

·特邀论文·

# 受激拉曼散射显微技术用于快速无标记病理成像

张博涵<sup>1</sup>, 郭莉<sup>1</sup>, 姚冽<sup>2</sup>, 邹翔<sup>2</sup>, 季敏标<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>复旦大学物理学系, 表面物理国家重点实验室, 上海 200433;

<sup>2</sup>复旦大学附属华山医院神经外科, 上海 200433

**摘要** 对病变组织进行快速成像以获取足够的诊断信息, 可以帮助医生在术中做出重要决策。受激拉曼散射显微技术是一种新兴的无标记成像技术, 利用生物分子自身的光散射性质, 在不需要对组织进行任何处理的情况下即可获取类似于传统病理的成像结果。越来越多的研究表明受激拉曼散射显微技术作为一种“虚拟组织成像”工具, 可以迅速区分病变与正常组织。这篇综述主要阐述了受激拉曼散射显微成像的基本原理、发展现状及其在组织成像上的应用。

**关键词** 生物医学; 受激拉曼散射; 生物医学成像; 组织学; 无标记诊断

**中图分类号** O437.3

**文献标志码** A

**doi:** 10.3788/CJL202047.0207018

## Rapid Histological Imaging Using Stimulated Raman Scattering Microscopy

Zhang Bohan<sup>1</sup>, Guo Li<sup>1</sup>, Yao Lie<sup>2</sup>, Zou Xiang<sup>2</sup>, Ji Minbiao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Surface Physics and Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China;

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract** Rapid histological imaging of pathological tissues with sufficient diagnostic information has great potential to aid doctors in intraoperative decision making. Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy is an emerging label-free imaging modality capable of obtaining histological images of tissues without the need for time-consuming tissue processing, such as fixing, sectioning, and staining. An increasing number of studies have demonstrated SRS microscopy as a “virtual histology” tool for rapid diagnosis of various diseases. In this review, we focus on the basic principles and current developments of SRS microscopy as well as its applications for rapid tissue histology.

**Key words** biotechnology; stimulated Raman scattering; biomedical imaging; histology; label-free diagnosis

**OCIS codes** 170.1610; 170.3880; 180.5650

## 1 引言

苏木精和伊红(H&E)染色是用作临床诊断的标准的组织病理学方法<sup>[1]</sup>。伊红将蛋白质和细胞质染色成明亮的粉红色, 而苏木精则将碱性结构(如DNA)染色为蓝紫色。然而, H&E染色是一个很缓慢的过程, 需要经过活检、固定、切片和染色处理, 通常需要几天时间, 因此不能用于术中诊断。术中冷冻技术仍耗时较长, 至少需要 30 min。因此, 快速准确的成像方法对于术中诊断是非常必要的, 而且对于切缘的判定和手术决策的制定也至关重要。

通过一系列技术来检测疾病状态的研究已得到了快速发展。非侵入性式的成像方法有计算机断层扫描(CT)、核磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)<sup>[2]</sup>, 但它们在很大程度上都会受到低空间分辨率和术中兼容性的限制。术中核磁共振成像可在术中提供更新的图像, 表明这种技术具有很大的潜力, 但由于高成本和延长手术时间而受到了限制<sup>[3]</sup>。超声(US)和光学相干断层扫描(OCT)已被证明能够实时提供结构信息, 但它们只能在大范围内使用, 很难得到亚细胞分辨率的高清组织结构信息<sup>[4]</sup>, 且缺乏分子特异性<sup>[5]</sup>。

**收稿日期:** 2019-10-10; **修回日期:** 2019-11-13; **录用日期:** 2019-11-26

**基金项目:** 国家自然科学基金(8171725, 61975033)、上海市科技重大专项(2017SHZDZX01)、上海市卫生计生委智慧医疗专项(2018ZHYYL0204)

\* **E-mail:** minbiaoj@fudan.edu.cn

近年来,采用分子标记的荧光成像取得了重要突破,提升了术中探测的灵敏度,例如在脑瘤成像中有望揭示脑瘤的边缘,但目前还受到一定的限制<sup>[6-8]</sup>:首先,只有部分癌细胞吸收了荧光分子<sup>[8]</sup>;其次,染料具有非特异性标记的缺点;再者,荧光素在激光照射下往往会发生荧光漂白。共焦显微镜已被应用于对荧光标记的组织进行术中成像,但它也有类似荧光成像的局限性<sup>[6]</sup>。各种非线性光学成像技术也被用于组织成像,如二次谐波(SHG)和三次谐波显微技术(THG)。其中:二次谐波显微技术可以选择性地对具有非中心反演对称的结构(如胶原纤维和微管)进行成像<sup>[9]</sup>;三次谐波显微技术对折射率的不均匀性敏感,但不能提供足够的分子信息<sup>[10]</sup>。

振动光谱成像为病理组织的特异性成像提供了一种新方法。分子的指纹振动光谱可以通过红外光谱或拉曼光谱进行记录<sup>[11-13]</sup>。但是生物组织的自发拉曼成像会受到弱信号强度和慢成像速度的限制,难以直接用于生物医学成像。表面增强的拉曼散射(SERS)方法虽然具有明显增强拉曼信号的优点,但需要借助纳米粒子等进行外源标记<sup>[14]</sup>。受激拉曼散射(SRS)显微成像技术凭借其独特的化学键特异性成像功能已在生物医学领域得到了广泛应用,包括无标记的DNA成像<sup>[15]</sup>、药物分子追踪<sup>[16-18]</sup>、肿瘤

检测<sup>[19-21]</sup>、脂质定量分析<sup>[22-23]</sup>、分子代谢及生物酶的作用机制等<sup>[24-26]</sup>。与荧光成像相比,受激拉曼散射成像技术的一大优势是不需要任何的标记物来帮助其完成成像,并具有高灵敏度、分子选择性和高分辨率等优点。受激拉曼散射显微成像技术以其无标记成像的特点克服了标记成像技术带来的潜在问题,如非特异性标记、毒性和影响受标记的生物过程等<sup>[27]</sup>。

## 2 受激拉曼散射显微成像的基本原理

### 2.1 受激拉曼散射原理

受激拉曼散射是非线性拉曼散射,通过探测分子的特定振动模式来实现成像。受激拉曼散射采用的是两束满足拉曼共振条件的激光,即泵浦光和斯托克斯光,它们的频率差等于分子的振动频率<sup>[28]</sup>。在非线性拉曼散射过程中,一个泵浦光子将转化为一个斯托克斯光子,泵浦光强的损耗称为受激拉曼损耗(SRL),而斯托克斯光强的增加称为受激拉曼增益(SRG)。在现有的实验室中,这两种受激拉曼信号都可以被精确地探测到,如图1所示。图1中,PD表示光电二极管,EOM表示电光调制器,FL表示滤光片,ref表示参考信号,in表示输入信号,out表示输出信号。

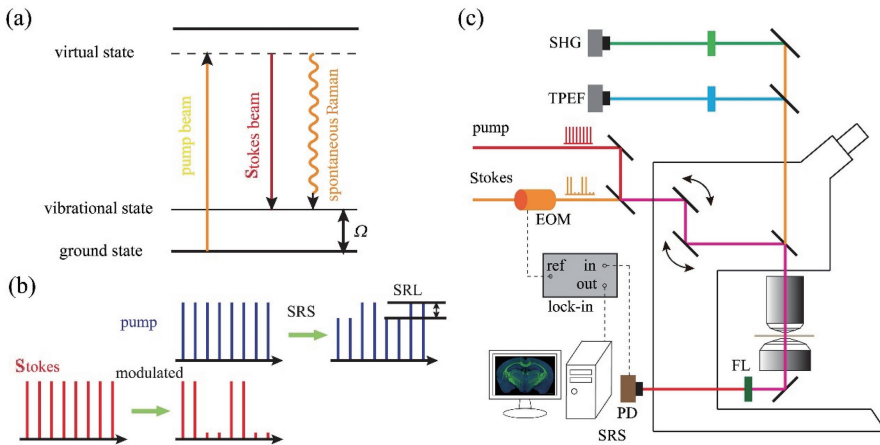


图1 受激拉曼散射显微技术的原理和实现方案示意图。(a)受激拉曼散射与自发拉曼散能级示意图;

