

# 回音壁模式光学微腔识别细胞类型

王亚平, 王秀翊\*, 王璞\*\*

北京市激光应用技术工程技术研究中心, 跨尺度激光成型制造技术教育部重点实验室,  
北京工业大学激光工程研究院, 北京 100124

**摘要** 回音壁模式是光子在一个准二维平面内运动, 并不断地在微腔边界发生全反射而不折射出腔的一种光学模式, 具有高的  $Q$  值和小的模式体积, 对外部环境的变化极其敏感。利用回音壁模式可以使宽带荧光实现窄光谱的激光输出。利用掺杂 DG(dragon green) 荧光染料的聚苯乙烯微球作为回音壁模式光学微腔, 通过细胞的吞噬功能, 使荧光微球到达细胞内部, 利用纳秒脉冲激光进行泵浦, 实现了细胞内的回音壁模式激光输出。与在纯水环境中的激光输出相比, 细胞内荧光微球回音壁模式的谐振峰发生了红移, 且红移量与细胞类型有关, 说明可以用回音壁模式实现细胞种类的无标记识别。

**关键词** 生物光学; 回音壁模式; 微球腔; 细胞内吞; 生物传感; 波长偏移

中图分类号 O437

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207028

## Identifying Single Cell Types via Whispering Gallery Mode Optical Microcavities

Wang Yaping, Wang Xiuhong\*, Wang Pu\*\*

Beijing Engineering Research Center of Laser Technology, Key Laboratory of Trans-Scale Laser Manufacturing Technology, Ministry of Education China, Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124

**Abstract** Whispering gallery mode is a type of optical mode where photons move in a quasi-two-dimensional plane, and the total reflection occurs at the boundary of the microcavity without reflecting out of the cavity. This mode has a high  $Q$  value and small mode volume, and it is extremely sensitive to changes in the surrounding environment. A broadband fluorescence can be transformed into narrow-spectrum laser output by using the whispering gallery mode. In this paper, polystyrene microspheres doped with the dragon green fluorescent dye are used as whispering gallery mode optical microcavity. Through the phagocytosis of cells, the fluorescent microspheres reach inside cells and then are pumped by nanosecond pulsed laser to achieve the output of whispering gallery mode laser in cells. In comparison with the laser output in the pure-water environment, a redshift of the intracellular fluorescent microsphere whispering gallery mode resonance emission can be observed, and the redshift is related to cell type; therefore, it can be used for unlabeled identification of cell type.

**Key words** biotechnology; whispering gallery mode; microsphere cavity; endocytosis; biosensing; wavelength shift

**OCIS codes** 170.6280; 040.5160; 130.6010; 140.3945

## 1 引 言

激光自问世以来就在生物研究方面发挥着重要作用。与荧光相比, 激光的谱线窄, 单色性好, 能量高, 可以作为光源来激发荧光染料、荧光蛋白质和量子点等物质, 已被广泛应用于生物医学成像和传感。目前, 激光器微型化已成为一种趋势, 比如使用环形

谐振腔制作成的光流体生物激光器<sup>[1-4]</sup>, 以及直径在微米量级的球形结构谐振腔<sup>[5]</sup>, 扩大了激光器的应用领域, 为可植入激光器的研究提供了基础。

回音壁模式(WGM)是由于全反射将光束束缚在球形或者环形谐振腔中而形成的一种谐振模式<sup>[6]</sup>。制作谐振腔的材料折射率必须要高于周围介质的折射率。回音壁模式具有超高的  $Q$  值、极小的模式

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(61527822)、国家重点研发计划(2017YFB0405201)、北京市自然科学基金(4192013, L182011)

