行生物成像时, SHG 纳米探针产生的光学信号不同于传统荧光探针<sup>[37]</sup>, 基于散射不会发生漂

白和闪烁, 并且信号不会随着照射强度的增加而饱和。从原理上来看, SHG 探针不会发生能量吸收, 避免了光毒性。由非线性光学反斯托克斯原理衍生出的上转换纳米粒 (UC nanoparticles)<sup>[38-40]</sup> 和表面增强拉曼纳米粒 (SERS nanoparticles)<sup>[41-43]</sup>, 与 SHG 纳米探针类似, 不会被漂白, 且采用近红外光激发 (表 2)。然而 SERS 纳米粒需要共振增强 (即光子的吸收能量转移) 来获得足够的信号, 这可能导致体内环境区域性光损伤<sup>[44]</sup>。而上转换纳米粒的发射光谱带较宽<sup>[45]</sup>, 不易在多标签、多模态成像中被识别。SHG 纳米探针产生的信号峰则是窄带、易于辨析的<sup>[15]</sup>, 在生物医学成像应用中有着非常好的前景。

#### 4 二次谐波在生物医学成像中的应用

人们用二次谐波显微镜观察到的第一个生物样品是由极性胶原蛋白排列且具有非中心对称结构的鼠尾肌腱<sup>[47]</sup>, 在此之后结构蛋白产生的内源二次谐波信号被广泛研究, 拓宽了组织结构信息的获取途径。为加强 SHG 在结构蛋白以外的成像, 二次谐波纳米探针被引入活细胞成像中, 其具有背景信号弱、信噪比高、光稳定性好等优点。随后发现生物膜

表 1 二次谐波生物医学成像探针

Table 1 SHG probes for biomedical imaging

SHG probe	Type of materials	$\lambda_{\max}/\text{nm}$ (solvent)	$\beta/(10^{-28} \text{ esu})$
KNbO <sub>3</sub> <sup>[15]</sup>	Inorganic nanocrystal	502	$7.2 \times 10^4$
BaTiO <sub>3</sub> <sup>[16-18]</sup>	Inorganic nanocrystal	425	$11.0 \times 10^4$
LiNbO <sub>3</sub> <sup>[25-26]</sup>	Inorganic nanocrystal	—	$4.8 \times 10^4$
ZnO <sup>[5, 15, 27]</sup>	Inorganic nanocrystal	502	$9.6 \times 10^4$
Fe(IO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>[28-29]</sup>	Inorganic nanocrystal	—	—
BiFeO <sub>3</sub> <sup>[19]</sup>	Inorganic nanocrystal	—	$1.2 \times 10^6$
DANS <sup>[30]</sup>	Organic dye	430 (CHCl <sub>3</sub> )	$7 \times 10^{-1}$
DIA <sup>[30]</sup>	Organic dye	590 (CHCl <sub>3</sub> )	1.9
RH237 <sup>[31]</sup>	Organic dye	500 (MeCN)	9.0
FM4-64 <sup>[32-33]</sup>	Organic dye	500 (MeCN)	$1.1 \times 10$
di-4-ANEPPS <sup>[34]</sup>	Organic dye	542 (CHCl <sub>3</sub> )	—
JPW1259 <sup>[34]</sup>	Organic dye	542 (CHCl <sub>3</sub> )	—
Ap3 <sup>[35]</sup>	Organic dye	—	—
B-GQD <sup>[36]</sup>	Graphene quantum dots	—	—

表 2 生物医学成像探针的特点

Table 2 Features of biomedical imaging probes

Biomedical imaging probe	No blinking	No bleaching	Non-absorptive	Deep spectrum	Narrow spectrum (<10 nm)	Genetically encoded
SHG nanoprobes <sup>[4]</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	
Fluorescent dyes <sup>[37]</sup>						
Fluorescent proteins <sup>[46]</sup>						✓
UC nanoparticles <sup>[38-40, 45]</sup>	✓	✓				
SERS nanoparticles <sup>[41-44]</sup>		✓		✓	✓	

是 SHG 活性分子形成非中心对称阵列的通用支架<sup>[48]</sup>。近十年来,大量的实验已经证明可以使用类似于双光子显微镜的仪器来获得高分辨的 SHG 图像。SHG 仅在焦点处产生,产生信号的光学过程不需要形成激发态,不会引发光毒性。同时,长波长的入射光波段赋予 SHG 成像能穿透深部组织的优势。因此,在生物样本的观察中发展出了一种不需要荧光分子激发的新的三维显微镜机制——二次谐波成像。

#### 4.1 二次谐波应用于细胞和活体成像

二次谐波过程不会对细胞产生光毒性,且信号利于长时间的成像追踪。近几年来,科学家们发展了各种非线性光学材料,并将其制备成二次谐波成像探针用于生物医学成像研究。其中 BaTiO<sub>3</sub> 探针得到广泛应用,其纳米晶体的 SHG 信号在光谱上具有带宽窄、易于辨析的特点,在体内成像时较为稳定,利于生命过程的分析。Pantazis 等<sup>[7]</sup>在斑马鱼胚胎细胞中注入 BaTiO<sub>3</sub> 纳米晶发现,在发育过程中,可以从斑马鱼组织浅表或深部细胞中检测到明亮的信号。与荧光染料 Alexa 快速漂白不同, BaTiO<sub>3</sub> 在成像过程中未显示信号下降,且其窄带的