(b)受激拉曼损耗的探测机制;(c)受激拉曼散射实验系统示意图

Fig. 1 Scheme and principle of SRS. (a) Energy diagram of SRS and spontaneous Raman;

(b) SRL detection scheme; (c) system design of SRS microscope

受激拉曼散射光谱成像技术是拉曼散射光谱技术、受激辐射技术以及激光扫描共聚焦显微成像技术的有机结合,其信号强度与被测物浓度成线性正比关系,因此受激拉曼散射显微成像可以反映化学物质的浓度情况。图1(b)描述的是受激拉曼损耗

探测模式,即探测到受激拉曼损耗的物理机制;图1(c)为一般实验室实现受激拉曼散射显微技术的系统示意图。首先,泵浦光把电子激发到一个虚的能态,斯托克斯光诱导处于高能态的电子回到振动能级,同时发出一个波长与之相同的光子。最终结果

是泵浦光的强度受到削弱(同时斯托克斯光强得到增强),可以根据这个光强变化来解析得到受激拉曼散射信号的强度。泵浦光与斯托克斯光的频率差决定了被探测的拉曼频率。为了获得受激拉曼散射信号的强度,采用“调制-解调”的方法来检测斯托克斯光的减少量。具体做法如下:将斯托克斯光按照特定频率进行调制后与泵浦光合并,一起导入带有扫描单元的显微镜上;当斯托克斯光为“1”时,一部分泵浦光转化为斯托克斯光,于是泵浦光自身就会受到削弱;当斯托克斯光为“0”时,泵浦光和斯托克斯光各自保持原来的强度。如此一来,泵浦光的强度就会出现特定频率的强弱变化。采用显微镜内部的振镜进行扫描就可得出二维受激拉曼散射显微图像,泵浦光和斯托克斯光在样品处发生受激拉曼散射后,产生的受激拉曼损耗信号经过滤光片滤掉斯托克斯光的成分,而后进入光电二极管形成光电流,然后传输至锁相放大器进行解调。锁相放大器对受激拉曼损耗解调后可得到受激拉曼散射信号,然后就可以成像。一般情况下,在实验室的显微镜内部,可以同时通过光电倍增管进行二次谐波(SHG)和双光子荧光(TPEF)成像,这样可以实现多模态成像功能。

图2所示为酒精中视黄醇的自发拉曼光谱、受激拉曼损耗光谱与相干反斯托克斯拉曼散射光谱(CARS),通过探测受激拉曼散射损耗可以得到受激拉曼光谱。受激拉曼散射光谱与自发拉曼光谱具有很强的相似性,而由于非共振背景信号的存在,相干反斯托克斯拉曼散射光谱相对于自发拉曼光谱有一个畸变,不能准确反映自发拉曼光谱的光谱信息<sup>[29]</sup>。受激拉曼散射与自发拉曼散射的区别在于,它需要两束激光(泵浦光和斯托克斯光)同时作用在样品上,并且只能针对自发拉曼光谱中某一个拉曼峰进行探测,由于受激辐射过程的存在,信号强度有了极大的提升( $10^3$ 到 $10^5$ 倍)。

## 2.2 高光谱受激拉曼成像系统

在逐帧扫描的显微成像方案中,基于光谱聚焦方法的高光谱受激拉曼成像技术是一种易于实现、价格低廉的方案,近年来得到了广泛应用。与传统的采用窄带皮秒激光不同的是,高光谱成像系统的光源采用宽带的飞秒脉冲激光,并且在光路中引入了啁啾装置和光学延迟线,目的是实现光谱聚焦。较早问世的高光谱成像技术比较复杂,使用基于光栅的激光脉冲整形装置或者光子晶体纤维来实现光谱聚焦。2013年,哈佛大学的研究人员提出了一种

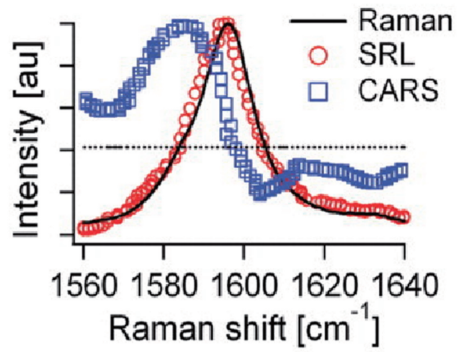


图2 酒精中视黄醇的受激拉曼损耗光谱、自发拉曼光谱和相干反斯托克斯拉曼光谱<sup>[28]</sup>

Fig. 2 Stimulated Raman loss spectrum, spontaneous Raman spectrum and coherent anti-Stokes Raman spectrum<sup>[28]</sup>

更为简便的实现方案,他们利用飞秒激光脉冲被高色散介质在时间上展宽到皮秒量级的特点,通过改变泵浦光与探测光之间的相对时间延迟实现了光谱聚焦<sup>[30]</sup>。

由不确定性原理可知,飞秒激光的频谱宽度要比皮秒激光和连续波激光宽很多,百飞秒级的脉冲在频谱宽度上一般为10 nm左右。根据(1)式所示的 Sellmeier 方程的简化形式可以得出,一个脉冲中不同频率(波长)的光在通过高折射率介质时,它们的折射率是不一样的。

$$n^2(\lambda) = 1 + \sum_i \frac{B_i \lambda^2}{\lambda^2 - C_i} \quad (1)$$

式中: $n$ 是特定波长的光所对应的折射率; $l$ 是光的波长; $B_i$ 、 $C_i$ 是第 $i$ 种介质的常数。由于光在介质中的速度与它在该介质中的折射率相关,所以每个频率成分的光的速度不一样,频率相对高的光的速度更快一些,频率低的光就慢一些,这就是宽频谱激光的群速度色散效应。该效应带来的结果就是,激光脉冲会在时间上得到展宽。

基于光谱聚焦法的高光谱受激拉曼成像显微镜既可以进行光谱成像,又可以进行光谱分析。在高光谱受激拉曼成像系统中,常用的做法是通过一个安装在泵浦光或斯托克斯光光路中的机械平移台来构建光学延迟线,从而达到改变光程,改变泵浦光和斯托克斯光之间时间延迟的目的<sup>[31]</sup>。如图3(a)所示,SPF为短通滤光片,LPF为长通滤色片,EOM为电光调制器,QWP为1/4波片,PBS为偏振分光镜。如图3(d)所示,扫描泵浦光和斯托克斯光之间的时间延迟得到了受激拉曼散射光谱,它与图3(b)中标准的自发拉曼光谱相似。Fu等<sup>[30]</sup>得出了拉曼频移与光学延迟的关系,如图3(c)所示。