\* E-mail: wxh2012@bjut.edu.cn; \*\* E-mail: wangpuemail@bjut.edu.cn

体积、超高的能量密度和极窄的线宽等优越特性,得到了人们的广泛关注。由于回音壁模式微腔的谐振性能对其本身的材料、大小、形状,以及外部环境的影响极其敏感,因此可用来检测温度<sup>[7]</sup>、压力<sup>[8]</sup>、电磁场的变化,已被广泛应用于腔光机械力学<sup>[9]</sup>、腔量子电动力学<sup>[10]</sup>等领域。尤为引人注目的是近年来利用回音壁谐振腔的生物传感和检测。当光在微腔表面发生全反射时,会在表面约 200 nm 的范围内形成消逝波。任何待分析物质,只要与微腔表面结合,其有效折射率就会发生变化,这一变化可以通过波谱的频移来测量<sup>[11]</sup>。2002 年, Vollmer 等<sup>[12]</sup>利用火焰加热单模二氧化硅光纤端部制成了具有高 Q 值的微球谐振腔,首次报道了球形微腔光学生物传感器,并将其用于检测蛋白质分子。当分析物牛血清白蛋白(BSA)吸附于微球表面时,回音壁模式对微腔表面折射率的响应会导致谐振波发生位移,据此可以实现对 BSA 分子的检测。Arnold 等<sup>[13]</sup>从单光子谐振能量的角度在理论上给出了单个蛋白质分子作用于回音壁模式微球腔表面时导致的频移的计算公式,证明了一个大分子即可产生可探测的回音壁模式频移,同时根据公式预测了单蛋白检测的具体参数,并通过实验估计了单个蛋白质所占的平均表面积。2009 年,张远宪等<sup>[14]</sup>利用石英光纤端面所形成的回音壁模式实现了对周围混合溶液浓度的检测,他们同样利用的是分子影响光纤表面进而导致回音壁激光辐射发生漂移的特性。

目前,回音壁模式用于生物传感时大多采用无源形式,需要复杂的解调系统,从而限制了它在生物医学领域的广泛应用。有源谐振腔包含增益介质,允许远程激发,并能收集回音壁模式激光信号,而且具有体积小、品质因子高的特点,非常适合植入细胞或组织内。对于细胞内有源形式的微球形谐振腔,增益介质可以在球体内、胞质内,也可以只在球胞质界面处,这些微腔可以以任何方式形成回音壁模式。2015 年,美国哈佛大学的光物理学家 Yun 等<sup>[15]</sup>,利用一个细胞内的油滴构成的回音壁微腔实现了激光输出。同年 7 月, Schubert 等<sup>[16]</sup>用内染绿色荧光染料的聚苯乙烯二乙烯基苯(PS-DVB)微球实现了对多种细胞的标记与追踪。利用 PS-DVB 微球的回音壁模式,绿色荧光染料在泵浦光的作用下,可以使光子长时间局域在很小的空间内,从而相干叠加形成谐振模式,增强光与染料的相互作用,实现染料的激光输出,通过测量谐振谱线的 TE 模和 TM 模的距离就可以实现对细胞的标记。2018 年,美国密歇

根大学的研究人员用硫化镉纳米线实现了对细胞内环境变化的检测,检测灵敏度为 55 nm/RIU(RIU 为折射率单元)。硫化镉纳米线被细胞内吞后可作为一个探针,在激光泵浦下,就可在纳米线壁上形成回音壁模式,实现激光输出<sup>[17]</sup>。同年 11 月,英国圣安德鲁斯大学的 Gather 课题组报道了一种利用细胞内集成的半导体纳米盘实现对细胞追踪的方法<sup>[18]</sup>。半导体纳米盘同样可以形成回音壁模式,具有阈值低、体积小、光谱稳定性高的优点。回音壁模式微腔可以实现精确检测,为研究细胞迁移和癌症侵袭提供了一个强有力的工具。

本文探究了一种聚苯乙烯荧光微球,该微球被细胞内吞后,通过激发微球回音壁模式可以实现细胞内的激光输出,利用这种细胞激光器可以检测不同种类的细胞。实验结果表明,荧光微球形成的回音壁谐振峰可在不同的细胞内发生不同程度的红移,可以用来识别细胞。DG(dragon green)微球中心峰发生红移的原因可以用腔谐振条件来解释。对于一个球形腔,如果腔直径远远大于入射光的波长,那么该球形腔满足的谐振条件为<sup>[19]</sup>

$$\lambda_r = \frac{2\pi r n_{\text{eff}}}{l}, \quad (1)$$

式中: $\lambda_r$  为谐振波长; $r$  为腔半径; $n_{\text{eff}}$  为谐振腔周围介质的有效折射率; $l$  为角量子数,是一个整数。这个公式表明,回音壁模式谐振波长与有效折射率成线性关系,当谐振腔周围的介质发生改变时,光场在腔径向上模式的分布就会发生变化,不同的细胞有不同的内环境,因此会有不同的谐振波长,据此可以鉴别不同种类的细胞。