SHG 光谱在斑马鱼的躯干中便于识别(图 4)。在纵向检测斑马鱼躯干时,不会产生内源的肌肉组织信号, BaTiO<sub>3</sub> 探针的信噪比高,几乎没有背景信号的干扰,并可设计成具有良好靶向性的纳米探针。BaTiO<sub>3</sub> 纳米晶已被证明是具有生物相容性的 SHG 探针,因此可应用于对小鼠造血干细胞的遗传谱系追踪<sup>[49]</sup>。在干细胞的体内示踪工作中,要求细胞内标记物的数量和浓度应尽量低,同时又要具有长期跟踪所需的信号强度和持久性。被 PEG 修饰的 BaTiO<sub>3</sub> 作为 SHG 成像探针,用于了解纳米颗粒的细胞摄取和细胞内命运,其二次谐波信号即使在低 pH 值下也能显示出长期的光稳定性,而对多能干细胞的增殖和分化没有明显影响。根据透射电镜分析结果,发现 BaTiO<sub>3</sub> 纳米探针相比先前报道的细胞内荧光纳米晶可以对更低浓度的标记物进行高对比度标记<sup>[50]</sup>。前面的小节已介绍过组织内特定排列的结构会产生二次谐波信号, BaTiO<sub>3</sub> 探针产生的二次谐波信号强度与其相比如何呢? Grange 等<sup>[51]</sup>给出了解答, BaTiO<sub>3</sub> 探针用于鼠尾内的二次谐波成像时,产生了比内源信号明亮的 SHG 信号,即使在产生背景噪声的内源性 SHG 信号中也能获得信噪

比为 9 的响应。

$\text{BiFeO}_3$  是另一种具有强二次谐波信号的无机盐,其标记的干细胞已被证明在近红外二区可以实现 1 mm 以上组织厚度的成像<sup>[52]</sup>。文献[53]中使用  $\text{BiFeO}_3$  进行了体内免疫细胞的追踪。将负载了  $\text{BiFeO}_3$  纳米粒的巨噬细胞应用于支气管炎小鼠,通过肺部组织切片可以看到巨噬细胞迁移到肺部,并

带有  $\text{BiFeO}_3$  纳米粒的二次谐波信号。最近, Qi 等<sup>[36]</sup>使用硼掺杂的石墨烯量子点(B-GQDs)来追踪干细胞,如图 5 所示。在皮肤成像中,B-GQDs 的 SHG 信号要明显强于胶原蛋白的内源 SHG 信号。在小鼠皮肤愈合的模型中,B-GQDs 对于干细胞的 SHG 标记时长可以长达 35 d,长于绿色荧光蛋白(GFP)14 d 的标记时长。

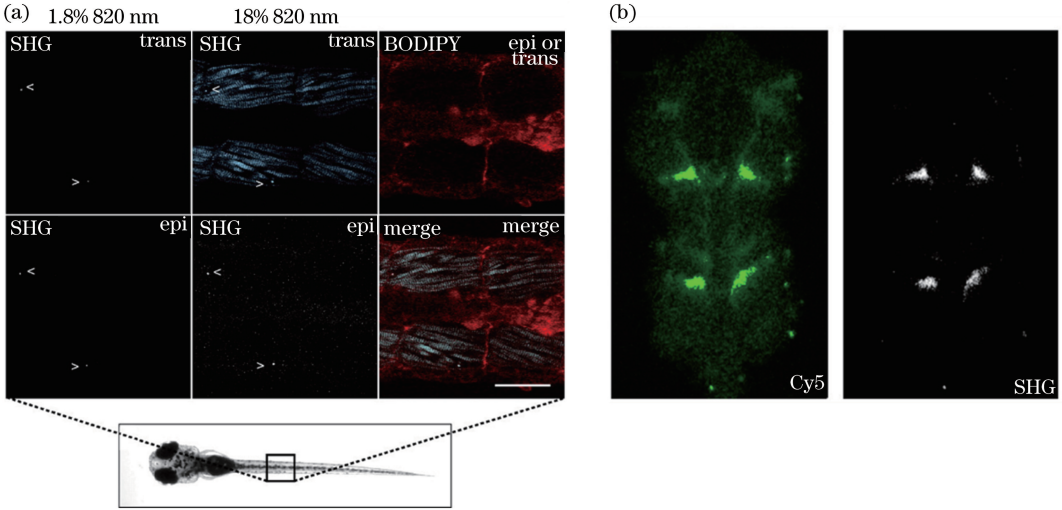


图 4 将  $\text{BaTiO}_3$  纳米晶注射到单细胞阶段的斑马鱼胚胎中,持续观测发育过程中的 SHG 成像<sup>[7]</sup>。

(a)纵向检测(epi)斑马鱼躯干,SHG 探针发出明亮、无背景噪音的信号;(b) SHG 纳米探针靶向特异性

Fig. 4  $\text{BaTiO}_3$  nanocrystals were injected into zebrafish embryos at the single-cell stage for continuous SHG imaging during development<sup>[7]</sup>. (a) SHG nanoprobe provide strong signal with superior signal-to-noise when zebrafish body is detected in epidirection; (b) SHG nanoprobe targeting specificity