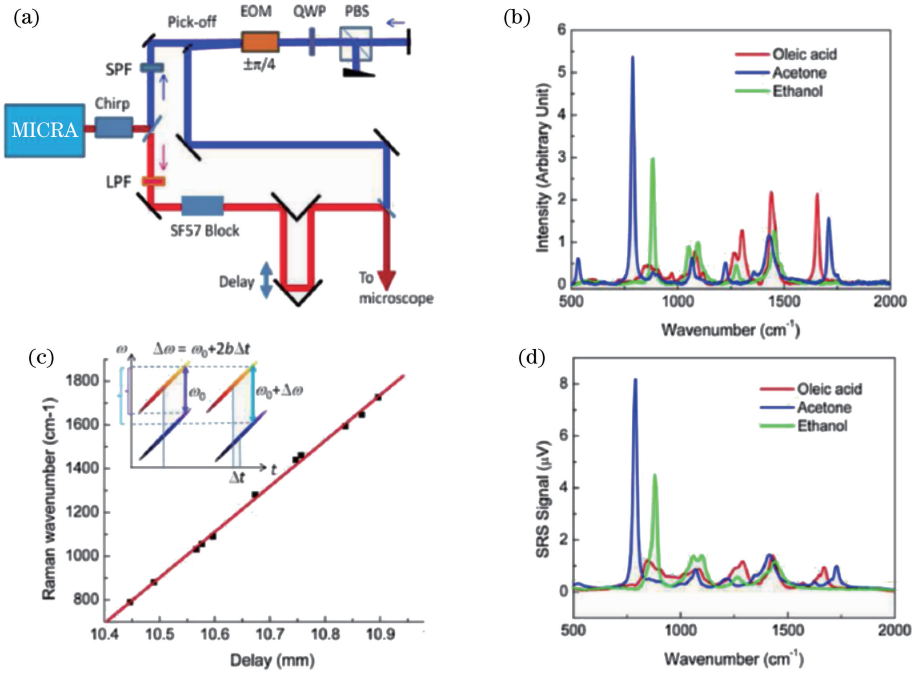


图 3 高光谱受激拉曼散射成像<sup>[30]</sup>。(a)受激拉曼散射光谱装置示意图;(b)油酸、丙酮和乙醇的自发拉曼光谱;(c)用丙酮和乙醇的拉曼峰对泵浦-斯托克斯脉冲延迟的拉曼频移进行标定,插图为拉曼位移与脉冲间延迟关系示意图;(d)扫频延迟啁啾飞秒脉冲测量得到的受激拉曼散射光谱

Fig. 3 Hyperspectral SRS imaging<sup>[30]</sup>. (a) Schematic of SRS spectroscopy setup; (b) spontaneous Raman spectra of oleic acid, acetone and ethanol; (c) calibration of Raman shift with respect to pump-Stokes pulse delay using a set of Raman peaks of acetone and ethanol, inset showing the schematic illustrating the relationship between Raman shift and interpulse delay; (d) SRS spectroscopy measured by swept-delay chirped femtosecond pulses

### 3 受激拉曼散射显微技术在生物医学上的应用

#### 3.1 活细胞的受激拉曼散射成像

图 4 为 HeLa 细胞在不同拉曼频移处的高光谱受激拉曼散射成像和局部区域的受激拉曼散射光谱。

图 4(a)为非拉曼共振频率处的细胞像,图中几乎看不到任何信号;图 4(b)是针对 CH<sub>2</sub>拉曼振动峰(2850 cm<sup>-1</sup>)的细胞像,主要显示了脂类的分布情况;图 4(c)是针对 CH<sub>3</sub>拉曼振动峰(2928 cm<sup>-1</sup>)的细胞像,主要显示了蛋白质信号与脂类信号叠加后的情况;图 4(d)是将脂类(绿色)分布情况与蛋白质(蓝色)分布情况进行叠加并加入伪彩后的情况。与图 4(e)中的光谱比较后可以看出,核仁区域的光谱与蛋白接近,它的成分以蛋白为主,而脂滴的光谱则可能是脂类(油酸)光谱与蛋白质光谱的叠加,因为它里面含有这两种成分。

从图 4(a)所显示的 2800 cm<sup>-1</sup>处的信号可以看出,在受激拉曼散射成像过程中,拉曼失共振时是没有其他非共振信号干扰的,其光谱与相应的自发拉

曼光谱基本一致,只是在光谱分辨率上稍有差距。这与高光谱受激拉曼散射成像系统中所用的激光光源有关,并不仅由受激拉曼散射过程本身的属性决定。所以需要把图 4(e)中的光谱与特定物质的受激拉曼散射光谱和自发拉曼光谱结合起来比较,才可用被测物的光谱形状来判定它的化学成分。这样,就可以根据图 4(b)和图 4(c)相应区域的光谱来判断出该区域所含物质的主要成分。因此,采用高光谱受激拉曼散射成像技术,可以通过快速移动光学延迟线来实现对应的拉曼频移,从而分析不同的成分。

在高光谱成像系统中,通常的做法是通过机械平台的运动来改变光学延迟线的位置,从而改变光程,但这样会使扫描图片的时间过长,从而引入误差。因此,有研究人员采用了基于振镜扫描来改变光学延迟的方法。

图 5(a)所示为带有快速扫描光学延迟线的高光谱受激拉曼成像系统,其中 SF57 为啁啾介质,EOM 为电光调制器,SP 为短通滤色片,PD 为光电二极管,LIA 为锁相放大器,RSODL 为快速扫描光学延迟线。由透射式光栅、透镜、振镜和半圆反射镜

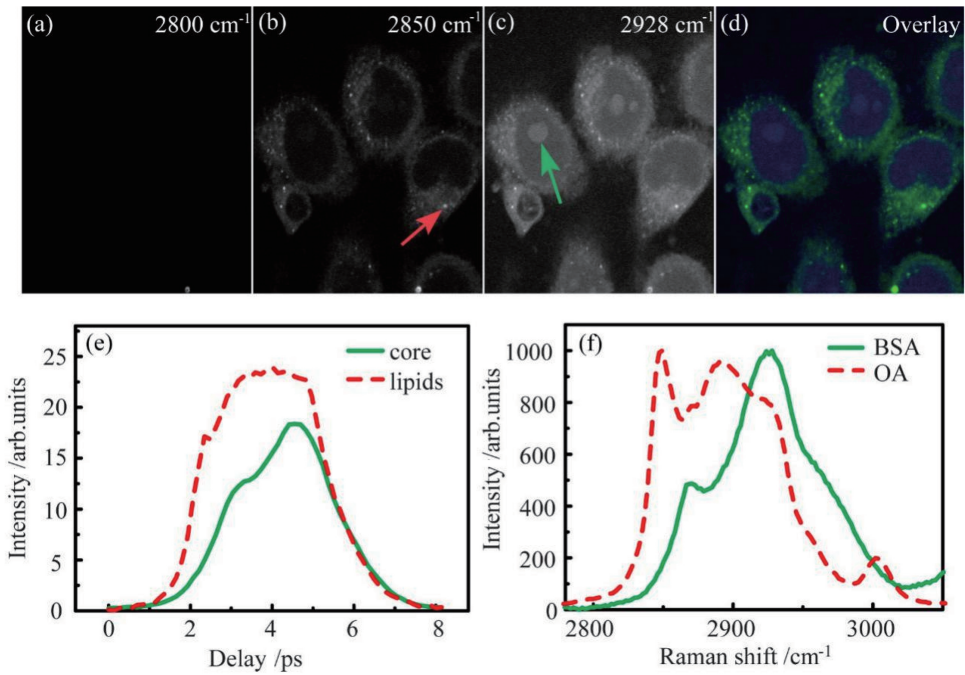


图 4 HeLa 细胞在不同拉曼频移处的受激拉曼散射成像和局部区域受激拉曼散射光谱。(a~c)不同拉曼频移处细胞的受激拉曼散射图像;(d)蛋白质和脂质合成图像;(e)图(b)、(c)中脂滴和核仁区域的受激拉曼散射光谱;(f)油酸 OA 和牛血清白蛋白 BSA 的自发拉曼光谱

Fig. 4 SRS images of HeLa cells at different Raman shift and SRS spectra of local region. (a~c): SRS images of cells at different Raman shift; (d) overlay of protein and lipid; (e) SRS spectra of lipid and core in Fig. (b) and Fig. (c); (f) spontaneous Raman spectra of oleic acid and bovine serum albumin