## 2 实 验

### 2.1 回音壁模式理论

当微球尺寸远大于入射光波长时,可以利用经典的电磁理论结合微球腔边界条件得到回音壁模式场分布<sup>[20]</sup>,通过化简麦克斯韦方程,就可以得到标量形式的亥姆霍兹方程,即

$$\nabla^2 \psi + n^2 k^2 \psi = 0, \quad (2)$$

式中: $\psi$  为待求函数; $k$  为波数, $k = \omega/c$ ,  $c$  为真空中的光速, $\omega$  为角频率; $n$  为微腔的折射率。在规则微球腔的边界条件下,分离变量可以得到球腔的解为<sup>[21]</sup>

$$\psi = Z_l(nkr) Y_{lm}(\theta) \exp(-il\varphi), \quad (3)$$

式中: $Z_l(nkr)$  为贝塞尔函数; $Y_{lm}(\theta)$  为球谐函数; $l$  描述了光场在赤道面上的波节数目, $l$  越大,沿圆

周分布的极值点越多,可以通过  $l=2\pi R/\lambda$  近似得到; $m \in \{-l, -l+1, \dots, l-1, l\}$  表示方位角模式数,描述了光场在微球腔内沿经线分布的波节数目, $m$  越小,模式分布越趋于微腔两极,当  $m=l$  时,表示光在微球赤道面上传播,此时的耦合效率最高。根据光场在腔内的径向分布,本文引入一个参数  $q$  来表征微腔径向模式数,描述光场在腔内沿径向分布的波节数目, $q$  越大,径向的峰值越多,模式体积越大,当  $q=1, m=l$  时的模式为基模。

## 2.2 实验装置

实验用激光器为 473 nm 脉冲激光器,脉宽为 2.5 ns,重复频率为 100 Hz。激光通过  $40\times$  物镜聚焦到样品上,随后再通过第二个  $60\times$  物镜对样品的荧光进行收集,并将荧光传输到光谱仪上。实验装置示意图如图 1 所示,其中:grey filter 为连续衰减片,在实验中衰减激光功率,以避免对细胞造成损伤;longpass filter 为长通滤波片,目的是将泵浦光过滤掉,只允许样品信号光通过;webcam 为 CCD 相机,用来对样品成像,可以更精确地控制激光的聚焦位置。

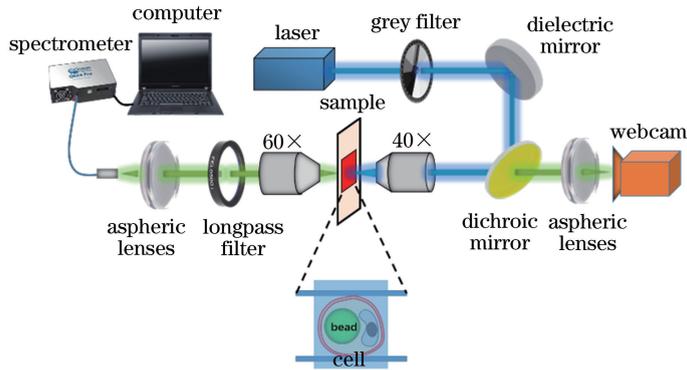


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic of measurement setup

实验所用荧光微球是掺杂 DG 荧光染料的聚苯乙烯微球,直径为  $15 \mu\text{m}$ ,其吸收波长为 480 nm,辐射波长为 520 nm。根据  $Q$  值计算公式  $Q=\lambda/\Delta\lambda$  可以计算得到  $Q$  值约为 800,其中  $\lambda$  为中心波长, $\Delta\lambda$  为谐振峰的线宽。