SHG 纳米探针应用于干细胞示踪时具有独特优势,这源于他们具有光稳定性好和信号明亮的特点。利用一些方法对 SHG 无机纳米探针进行优化,可以使其具有更优异的性质。将 SHG 材料包覆进具有 TPEF 信号的金纳米壳中,金纳米壳形成的等离子纳米腔能提升 SHG 材料的信号强度<sup>[54]</sup>,同时这种组合使得该纳米粒具有非线性光学的双峰成像能力(TPEF、SHG)和光热效应,具备肿瘤成像和肿瘤光热治疗的一体化作用<sup>[55]</sup>。关于 Si 纳米粒的工作表明,通过调控尺寸能增强无机纳米粒的 SHG 信号<sup>[56]</sup>。SHG 信号因 Si 纳米粒表面上的中心对称性被破坏而出现,附近激光辐射的电场发生空间波动。有效二阶非线性极化率  $\chi^{(2)}$  是对纳米粒的体积进行随机取向积分,因此一定范围内较大的 Si 纳米粒产生的 SHG 信号更强。

#### 4.2 二次谐波应用于结构成像

SHG 成像已被用于研究多种组织的纤维状胶原蛋白的形态,这不仅可以帮助我们了解正常组织中胶原蛋白结构的排列,也有助于研究异常组织的

疾病状态。胶原纤维中偶极子的排列结构数据对于使用 SHG 在探测疾病状态和区分正常组织和异常组织中至关重要。Liu 等<sup>[57]</sup>对人体皮肤受伤后形成的瘢痕进行 SHG 成像,发现正常瘢痕与异常瘢痕的胶原形态结构有较大的差异。异常瘢痕通常会引发功能障碍的肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩,其组织病理学特征是组织过度沉积和胶原纤维的无序排列,这种特征可以由 SHG 成像后进行 Haar 小波变换的定量纹理分析来区分判断。SHG 成像也可以应用于眼部形态研究。角膜的主要成分是胶原蛋白,基质层中纤维状胶原蛋白的有序排列保证了角膜的通透性。圆锥角膜是指角膜扩张成圆锥形、难以治愈的眼部疾病, Mercatelli 等<sup>[58]</sup>使用 SHG 显微镜结合三维 Pearson 相关分析,测量角膜基质前部的胶原蛋白薄片的倾斜度,从而根据形态差异区分圆锥角膜和健康角膜。SHG 信号对组织结构排列变化敏感。由于二次谐波成像是一种高分辨无损层析成像方法,成像深度可达到皮下几百乃至几千微米,因此有望使用 SHG 显微镜对圆锥角膜等疾病进行早期

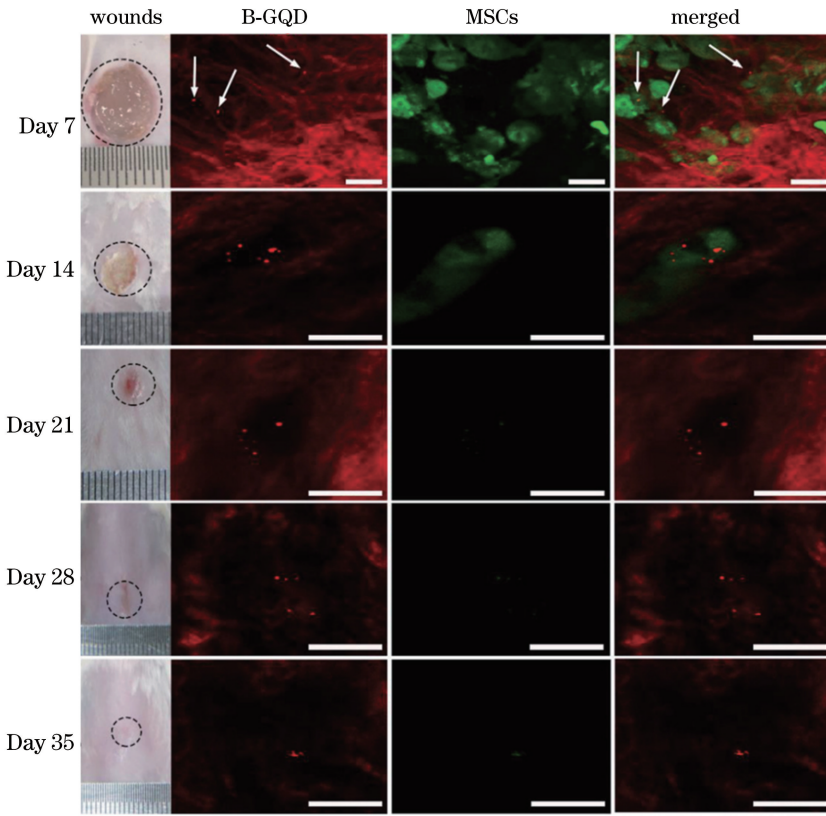


图 5 在伤口愈合过程中,追踪内含有 B-GQDs 探针的小鼠间充质干细胞(mMSCs)<sup>[36]</sup>  
 Fig. 5 Imaging and tracking mMSCs internalized with B-GQDs in wound healing *in vivo* over time<sup>[36]</sup>