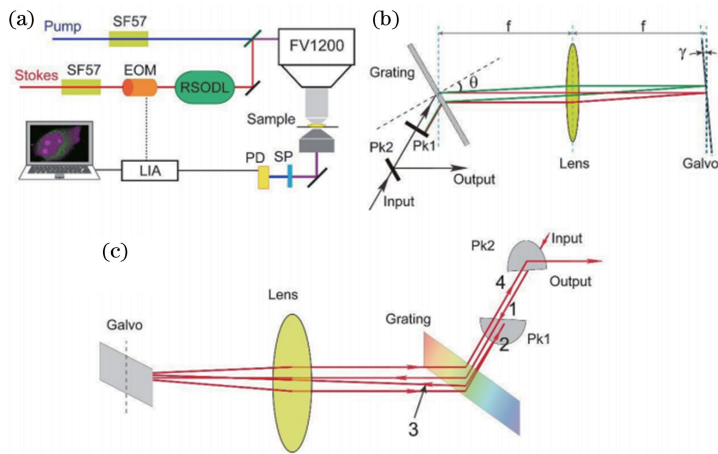


图 5 带有快速扫描光学延迟线(RSODL)的高光谱受激拉曼成像系统<sup>[32]</sup>。

(a)系统光路示意图;(b) RSODL 详细结构俯视图;(c) RSODL 的三维效果图

Fig. 5 Hyperspectral stimulated Raman imaging system with fast scanning optical delay line<sup>[32]</sup>.

(a) System optical path; (b) overhead diagram of detailed RSODL structure; (c) three-dimensional diagram of RSODL

(Pick-off) 组成一个快速扫描光学延迟线 (RSODL), 通过转动振镜就可以改变出射光的时间延迟。半圆形反射镜 Pk1 既可以在振镜转动幅度不变时加倍 RSODL 产生的光学延迟, 又可以保证出射光方向在振镜转动过程中保持不变; Pk2 则使得光被最终反射出来。图 5(b) 和图 5(c) 分别展示

了 RSODL 的平面图和立体图。

### 3.2 脑肿瘤边界的探测和诊断

对脑瘤成像的研究已取得了许多进展, 成像质量得以大幅提高。Evans 等<sup>[33]</sup> 采用单色相干反斯托克斯拉曼散射 (CARS) 显微镜对脂质含量进行了检测, 结果表明: 与正常脑组织相比, 肿瘤区

域的脂质浓度低得多,信号强度明显降低。然而,这种只对脂质成像的方法缺少足够的信息来准确诊断。Ji 等<sup>[34-36]</sup>揭示了正常脑组织和肿瘤脑组织拉曼特征的差异,并发现基于脂质和蛋白含量的双通道受激拉曼散射成像可以提供关键的组织学信息,包括细胞密度和形态、轴突形态,以及脂质含量与蛋白含量的比值等。

人类恶性胶质瘤(glioblastoma,简称“GBM”)

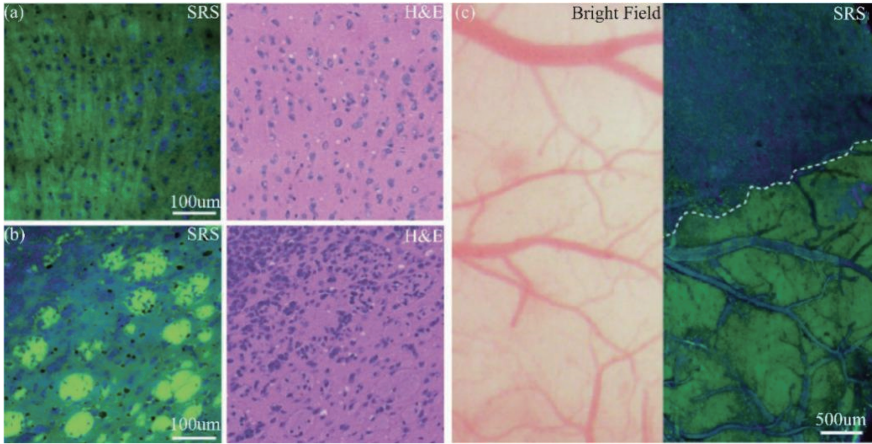


图 6 人类恶性胶质瘤异种移植的小鼠大脑双通道受激拉曼散射图像<sup>[34]</sup>。(a)正常大脑冷冻切片的受激拉曼散射显微图像和 H&E 图像;(b)恶性胶质瘤渗透大脑冷冻切片的受激拉曼散射显微图像和 H&E 图像;(c)明视场显微镜中看到的是正常区域,而受激拉曼散射图像则清晰地显示出了肿瘤的边界

Fig. 6 Two-color SRS images of human GBM xenograft mouse brains<sup>[34]</sup>. (a) SRS and H&E images of a normal brain frozen section; (b) SRS and H&E images of a GBM infiltrated brain frozen section; (c) in the field of view where bright field microscope appears grossly normal, however SRS image shows a distinct margin between tumor and normal brains

与冷冻切片相比,新鲜组织可以提供更完美的组织结构,并能显示出恶性胶质瘤异种移植小鼠大脑正常区域和肿瘤区域之间的明显差异。此外,受激拉曼散射显微成像是一种非标记的方法,它具有在活体动物体内成像的独特能力。研究人员采用具有浸润性的人体恶性胶质瘤异种移植小鼠模型对皮层表面的人胶质瘤的边缘进行了分析,并采用背散射受激拉曼散射显微技术通过颅窗进行成像,结果发现:在明视场显微镜下,大脑组织看不出异常,但在受激拉曼散射显微图像中,可清楚地看到肿瘤边界,如图 6(c)所示。

为了评估受激拉曼散射显微图像和 H&E 图像之间的一致性,网络调查组织者将大量的受激拉曼散射和 H&E 图像随机地提供给几名权威认证的神经病理学家,并要求他们采用传统做法将这些图像进行分类。分类结果说明了两种技术有着显著的一致性,证明了受激拉曼散射显微成像是一种有效的脑瘤诊断工具<sup>[35-37]</sup>。该方法已被用于动物模型和人类手术标本的研究。为了验证受激拉曼散射显微技

术在检测人类脑瘤方面的能力,研究人员用人脑手术标本进行了定量的体外研究。研究人员从不同的癫痫患者大脑中获得了正常的脑组织结构,其中的灰质-白质结的受激拉曼散射图像如图 7 所示。在异种移植模型中,人类脑组织的白质中含有大量富含脂质的髓鞘,但灰质中含有较少的脂质,这与蛋白质丰富的细胞核形成了鲜明对比。Lu 等<sup>[19]</sup>认为受激拉曼散射显微成像可以用来鉴别坏死的肿瘤。

异种移植已被用于早期的受激拉曼散射研究,并在活体内进行了实验。高级胶质瘤的诊断依赖于特殊的组织学特征,包括明显的核异质性、有丝分裂活动、细胞坏死和微血管增生。正常小鼠大脑的冷冻冠状脑组织和人类恶性胶质瘤异种移植均可通过受激拉曼散射和 H&E 进行成像。受激拉曼散射显微技术鉴别肿瘤组织的能力与 H&E 染色的效果相似,如图 6(a)~(b)所示<sup>[34]</sup>。

术在检测人类脑瘤方面的能力,研究人员用人脑手术标本进行了定量的体外研究。研究人员从不同的癫痫患者大脑中获得了正常的脑组织结构,其中的灰质-白质结的受激拉曼散射图像如图 7 所示。

在异种移植模型中,人类脑组织的白质中含有大量富含脂质的髓鞘,但灰质中含有较少的脂质,这与蛋白质丰富的细胞核形成了鲜明对比。Lu 等<sup>[19]</sup>认为受激拉曼散射显微成像可以用来鉴别坏死的肿瘤。