## 3 实验结果

### 3.1 回音壁模式微球在水环境中的激光输出

将 DG 荧光微球分散在纯水溶液中,利用图 1 所示的装置进行实验。要想使 DG 微球在水中实现

激光输出,必须满足两个条件:1)荧光染料必须处于激发态;2)光子在腔内经过全反射循环数次后的增益必须大于损耗。此外,谐振腔的折射率必须大于周围介质的折射率,这样才可以使光子束缚在腔内而不泄漏到外面或被腔吸收。如图 2(a)所示,在低于激发阈值时,只能观察到 DG 荧光调制信号,随着能量增大,当达到激发阈值时,在 520~550 nm 范围内,满足谐振条件的宽带荧光谱形成了一系列窄带谐振峰,而且能量越大,谐振峰越明显。图 2(b)为单个 DG 微球的激光输出与激发能量的关系,可

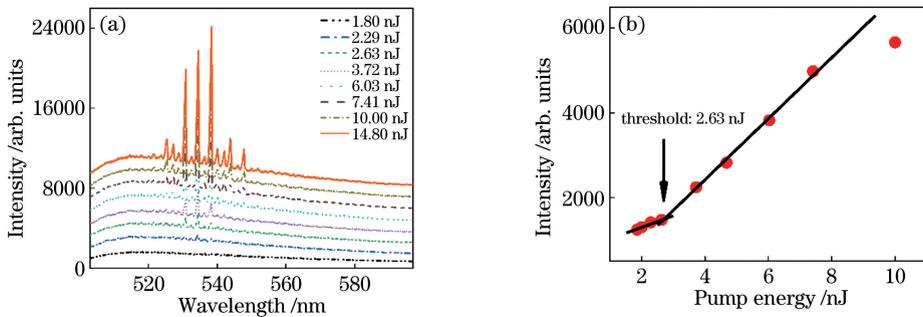


图 2 单个 DG 微球在水中的回音壁模式激光输出。(a)不同泵浦能量下的回音壁模式谐振峰;  
(b)激光输出强度随泵浦功率的变化曲线,激发阈值为 2.63 nJ

Fig. 2 WGM laser output of single DG microsphere in water. (a) WGM resonance peak at different pump powers;  
(b) curve of laser output intensity with pump power, the lasing threshold is 2.63 nJ

以看到,能量高于激发阈值时,处于激发态的光子数目急剧增多,这是回音壁模式谐振的结果。

### 3.2 回音壁模式微球在单细胞中的激光输出

上述实验表明 DG 微球可以在水环境中输出回音壁模式激光,且激发阈值很低。因为微球回音壁模式对外部环境的变化特别敏感,因此本文进一步探索其用于细胞探测的可能性。首先,研究细胞内吞微球的过程。将 DG 微球和癌细胞共同培养,细胞具有吞噬功能,可以将 DG 微球内吞到胞内。图 3(a)~(h)显示了乳腺癌 T47D 细胞内吞 DG 微球

的过程,分别拍摄了 8 个不同时刻的细胞形貌,圆形部分为 DG 微球。可以很明显的看到微球逐渐被细胞内吞,在 2.3 h 时,微球完全进入细胞内部。之后,DG 微球随着细胞的生长分裂到达子细胞中,几乎不影响细胞的生长状态。本实验还对细胞进行了固定,并用碘化丙啶(Propidium iodide,PI)对细胞核进行染色操作,如图 3(i)~(l)所示,标记 1 部分为细胞核,标记 2 部分为微球。可以看到细胞核仍然保持完整,这也说明了微球不影响细胞分裂的整个过程。