筛查诊断和术后监测,以期发展为适用于体内成像的光学配置。

除了检测细胞外基质中的胶原纤维,SHG 也可检测细胞内的微管。微管是细胞骨架的重要组成部分,可为细胞形态提供结构支撑,并在有丝分裂等生命过程中起着必不可少的作用。微管的组成成分—— $\alpha\beta$ -微管蛋白二聚体,通过聚合组装形成长度为几微米的纤维状结构,能产生 SHG 信号响应。最近, Van Steenberg 等<sup>[59]</sup>通过 SHG 显微镜对微管网络的可视化结果揭示,其 SHG 信号来源于与入射激光偏振方向平行的微管结构(图 6)。轴突微管 SHG 信号强弱取决于微管的排列取向[见图 6(a)]、数量和组织结构,这与胶原蛋白的性质是类似的。在微管的非线性光学成像中,SHG 信号与其自发荧光会被同时激发,但 SHG 信号带宽较窄[见图 6(b)~(d)]。值得关注的是,在分子层面上, $\beta$ -亚基与鸟苷-5'-三磷酸(GTP)与微管蛋白的结合会使其具有更高的极化率和更规则的组织排列,从而提高微管的 SHG 信号强度。这也就解释了在细胞固定时,由于 GTP 与微管蛋白结合的二聚体结构被破坏,细胞微管网络 SHG 信号减弱。

### 4.3 二次谐波应用于生物膜成像和膜电压测量

研究者们常常使用外源的 SHG 探针作为生物膜的造影剂,来检测生物膜在生命过程中的一系列性质。这是由于染料分子在插入生物膜时,生物膜的磷脂双分子层可以诱导染料分子在液体/膜界面处有序地对齐排列,提高偶极性,从而增强探针的 SHG 信号。被用作生物膜探针的分子普遍具有以下特点:拓扑结构和分子长度与插入脂质膜相当;分子一端亲水,另一端疏水,具有两亲性。使用光学探针测量神经元的膜电位比电极方法能提供更多位置的信号,FM4-64 是一种两亲性染料,常被用于神经元膜电位测量。利用线扫描模式可以获得用 SHG 快速检测神经元膜电位的瞬态时间分辨率,SHG 信号的时间记录与电极膜电位测量值基本一致。图 7 显示了沿神经元轴突不同位置的动作电位光学记录,其中一些轴突与激发位点的距离大于  $350 \mu\text{m}$ <sup>[60]</sup>。

然而有关 FM4-64 的实验测试表明,神经元动作电位的 SHG 成像中最大的问题是伴随有 TPEF 光毒性对神经元带来的细胞损伤<sup>[32]</sup>。为了避免由发色团的 TPEF 带来光毒性, Nuriya 等<sup>[35]</sup>在 SHG 染料 FM4-64 的基础上,通过引入偶氮基团来替换

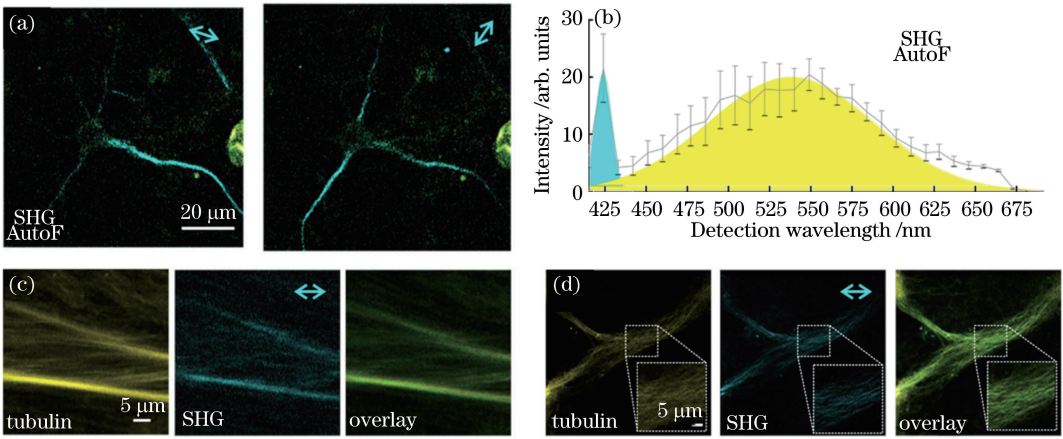


图 6 SHG 显微镜对微管网络的可视化结果。(a)微管 SHG 信号强度对激光偏振方向敏感；  
(b) SHG 信号为窄峰；(c)(d) SHG 信号来源于微管极化结构<sup>[59]</sup>

Fig. 6 Visualization results of microtubule network by SHG microscope. (a) SHG signal intensity of microtubule is sensitive to laser polarization; (b) SHG signal is narrow peak; (c)(d) SHG signal comes from microtubule polarization structure<sup>[59]</sup>