### 3.3 阿尔兹海默症中淀粉样斑块的受激拉曼散射显微成像

在阿尔兹海默症(AD)的研究中,变性蛋白斑块的成像非常重要。蛋白质的错误折叠导致了淀粉样斑块的形成,这种错误折叠的蛋白与正常的蛋白质有着不同的拉曼和受激拉曼散射光谱信息,如图 8 所示,通过光谱可以看出两者的拉曼峰值具有一定的频移。因此,基于不同拉曼峰处的受激拉曼散射成像,即可实现对病变组织中的变性淀粉斑块成像,并且能将其与组织中的蛋白质等区域进行区分。

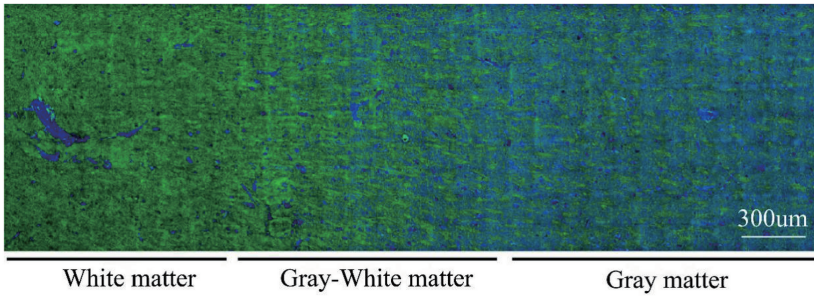


图 7 正常人脑手术组织的受激拉曼散射图像<sup>[35]</sup>

Fig. 7 SRS image of normal human brain surgical tissues<sup>[35]</sup>

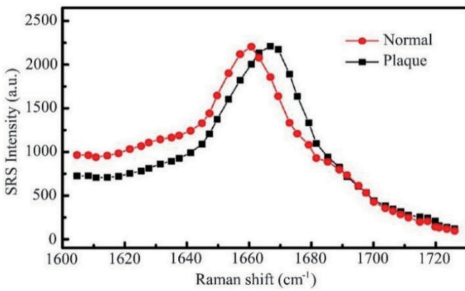


图 8 正常组织与淀粉斑块的受激拉曼散射光谱<sup>[36]</sup>

Fig. 8 SRS spectra of the plaque and normal tissue<sup>[36]</sup>

由图 9 可以看出:在  $1658\text{ cm}^{-1}$  处,正常组织的信号达到了峰值,而斑块的形状开始出现;在  $1670\text{ cm}^{-1}$  处,淀粉斑块的信号强度达到了峰值,而

此时正常组织的信号强度已经明显下降。因此,淀粉斑块达到了很高的对比度。将三种信号进行合成并加入伪彩色后的结果如图 9(d) 所示,可以清晰地地区分出蛋白(蓝色)、脂质(绿色)、变性淀粉斑块(青色)。

新鲜鼠脑组织中斑块的多通道 SRS 图像如图 10 所示,证明了受激拉曼散射显微成像可以用于新鲜组织中阿尔兹海默症的病理诊断。

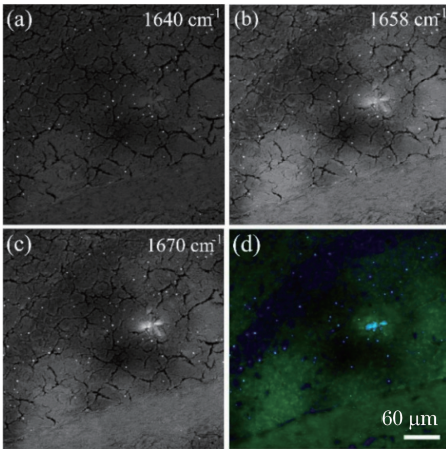


图 9 冷冻 AD 鼠脑切片多通道受激拉曼散射显微图像<sup>[36]</sup>。(a)~(c)不同波数下的受激拉曼散射图像;(d)三通道伪彩色合成图,展示了脂质(绿色)、正常蛋白(蓝色)和淀粉斑块(青色)的分布

Fig. 9 Multicolor SRS images acquired on frozen AD mouse brain section<sup>[36]</sup>. (a)-(c) SRS images at different wavenumbers; (d) three channel pseudo color composite showing the distribution of lipid (green), normal protein (blue), and amyloid plaque (cyan)

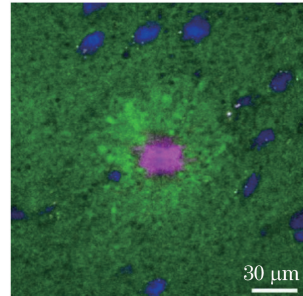


图 10 新鲜 AD 鼠脑组织多通道受激拉曼散射显微合成图片(脂质:绿色;正常蛋白:蓝色;淀粉斑块:品红色)<sup>[36]</sup>

Fig. 10 Multicolor SRS image acquired on fresh AD mouse brain (lipid: green; normal protein: blue; amyloid plaque: magenta)<sup>[36]</sup>

### 3.4 喉癌组织的受激拉曼散射显微成像

如果能对新鲜组织在无标记情况下直接进行组织形态学分析,就可以减少样品处理的时间。因此,有研究人员对新鲜且未经过冷冻、切片、固定等处理的喉癌组织进行了受激拉曼散射显微成像,在成像结果中能够看到新鲜的喉癌细胞的形态,图 11 所示为喉癌组织不同区域的成像,绿色代表脂质,蓝色代表蛋白质。

由图 11 所示的受激拉曼散射显微成像结果可以看出,受激拉曼散射显微成像可以清晰地对喉癌组织进行分辨,可以看出喉癌组织中的不同区域具有不同的细胞形态和细胞密度,并与病理学中的金标准 H&E 有着很好的对应关系。

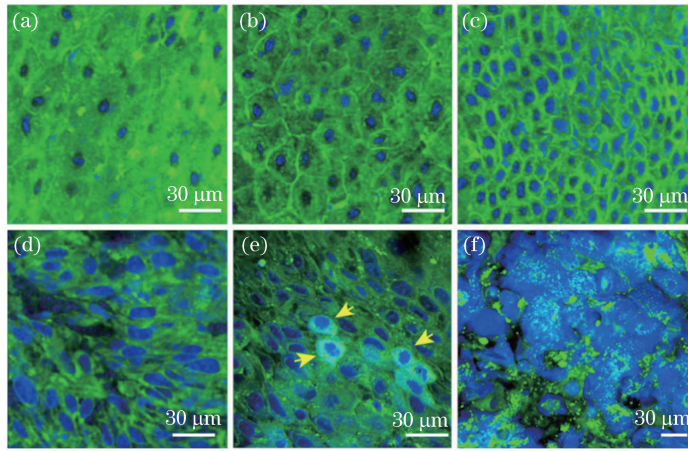


图 11 未经处理的新鲜喉外科组织的受激拉曼散射显微成像<sup>[37]</sup> (脂质:绿色;蛋白质:蓝色)。

(a)~(c)上皮细胞层不同位置处的正常鳞状细胞;(d)细胞核增大,细胞核形态异常

Fig. 11 SRS imaging of unprocessed fresh larynx surgical tissues<sup>[37]</sup> (lipid:green; protein:blue). (a)-(c) Normal squamous cells imaged at various locations of the epithelium layer;(d) enlarged cell nucleus and abnormal nuclear morphology

## 4 受激拉曼散射显微成像的发展

### 4.1 双通道同步探测与成像速度的提升

受激拉曼散射信号之所以比自发拉曼信号强,是因为受激辐射过程的存在。通常,受激拉曼散射只能针对一个特征拉曼峰(一种分子)进行探测和成像,要想改变探测目标的拉曼峰,就需要改变泵浦光或斯托克斯光的波长。这在实际应用过程中是很不方便的,特别是针对多种成分的运动样品进行成像时,就会不可避免地产生误差。所以,多通道同步受激拉曼散射成像的开发非常有必要。