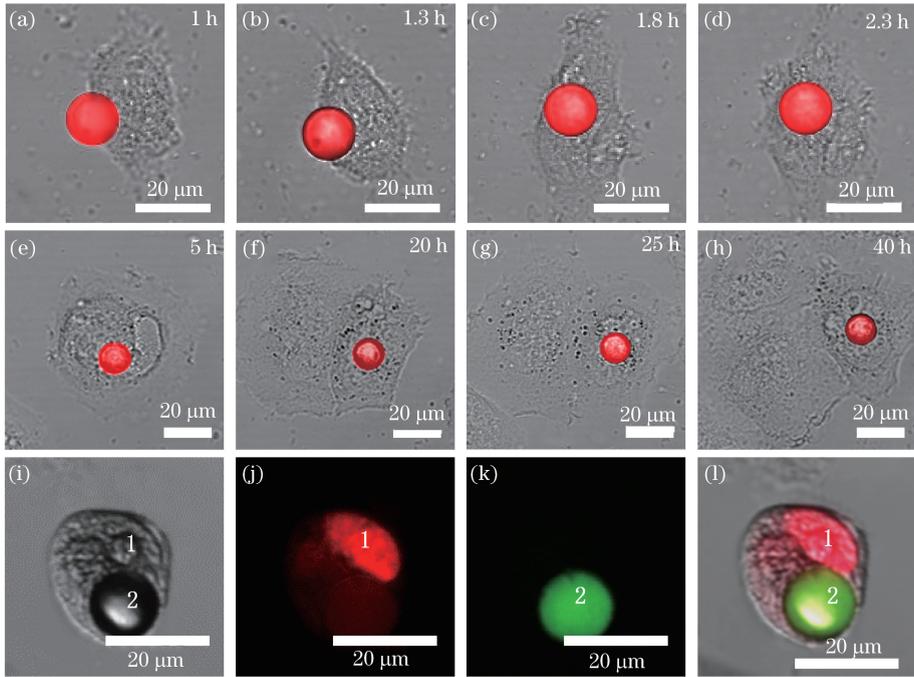


图 3 T47D 细胞吞噬 DG 微球的过程图。(a)~(h)分别为 8 个不同时刻的细胞荧光共聚焦图像;(i)~(l)为吞有 DG 微球的已固定的 T47D 细胞荧光共聚焦图像,细胞核已被 PI 染色,标记 1 部分为细胞核,标记 2 部分为微球;(i)细胞的明场图像;(j)细胞核的荧光图像(PI 染色,吸收波长为 535 nm,辐射波长为 615 nm);(k) DG 微球的荧光图像(吸收波长为 480 nm,辐射波长为 520 nm);(l)荧光明场叠加图像

Fig. 3 Diagrams of phagocytosis of DG microspheres by T47D cells. (a)–(h) Showing the cell fluorescence confocal images at eight different moments, respectively; (i)–(l) represent fluorescence confocal images of fixed T47D cells containing DG microspheres, the nucleus is stained by PI, and the marker 1 part is the nucleus, while the marker 2 part is the microsphere; (i) light field image of cell; (j) fluorescence image of nuclear (PI staining, absorption wavelength is 535 nm and radiation wavelength is 615 nm); (k) fluorescence image of DG microsphere (absorption wavelength is 480 nm and radiation wavelength is 520 nm); (l) fluorescent field superimposed image

为了确定 DG 微球确实被细胞内吞,而不是置于细胞外部,采用 Cell Mask™ Deep Red(CMDR)染色试剂对细胞膜进行染色操作,然后用共聚焦显微镜进行三维扫描观察。图 4(a)所示是 DG 微球被细胞吞噬后的三维成像图,标记 1 部分是被染成蓝色的细胞膜,标记 2 部分是显示为红色的 DG 微球。为了更清楚地看到微球在细胞内的位置,图 4(b)展示了图 4(a)中的一个横截面,可以明显地看

到被染成蓝色的细胞膜(标记 1 部分)以及包裹的红色的 DG 微球(标记 2 部分),从而证明了 DG 微球确实被细胞内吞,而不是贴在细胞表面。

将吞有 DG 微球的细胞置于图 1 所示的光路中进行检测,将光束焦点移到 DG 微球上,衰减激光能量到细胞损伤阈值以下,在 473 nm 脉冲激光的泵浦下,检测到的激光光谱如图 5(a)所示,DG 微球在细胞内依然可以产生典型的回音壁模式谐振峰。图