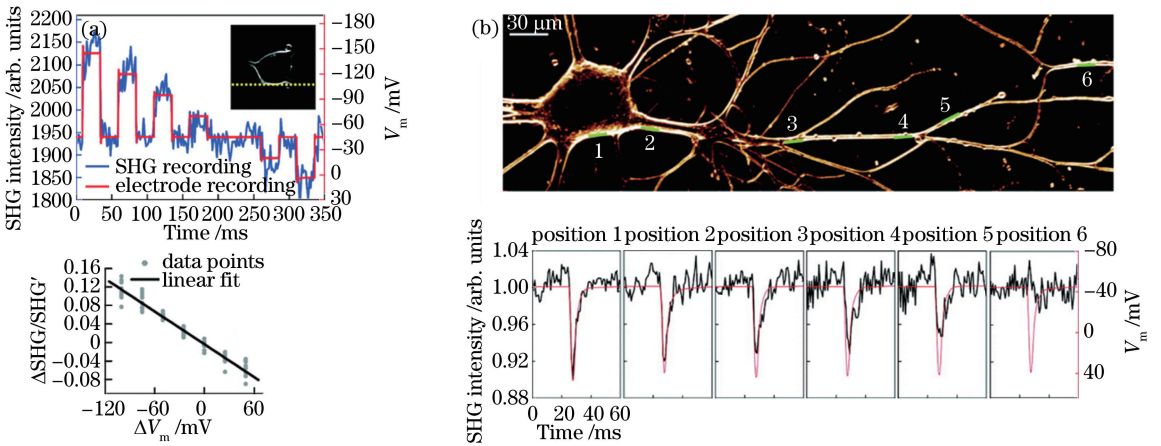


图 7 动作电位的 SHG 记录。(a)用 SHG 测体外培养神经元膜电位的线性扫描记录；  
(b)沿神经元轴突动作电位的 SHG 记录<sup>[60]</sup>

Fig. 7 SHG recording of action potentials. (a) Line-scan recording of membrane potential with SHG in cultured neurons; (b) SHG recording of action potentials along neuron neurite<sup>[60]</sup>

原有的荧光发色团(如图 8),实现了快速非辐射失活,得到非荧光有机分子 Ap3。当 Ap3 染料分子吸附到细胞膜上时,只会产生 SHG 信号,而不会被激发出 TPEF 信号,不会对被研究的神经元产生光损伤。因此 Ap3 染料分子具有特异性和更好的光稳定性,可被应用于神经元细胞的二次谐波成像以及脑切片神经元钙浓度动态的多模态双光子成像。二次谐波探针已成为用于神经科学研究的有效光学工具,并具有很高的应用价值。

同时,利用 SHG 染料在膜表面排布时的信号响应性质,可以研究生命个体对于小分子的吸收、渗透和积累的动力学过程。Gayen 等<sup>[61]</sup>利用 SHG 染料孔雀石绿对于表面和界面的敏感性,来分析分子跨膜的运输信息,评估了外部环境 pH 值对于抗菌

小分子穿过革兰氏阴性大肠杆菌细胞包膜的影响。所采用的方法相对便捷,直接将孔雀石绿溶液滴入大肠杆菌培养液中。由于分散在液体中染料分子取向为各向同性,故不会在细菌培养液中检测到 SHG 信号。当染料分子吸附在大肠杆菌细胞包膜表面上且呈平行排列时,则会产生 SHG 信号峰。由于革兰氏阴性细菌细胞包膜中有两个膜,穿过细胞包膜的 SHG 染料分子在 SHG 时间轨迹中会产生两个峰。

用于生物医学成像的理想 SHG 标记,应该是明亮、生物相容、稳定,且抗光漂白的。相较于已被大量报道的无机材料,有机材料具有更好的生物相容性、靶向标记能力和体内代谢特性,更能符合生物医学研究和临床应用的要求。然而有机 SHG 染料在谐波产生过程中往往不可避免地伴随着 TPEF



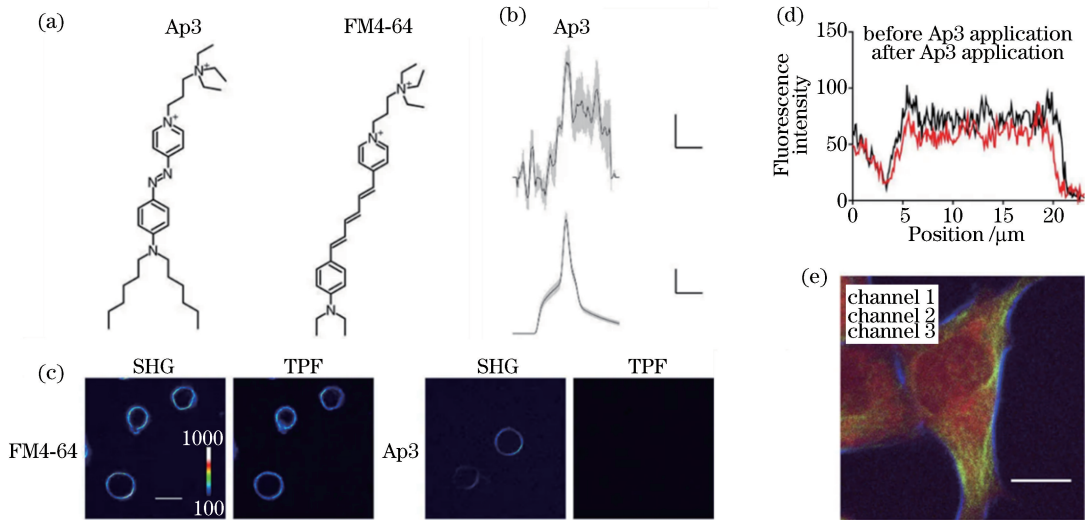


图 8 使用二次谐波特异性染料的多模态双光子成像。(a)染料 Ap3 和 FM4-64 的化学结构;(b)神经元动作电位的 SHG 信号;(c) FM4-64 和 Ap3 标记 CHO 细胞的 SHG 和 TPF 信号;(d) (e) 细胞结构的多模态双光子成像;(d) 使用 FM4-64 前后 TPF 信号的强度分布;(e)使用 FM4-64 的合并图像<sup>[35]</sup>