研究人员使用调制相位相差  $90^\circ$  的两束斯托克斯光与泵浦光作用于样品,巧妙地利用锁相放大器的两相正交输出来探测两个针对不同拉曼峰的信

号,即该系统可以针对两个拉曼频移进行同步成像,将多色受激拉曼散射成像的速度提高到了原来的两倍以上,并且消除了成像时样品移动带来的影响。

如图 12 所示,受激拉曼散射显微成像信号是通过“调制-解调”方式得到的,EOM 表示电光调制器,PBS 表示光极化偏振分束器,ODL 表示光学延迟线,HW 表示半波片。以受激拉曼损耗的探测模式为例,在对斯托克斯光进行调制时,光电调制器将其偏振性进行周期性的改变,再通过一个偏振选择装置就可以得到强度呈周期性变化的斯托克斯光,也就是对其强度实现了开关调制。在具体实施过程中,这个光的偏振选择装置可以由一个光极化偏振分束器来充当。如图 12(a)所示,当一束重复频率为 80 MHz 的斯托克斯光经过电光调制器时,会被

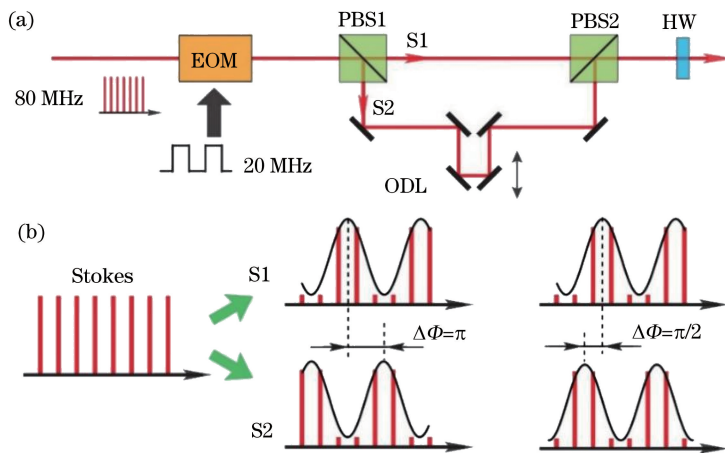


图 12 双相受激拉曼散射显微成像示意图<sup>[38]</sup>。(a)双相受激拉曼散射信号发生装置图;(b)双相受激拉曼散射信号产生的原理

Fig. 12 Schematics of dual-phase SRS<sup>[38]</sup>. (a) Setup of dual-phase SRS signal generation;

(b) principle of dual-phase SRS signal generation



电光调制器进行幅度上的调制(电光调制器的调制频率为 20 MHz),PBS1 可以把它分成偏振方向垂直而调制相位上相差  $180^\circ$  的两束斯托克斯光,标记为 S1 和 S2,如图 12(b)所示。激光脉冲的重复频率为 80 MHz,而电光调制器的调制频率为 20 MHz,那么每一个调制周期中就包含 4 个激光脉冲周期;S1 和 S2 在相位上相差  $180^\circ$ ,那么它们在时间上的相对延迟就是 2 个脉冲周期,如图 12(b)所示;用另一个光极化偏振分束器(PBS2)使 S1 在经过一个带有光学延迟线的光回路后重新与 S1 合并,共同作为斯托克斯光。准确设置光学延迟线的位置,使 S1 和 S2 在从 PBS1 到 PBS2 的过程中,在相对时间延迟上产生一个激光脉冲周期再加上几皮秒(具体数值须根据目标拉曼频移来决定)的变化,那么它们之间的调制相位差就变成了  $90^\circ$ ,且同时分别对应于两种待测的拉曼频率(如脂质和蛋白质)。这样一来,斯托克斯光就包含有两个分量,并且这两个分量具有相同的调制频率和正交的调制相位。这样的斯托克斯光与泵浦光作用于样品上,产生的受激拉曼损

耗信号同样具有两个频率相同且相位正交的分量,恰好可以通过双相锁相放大器的两个正交输出通道分别解调得到。基于此,双通道受激拉曼散射成像可以达到与单色成像一样快的速度。

为了验证双通道受激拉曼散射成像的应用,He 等<sup>[38]</sup>对活体斑马鱼的心脏组织和血液进行了双通道受激拉曼成像。图 13(a)展示的是一张斑马鱼胚胎的心脏图片,这只斑马鱼的胚胎刚刚受精 5 d。He 等采用激光扫描成像显微镜所能提供的最大成像速度(500 ns/pixel)进行成像(每秒可以拍摄 8 张图片),观察到了斑马鱼心脏跳动过程中,血红细胞被不断泵出心脏并有新的血红细胞回流到心脏中的情形,以及斑马鱼发育早期局部血红细胞的分布。图 13(b)中给出了活体小鼠耳朵中血液的流动情况,血管的分布得到了清晰的呈现,甚至单个红细胞也可以被观察到。这一双通道成像结果提供了单色受激拉曼散射成像不可以比拟的清晰度和对比度,说明双相受激拉曼散射成像系统可以对快速移动的微小物体进行高速成像,而且成像质量不受其运动的影响。

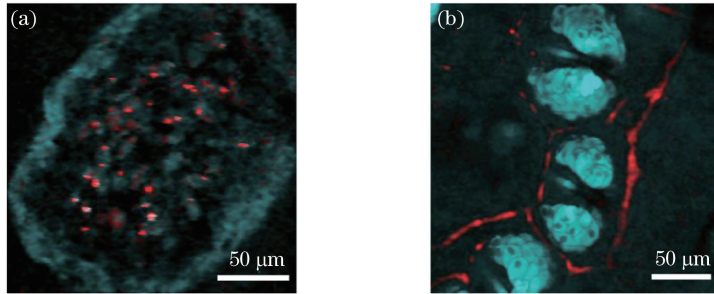


图 13 活体动物的实时双通道受激拉曼散射成像<sup>[38]</sup>(红色:血红细胞;青色:蛋白质)。

(a)斑马鱼胚胎心脏的双通道受激拉曼散射图像;(b)小鼠耳朵中血流的双通道受激拉曼散射图像

Fig. 13 *In vivo* two-color SRS microscopy images of live animals<sup>[38]</sup> (red: red blood cell; cyan:protein).

(a) Two-color SRS image of heart of a zebrafish embryo; (b) two-color SRS image of blood streams in a mouse ear

在 He 等实现双相受激拉曼散射显微成像的基础上,为了更进一步提升成像速度,以应对外科医生对大面积人体组织快速受激拉曼散射显微成像的要求,Zhang 等<sup>[39]</sup>采用线扫描条纹拼接,减少了拼图之间的冗余间隙时间,进一步大幅缩短了成像时间,如图 14 所示。

如图 14(a)所示,激光束在一维(紫色箭头方向)内连续扫描,同时以恒定的速度将样品台沿垂直方向平移,生成图像条纹。Zhang 等采用 LabVIEW 编写控制样品台运动的程序,当显微镜每执行一次任务时,显微镜软件就会传达一个触发信号给计算机,与此同时样品台开始移动,受激拉曼散射显微成像数据开始采集并生成。Zhang 等以  $12\text{ mm} \times$

7 mm 的鼠脑切片验证了线扫描条纹拼接技术在不影响成像质量的前提下,将原本需要 80 min 拼图才能完成的任务,缩短至 8 min(包括采集和拼接),成像结果如图 14(b)所示。

#### 4.2 受激拉曼散射显微成像与机器学习实现快速诊断

虽然受激拉曼散射显微技术可以准确、有力和快速地对组织病理学图像进行解释,但它仍然需要病理学家的专业知识,因此仍然是费时的,且不同的观察者可能会诊断出不同的结果。为确保快速地提供一致的诊断,研究人员提出了采用自动化的方法将受激拉曼散射显微技术全面结合到现有的医学工作流程中的方案。可以根据观察到的细胞密度、轴