Fig. 8 Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye. (a) Chemical structures of Ap3 and FM4-64; (b) SHG signal changes on action potential in neurons; (c) SHG and TPF signals obtained from cultured CHO cells loaded with FM4-64 and Ap3; (d) (e) multimodal two-photon imaging of cellular structures; (d) intensity profiles of TPF signals before and after the application of FM4-64; (e) merged images after the application of FM4-64<sup>[35]</sup>

的发射,这种荧光发射产生的单线态氧对组织产生光损伤,因此通过使用抗氧化剂、淬灭双光子激发态、改变供体-受体对、发色团修饰等方法<sup>[62-63]</sup>来开发新型有机 SHG 染料仍是一个亟待解决的问题。

除了在上述生物医学成像领域的应用外,二次谐波也被应用于癌症等疾病的治疗。在近红外光激发下,胶原蛋白原位产生二次谐波<sup>[64]</sup>,或使用外源探针  $ZnO$ 、 $[Zn(tpatpy)Cl_2 \cdot H_2O]_n$ 、 $ZnFe_2O_4$ <sup>[65-67]</sup>产生二次谐波,以激发光敏剂,敏化产生单线态氧实现了光动力治疗。使用近红外光源激发,通过二次谐波过程,产生了对应于光敏剂吸收峰的倍频波长,相较传统的光动力治疗方法,具有更大的组织穿透深度。另外,由 I 型胶原蛋白<sup>[68]</sup>产生的二次谐波可将近红外的光源转换为紫外光,实现紫外线敏感的光裂解,进行药物释放。由于胶原蛋白产生的 SHG 信号既不依赖于特定的激发波长,也不依赖于特定基团的吸收截面,因此在可发射的波长及可用于触发药物释放的基团方面展现了极大的灵活性。更适用于生物医学研究的二次谐波介质仍有待发掘,通过借助二次谐波的性质,克服诊疗中的主要障碍,有望研发出新型非线性光学诊断和光学治疗方法。

## 5 结 论

早在 20 世纪 30 年代,非线性光学就被科学家

们在理论上预言。在 1960 年激光发明之后,二次谐波现象首次通过实验被观察到,拉开了非线性光学实验研究的序幕,同时宣告了现代光学的诞生。作为一项可以在活体生物组织深部产生高分辨图像的技术和产生功能动态成像的新工具,二次谐波成像在生物医学领域的优势已经十分明显,得到研究者们广泛关注。二次谐波成像具有非线性光学成像的空间分辨率高、组织穿透深等诸多优点,可避免荧光成像中由于能量吸收而引发的光漂白和光毒性的问题。但二次谐波成像在生物医学和临床诊断中的应用仍然受很大的制约。最主要原因是,它要求生物组织或探针材料的二阶非线性光学系数不为零,即只有非中心对称介质才能产生二次谐波。生命体中部分组织和结构可以产生二次谐波,但生物组织的原发谐波信号主要来源于胶原蛋白,除了与结构信息相关的疾病成像诊断外,很难获得广泛的疾病成像诊断的方法。为了解决这个问题,二次谐波纳米探针受到国内外研究者的关注。二次谐波的物理特性为二次谐波纳米探针在活细胞成像和组织的分子成像提供了独特的优势,使其具有高灵敏度和高时间分辨率。近年来,科学家开发了各种无机非线性光学材料,作为二次谐波的成像探针,可将其应用于生物医学成像研究。然而无机纳米晶的生物相容