突密度和蛋白/脂质比率等参数进行结合,然后采用分类程序评价视场中肿瘤发生的可能性<sup>[35]</sup>。Orringer 等<sup>[21]</sup>采用一种机器学习算法对多层感知神经网络进行了计算处理,他们将受激拉曼散射图像划分为 4 种关键诊断类型:非病灶性、低度胶质、

高等级胶质或非胶质肿瘤。当给定一幅受激拉曼散射显微图像后,经过训练的分类器可以预测其属于 4 个关键诊断类的概率。基于机器学习的组织诊断有望在术中提升手术决策效率,并将术中诊断与新型成像方法进行恰当的结合。

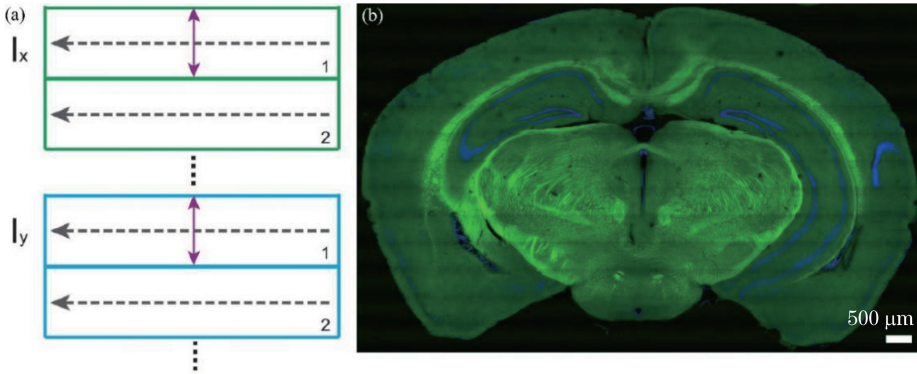


图 14 线扫描条纹拼接示意与演示<sup>[39]</sup>。(a)线扫描示意图;

(b)线扫描受激拉曼散射对鼠脑冷冻切片成像(脂质:绿色;蛋白质:蓝色)

Fig. 14 Illustration and demo of line scan and strip mosaicing<sup>[39]</sup>. (a) Illustration of line scan and strip mosaicing; (b) strip mosaicing SRS image of mouse brain frozen section(lipid: green; protein: blue)

Zhang 等<sup>[37]</sup>采用 34 层卷积神经网络(ResNet34)模型对喉部组织的受激拉曼散射图像数据进行辅助诊断,采用此体系对 21 个正常样本和

24 个肿瘤样本进行训练,并分别标记为正常和肿瘤,以 33 个未被训练的例子作为测试集,如图 15 所示。

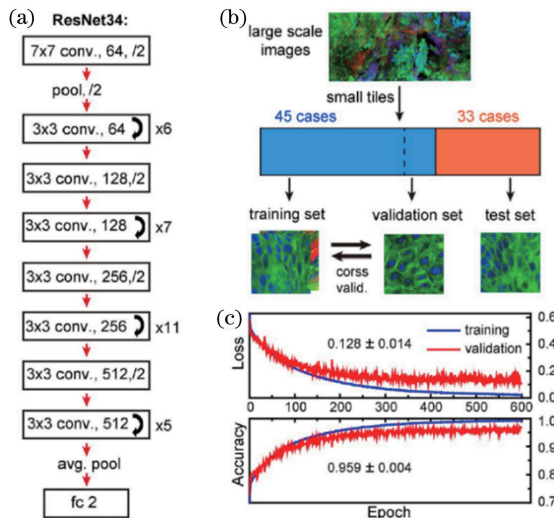


图 15 深度学习模型的构建与验证<sup>[37]</sup>。(a)ResNet34 网络结构图;(b)模型的工作与验证流程;(c)五倍交叉检验结果

Fig. 15 Construction and validation of deep-learning model<sup>[37]</sup>. (a) Network architecture of ResNet34;

(b) schematic illustration of work flow for training and validation of the model; (c) five-fold cross validation results

然后将训练集中的所有图像分割为很多幅 200 pixel×200 pixel(77 μm×77 μm)的图片,随机选择 18750 幅图进行训练。最后,用新鲜喉部组织的受激拉曼散射显微成像图片测试训练后的 ResNet34 模型。根据图 15(c)所示的交叉检验结果可知正确率可以达到 95.9%。

如图 16(a)所示为喉癌组织的受激拉曼散射图像。将其分割为很多幅 200 pixel×200 pixel 的小图。ResNet34 模型对每一幅小图进行预测,并且进行二值化表示,以灰色表示正常结果,红色表示癌变结果。Zhang 等以同样的方法对典型的正常喉部组织进行了预测,预测结果如图 16(b)所示。根据最

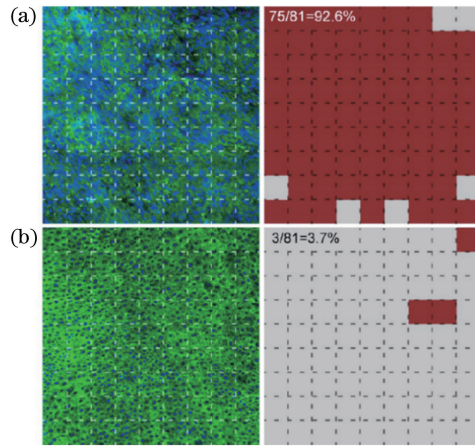


图 16 采用 ResNet34 辅助的受激拉曼散射显微组织学分析<sup>[37]</sup> (脂质:绿色;蛋白质:蓝色;癌变组织:红色;正常组织:灰色)。 (a)喉部鳞状细胞癌组织的受激拉曼散射显微图像及预测结果;(b)喉部正常组织的结果

Fig. 16 SRS histology of larynx tissue with the aid of ResNet34<sup>[37]</sup> (lipid: green; protein: blue; neoplastic: red; gray: normal). (a) Imaging and prediction results of a laryngeal squamous-cell carcinoma tissue; (b) results of a normal laryngeal tissue

终两种类型组织的占比来诊断该组织是否发生了癌变,以上两个样本的癌变比例分别为 92.6% 和 3.7%,因此可以将这两个样本分别判定为癌变组织和正常喉部组织。

文献[37]用 ResNet34 对 33 个未被训练的独立病例进行了诊断。图 17(a)所示为 ResNet34 的

诊断结果,与采用石蜡包埋组织切片的标准 H&E 检测结果完全一致,准确率达到 100%。对 88 幅 SRS 图像进行预测所得的接收者操作特征(ROC)的分析如图 16 (b)所示,ROC 曲线下方的面积(AUC)为 0.95,准确率为 95%,证明了 ResNet34 对喉癌分辨的有效性。

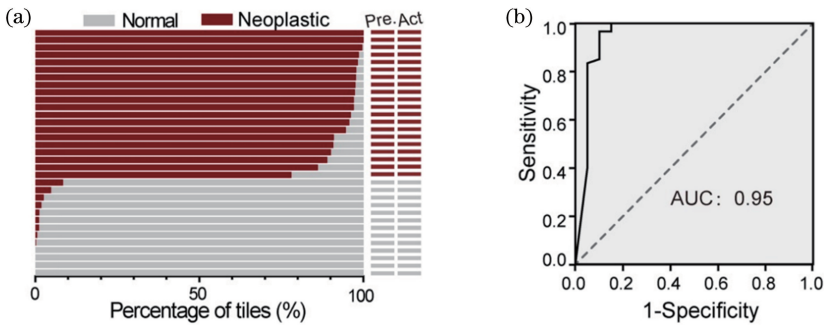


图 17 ResNet34 对未经训练病例的诊断结果<sup>[37]</sup>。(a) ResNet34 对 33 例独立病例的诊断结果与真实病理结果的比较;(b) ResNet34 诊断结果的 ROC 分析(AUC:曲线下方的面积)

Fig. 17 Diagnostic results of untrained cases using ResNet34<sup>[37]</sup>. (a) Diagnostic results of 33 independent cases using ResNet34 vs. true pathology results;(b) ROC analysis of the results from ResNet34 (AUC: area under the curve)