性、靶向标记能力和体内代谢特性等,目前还无法满足生物医学研究和临床应用的要求。相较于无机纳米晶,有机非线性光学材料具有强极性的电子共轭体系,比无机材料中的离子键更容易发生极化,因此有机染料有望发展为更适用于生物医学应用的探针。但目前如何降低有机染料 TPEF 信号,并提升其 SHG 信号,仍然存在诸多困难与挑战。开发新型的二次谐波探针,发展二次谐波成像并推动其在生物医学上的应用,对于生物医学成像领域具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, et al. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1995, 104(6): 946-952.
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [3] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [4] Dempsey W P, Fraser S E, Pantazis P. SHG nanoprobe: advancing harmonic imaging in biology [J]. *BioEssays*, 2012, 34(5): 351-360.
- [5] Staedler D, Magouroux T, Hadji R, et al. Harmonic nanocrystals for biolabeling: a survey of optical properties and biocompatibility [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2542-2549.
- [6] Sun C L, Li J, Wang X Z, et al. Rational design of organic probes for turn-on two-photon excited fluorescence imaging and photodynamic therapy[J]. *Chem*, 2019, 5(3): 600-616.
- [7] Pantazis P, Maloney J, Wu D, et al. Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for *in vivo* imaging[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14535-14540.
- [8] Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [9] Croissant J G, Zink J I, Raehm L, et al. Two-photon-excited silica and organosilica nanoparticles for spatiotemporal cancer treatment [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(7): 1701248.
- [10] Evans C L, Xie X S. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine [J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2008, 1(1): 883-909.
- [11] 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.
- [12] Franken P A, Hill A E, Peters C W, et al. Generation of optical harmonics[J]. *Physical Review Letters*, 1961, 7(4): 118.
- [13] Mostaço-Guidolin L, Rosin N, Hackett T L. Imaging collagen in scar tissue: developments in second harmonic generation microscopy for biomedical applications [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1772.
- [14] Chen X Y, Nadiarynkh O, Plotnikov S, et al. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure [J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(4): 654-669.
- [15] Nakayama Y, Pauzauskis P J, Radenovic A, et al. Tunable nanowire nonlinear optical probe [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1098-1101.
- [16] Ma C R, Yan J H, Wei Y M, et al. Enhanced second harmonic generation in individual Barium titanate nanoparticles driven by Mie resonances[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2017, 5(19): 4810-4819.
- [17] Hsieh C L, Grange R, Pu Y, et al. Three-dimensional harmonic holographic microscopy using nanoparticles as probes for cell imaging [J]. *Optics Express*, 2009, 17(4): 2880.
- [18] Kim E, Steinbrück A, Buscaglia M T, et al. Second-harmonic generation of single BaTiO<sub>3</sub> nanoparticles down to 22 nm diameter [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(6): 5343-5349.
- [19] Schwung S, Rogov A, Clarke G, et al. Nonlinear optical and magnetic properties of BiFeO<sub>3</sub> harmonic nanoparticles[J]. *Journal of Applied Physics*, 2014, 116(11): 114306.
- [20] Duan Y L, Ju C G, Yang G, et al. Aggregation induced enhancement of linear and nonlinear optical emission from a hexaphenylene derivative [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(48): 8968-8977.
- [21] Chervy T, Xu J L, Duan Y L, et al. High-efficiency second-harmonic generation from hybrid light-matter states[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(12): 7352-7356.
- [22] Long N J. Organometallic compounds for nonlinear optics: the search for en-light-enment! [J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995, 34(1): 21-38.
- [23] Verbiest T, Houbrechts S, Kauranen M, et al. Second-order nonlinear optical materials: recent advances in chromophore design [J]. *Journal of*

- Materials Chemistry, 1997, 7(11): 2175-2189.
- [24] Xu J L, Semin S, Niedzialek D, et al. Self-assembled organic microfibers for nonlinear optics[J]. Advanced Materials, 2013, 25(14): 2084-2089.
- [25] Li J H, Qiu J C, Guo W B, et al. Cellular internalization of LiNbO<sub>3</sub> nanocrystals for second harmonic imaging and the effects on stem cell differentiation[J]. Nanoscale, 2016, 8(14): 7416-7422.
- [26] Knabe B, Buse K, Assenmacher W, et al. Spontaneous polarization in ultrasmall lithium niobate nanocrystals revealed by second harmonic generation [J]. Physical Review B, 2012, 86(19): 195428.
- [27] Kachynski A V, Kuzmin A N, Nyk M, et al. Zinc oxide nanocrystals for nonresonant nonlinear optical microscopy in biology and medicine[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112(29): 10721-10724.
- [28] Bonacina L, Mugnier Y, Courvoisier F, et al. Polar Fe(IO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> nanocrystals as local probes for nonlinear microscopy[J]. Applied Physics B, 2007, 87(3): 399-403.
- [29] Ladj R, El Kass M, Mugnier Y, et al. SHG active Fe(IO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> particles: from spherical nanocrystals to urchin-like microstructures through the additive-mediated microemulsion route[J]. Crystal Growth & Design, 2012, 12(11): 5387-5395.
- [30] Marder S R, Beratan D N, Cheng L T. Approaches for optimizing the first electronic hyperpolarizability of conjugated organic molecules[J]. Science, 1991, 252(5002): 103-106.
- [31] Grinvald A, Hildesheim R, Farber I C, et al. Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential[J]. Biophysical Journal, 1982, 39(3): 301-308.
- [32] Dombeck D A, Sacconi L, Blanchard-Desce M, et al. Optical recording of fast neuronal membrane potential transients in acute mammalian brain slices by second-harmonic generation microscopy [J]. Journal of Neurophysiology, 2005, 94(5): 3628-3636.
- [33] Jiang, Eisenthal K B, Yuste R. Second harmonic generation in neurons: electro-optic mechanism of membrane potential sensitivity [J]. Biophysical Journal, 2007, 93(5): L26-L28.
- [34] Millard A C, Jin L, Wei M D, et al. Sensitivity of second harmonic generation from styryl dyes to transmembrane potential [J]. Biophysical Journal, 2004, 86(2): 1169-1176.
- [35] Nuriya M, Fukushima S, Momotake A, et al. Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye [J]. Nature Communications, 2016, 7: 11557.
- [36] Qi X Y, Liu H P, Guo W J, et al. New opportunities: second harmonic generation of boron-doped graphene quantum dots for stem cells imaging and ultraprecise tracking in wound healing [J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(37): 1902235.
- [37] Burnette D T, Sengupta P, Dai Y, et al. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(52): 21081-21086.
- [38] Salthouse C, Hildebrand S, Weissleder R, et al. Design and demonstration of a small-animal upconversion imager[J]. Optics Express, 2008, 16(26): 21731-21737.
- [39] Corstjens P, Li S, Zuiderwijk M, et al. Infrared up-converting phosphors for bioassays [C] // IEE Proceedings-Nanobiotechnology. IET Digital Library, 2005, 152(2): 64-72.
- [40] Sivakumar S, Diamente P R, van Veggel F C. Silica-coated Ln<sup>3+</sup>-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles as robust down- and upconverting biolabels[J]. Chemistry: A European Journal, 2006, 12(22): 5878-5884.
- [41] Qian X M, Peng X H, Ansari D O, et al. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(1): 83-90.
- [42] Zavaleta C L, Smith B R, Walton I, et al. Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(32): 13511-13516.
- [43] Nie S. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. Science, 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [44] Michaels A M, Nirmal M, Brus L E. Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals [J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(43): 9932-9939.
- [45] Wu S, Han G, Milliron D J, et al. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(27): 10917-10921.
- [46] Shaner N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins [J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 905-909.