## 5 结束语

本文回顾了受激拉曼散射显微技术作为一种无标记的组织病理学工具来成像各类病理组织的进展。基于化学键的振动成像原理,在组织形态学上,受激拉曼散射显微技术通过探测脂质和蛋白质的受激拉曼信号对各类新鲜未经处理的病变组织进行成像,在成像结果中能够看到清晰的细胞结构和区域差异,利用光谱拉曼峰的差异可以特异性地对病变

物质进行受激拉曼散射成像。为了验证受激拉曼散射显微技术的可行性,大量的研究都将受激拉曼散射显微图像与 H&E 图像进行对比,结果发现两者有着良好的一致性。因此,受激拉曼散射显微成像被逐渐应用于各类病理组织的成像中,为医生在病例分析和临床诊断时提供参考。随着受激拉曼散射显微技术在医学成像各领域的逐渐深入,受激拉曼散射显微成像的速度也逐渐提升。现今,基于机器学习的分类器已被开发出来,用以对不同受激拉曼

散射显微图片提供更快、更准确的诊断。然而,与之前的荧光成像相比,受激拉曼散射显微技术的不足之处在于其探测的灵敏度还远远不能达到荧光成像的灵敏度,能探测到的最低浓度仅限于毫摩尔每升量级,对于很多低浓度的物质还无法实现很好的成像。由于受激拉曼散射显微技术是一项光学成像技术,其成像深度有限,先前的研究仅限于二维成像,与核磁共振成像和 CT 相比没有实现三维成像。Shen 等<sup>[25-26,40]</sup>将荧光成像和拉曼成像的优势相结合,将很多低浓度且不具有拉曼活性的生物分子标记炔基用于实现对生物体内更多物质的受激拉曼散射显微成像,结合荧光的高灵敏度和拉曼的窄带宽来提高成像的灵敏度<sup>[41]</sup>,并通过组织清理等技术增加受激拉曼散射成像的深度<sup>[42]</sup>,逐渐实现三维成像。对低浓度化学物质的受激拉曼散射显微成像的不足之处是图像中带有很强的背景信号,这会给图像的处理和定量分析带来很多困难。Fu 等<sup>[43-44]</sup>认为可通过调频受激拉曼显微成像来解决这一问题。随着科技的发展,受激拉曼散射显微技术必将集各种成像技术的优势于一体,成为临床病理诊断的实用工具。

### 参 考 文 献

- [1] Stummer W, Tonn J C, Mehdorn H M, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2011, 114(3): 613-623.
- [2] Chen W. Clinical applications of PET in brain tumors [J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2007, 48(9): 1468-1481.
- [3] Makary M, Chiocca E A, Erminy N, et al. Clinical and economic outcomes of low-field intraoperative MRI-guided tumor resection neurosurgery [J]. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2011, 34(5): 1022-1030.
- [4] Regelsberger J, Lohmann F, Helmke K, et al. Ultrasound-guided surgery of deep seated brain lesions[J]. *European Journal of Ultrasound*, 2000, 12(2): 115-121.
- [5] Böhringer H J, Lanckenau E, Stellmacher F, et al. Imaging of human brain tumor tissue by near-infrared laser coherence tomography [J]. *Acta Neurochirurgica*, 2009, 151(5): 507-517.
- [6] Sanai N, Eschbacher J, Hattendorf G, et al. Intraoperative confocal microscopy for brain tumors: a feasibility analysis in humans [J]. *Operative Neurosurgery*, 2011, 68(Suppl 2): 282-290.
- [7] Stummer W, Tonn J C, Goetz C, et al. 5-aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging [J]. *Neurosurgery*, 2013, 74(3): 310-320.
- [8] Kremer P, Fardanesh M, Ding R, et al. Intraoperative fluorescence staining of malignant brain tumors using 5-aminofluorescein-labeled albumin [J]. *Operative Neurosurgery*, 2009, 64(Suppl 1): 53-61.
- [9] Dombeck D A, Kasischke K A, Vishwasrao H D, et al. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(12): 7081-7086.
- [10] Witte S, Negrean A, Lodder J C, et al. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 5970-5975.
- [11] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, 42(5): 493-541.
- [12] Bhargava R. Infrared spectroscopic imaging: the next generation[J]. *Applied Spectroscopy*, 2012, 66(10): 1091-1120.
- [13] Meyer T, Bergner N, Bielecki C, et al. Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(2): 021113.
- [14] Karabeber H, Huang R M, Iacono P, et al. Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(10): 9755-9766.
- [15] Lu F K, Basu S, Igras V, et al. Label-free DNA imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(37): 11624-11629.
- [16] 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.
- [17] Vanden-Hehir S, Cairns S A, Lee M, et al. Alkyne-tagged PLGA allows direct visualization of nanoparticles *in vitro* and *ex vivo* by stimulated Raman scattering microscopy [J].

- Biomacromolecules, 2019, 20(10): 4008-4014.
- [18] Huang B, Yan S, Xiao L, et al. Label-free imaging of nanoparticle uptake competition in single cells by hyperspectral stimulated Raman scattering [J]. Small, 2018, 14(10): 1703246.
- [19] Lu F K, Calligaris D, Olubiyi O I, et al. Label-free neurosurgical pathology with stimulated Raman imaging[J]. Cancer Research, 2016, 76(12): 3451-3462.
- [20] Uckermann O, Galli R, Tamosaityte S, et al. Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107115.
- [21] Orringer D A, Pandian B, Niknafs Y S, et al. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy [J]. Nature Biomedical Engineering, 2017, 1(2): 27.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Zhang J, Yan S, He Z Y, et al. Small unnatural amino acid carried Raman tag for molecular imaging of genetically targeted proteins[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2018, 9(16): 4679-4685.
- [25] Shen Y H, Zhao Z L, Zhang L Y, et al. Metabolic activity induces membrane phase separation in endoplasmic reticulum [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(51): 13394-13399.
- [26] Wei L, Chen Z X, Shi L X, et al. Super-multiplex vibrational imaging[J]. Nature, 2017, 544(7651): 465-470.
- [27] Cheng J X, Xie X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. Science, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Fischer M C, Wilson J W, Robles F E, et al. Invited review article: pump-probe microscopy[J]. Review of Scientific Instruments, 2016, 87(3): 031101.
- [32] He R Y, Liu Z P, Xu Y K, et al. Stimulated Raman scattering microscopy and spectroscopy with a rapid scanning optical delay line[J]. Optics Letters, 2017, 42(4): 659-662.
- [33] Evans C L, Xu X Y, Kesari S, et al. Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy [J]. Optics Express, 2007, 15(19): 12076-12087.
- [34] 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.
- [35] Ji M B, Lewis S, Camelo-Piragua S, et al. Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy[J]. Science Translational Medicine, 2015, 7(309): 309ra163.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] He R Y, Xu Y K, Zhang L L, et al. Dual-phase stimulated Raman scattering microscopy for real-time two-color imaging[J]. Optica, 2017, 4(1): 44-47.
- [39] 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.
- [40] Wei L, Hu F H, Shen Y H, et al. Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering [J]. Nature Methods, 2014, 11(4): 410-412.
- [41] Xiong H Q, Shi L X, Wei L, et al. Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy and imaging [J]. Nature Photonics, 2019, 13(6): 412-417.
- [42] Wei M, Shi L Y, Shen Y H, et al. Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy[J]. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(14): 6608-6617.
- [43] Fu D, Yang W L, Xie X S. Label-free imaging of neurotransmitter acetylcholine at neuromuscular junctions with stimulated Raman scattering [J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(2): 583-586.
- [44] Hill A H, Munger E, Francis A T, et al. Frequency modulation stimulated Raman scattering microscopy through polarization encoding [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2019, 123(40): 8397-8404.