- [47] Freund I, Deutsch M. Second-harmonic microscopy of biological tissue[J]. *Optics Letters*, 1986, 11(2): 94-96.
- [48] Huang J Y, Lewis A, Loew L. Nonlinear optical properties of potential sensitive styryl dyes [J]. *Biophysical Journal*, 1988, 53(5): 665-670.
- [49] Sugiyama N, Sonay A Y, Tussiwand R, et al. Effective labeling of primary somatic stem cells with BaTiO<sub>3</sub> nanocrystals for second harmonic generation imaging[J]. *Small*, 2018, 14(8): 1870036.
- [50] Betzer O, Meir R, Dreifuss T, et al. *In-vitro* optimization of nanoparticle-cell labeling protocols for *in-vivo* cell tracking applications [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15400.
- [51] Grange R, Lanvin T, Hsieh C L, et al. Imaging with second-harmonic radiation probes in living tissue[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(9): 2532-2539.
- [52] Dubreil L, Leroux I, Ledevin M, et al. Multi-harmonic imaging in the second near-infrared window of nanoparticle-labeled stem cells as a monitoring tool in tissue depth[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 6672-6681.
- [53] Ramos-Gomes F, Möbius W, Bonacina L, et al. Bismuth ferrite second harmonic nanoparticles for pulmonary macrophage tracking[J]. *Small*, 2019, 15(4): 1803776.
- [54] Pu Y, Grange R, Hsieh C L, et al. Nonlinear optical properties of core-shell nanocavities for enhanced second-harmonic generation [J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(20): 207402.
- [55] Wang Y F, Barhomi A, Tong R, et al. BaTiO<sub>3</sub>-core Au-shell nanoparticles for photothermal therapy and bimodal imaging[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 72: 287-294.
- [56] Kharin A Y, Lysenko V V, Rogov A, et al. Bimodal nonlinear optical contrast from Si nanoparticles for cancer theranostics [J]. *Advanced Optical Materials*, 2019: 1801728.
- [57] Liu Y, Zhu X Q, Huang Z F, et al. Texture analysis of collagen second-harmonic generation images based on local difference local binary pattern and wavelets differentiates human skin abnormal scars from normal scars[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(1): 016021.
- [58] Mercatelli R, Ratto F, Rossi F, et al. Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(1): 75-83.
- [59] Van Steenberghe V, Boesmans W, Li Z, et al. Molecular understanding of label-free second harmonic imaging of microtubules [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3530.
- [60] Sacconi L, Dombeck D A, Webb W W. Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: Real-time optical recording of neuronal action potentials [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(9): 3124-3129.
- [61] Gayen A, Kumar D, Matheshwaran S, et al. Unveiling the modulating role of extracellular pH in permeation and accumulation of small molecules in subcellular compartments of gram-negative *escherichia coli* using nonlinear spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(12): 7662-7671.
- [62] Reeve J E, Anderson H L, Clays K. Dyes for biological second harmonic generation imaging [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, 12(41): 13484-13498.
- [63] Campagnola P J, Loew L M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1356-1360.
- [64] Kachynski A V, Pliss A, Kuzmin A N, et al. Photodynamic therapy by *in situ* nonlinear photon conversion[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(6): 455-461.
- [65] Bi H T, Dai Y L, Yang P P, et al. Glutathione mediated size-tunable UCNPs-Pt (IV)-ZnFe<sub>2</sub> O<sub>4</sub> nanocomposite for multiple bioimaging guided synergetic therapy [J]. *Small*, 2018, 14(13): 1703809.
- [66] Gu B B, Pliss A, Kuzmin A N, et al. *In-situ* second harmonic generation by cancer cell targeting ZnO nanocrystals to effect photodynamic action in subcellular space [J]. *Biomaterials*, 2016, 104: 78-86.
- [67] Zhou X Y, Chen Y, Su J, et al. *In situ* second-harmonic generation mediated photodynamic therapy by micelles co-encapsulating coordination nanoparticle and photosensitizer [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(82): 52125-52132.
- [68] Barhomi A, Salvador-Culla B, Kohane D S. NIR-triggered drug delivery by collagen-mediated second harmonic generation [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(8): 1159-1163.