5(b)为激光输出与泵浦能量的关系,出光阈值为6.03 nJ。由于内外环境折射率差异较小,故而胞内物

质对激光的吸收增强,导致损耗增多,因此出光阈值与在纯水中相比增大。

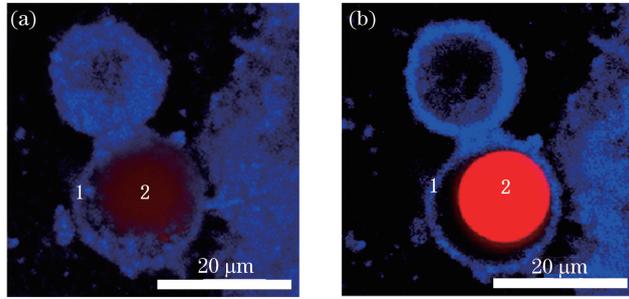


图4 T47D细胞内吞DG微球后的共聚焦成像。(a)两个细胞的三维重建图;  
(b)细胞的截面图,验证了微球确实存在于细胞内部

Fig. 4 Confocal imaging of T47D cells after endocytosis of DG microspheres. (a) Three-dimensional reconstruction of two cells; (b) a cross section of cell shows that the microspheres do exist inside the cell

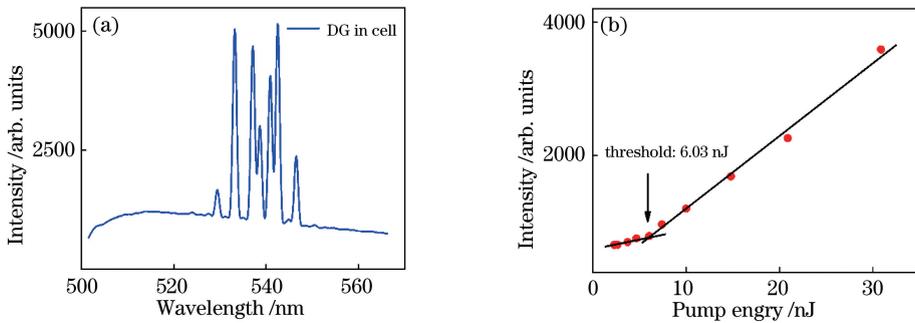


图5 单个细胞内DG微球的激光输出。(a)在细胞中达到阈值输出时的典型的回音壁模式光谱图;  
(b)激光输出强度与泵浦能量的关系

Fig. 5 Laser output of DG microspheres within a single cell. (a) Typical WGM spectrum reaching threshold output in cell; (b) relationship between laser output intensity and pump energy

在此基础上,将DG微球分别植入不同类型的细胞中,并研究了不同细胞内DG微球的激光输出。本实验一共测试了三种细胞,均为人类乳腺癌细胞系,它们分别为T47D、MCF7和SKBR3。这三种细胞分别代表三种不同类型的乳腺肿瘤细胞,其中:T47D是侵入性人乳腺导管癌细胞;MCF7乳腺癌细胞保留了多个分化乳腺上皮的特性,雌激素受体为阳性;SKBR3乳腺癌细胞过度表达Her2受体。三种细胞分别与DG微球共同培养,并使微球被三种细胞内吞,然后用473 nm激光泵浦细胞内的微球,每种细胞测量了3个含有微球的细胞,记录激光输出。测出的DG微球在三种细胞中的光谱图如图6所示,可以看出同种类型的三个细胞的光谱位置非常一致,取三个光谱的平均值代表此类细胞的激光发射。为了方便分析,只选择了每组峰中的中心谐振峰进行了比较,如图6(d)所示。可以看到,由于每种细胞内的环境不同,因此激发后的DG微球回音壁模式中心谐振峰在不同类型细胞中的位置是

不同的:SKBR3细胞的中心发射峰位于536.29 nm, T47D细胞的中心发射峰位于538.60 nm, MCF7细胞的中心发射峰位于540.65 nm,且相比于在水中的发射峰位置,均发生了红移。因此,DG微球回音壁模式可以用来识别细胞种类。

## 4 结 论

本文利用DG荧光微球本身所拥有的回音壁模式对不同种类的细胞进行了检测。在过去的十几年中,回音壁模式光学微腔被用于生物分子上的检测已有许多报道,但大多采用的是“无源”模式,不适用于细胞内检测。“有源”模式因为具有增益介质,不仅省掉了额外的耦合器件,还提高了灵敏度。DG荧光染料具有很宽的荧光发射谱带,且荧光强度小,直接用来检测物质时很难观察到谱带的移动,灵敏度极低,但在473 nm激光的激发下,再通过聚苯乙烯微球腔的循环振荡就可以实现激光信号的输出。微球腔具有较小的模式体积以及稳定的谐振特性,

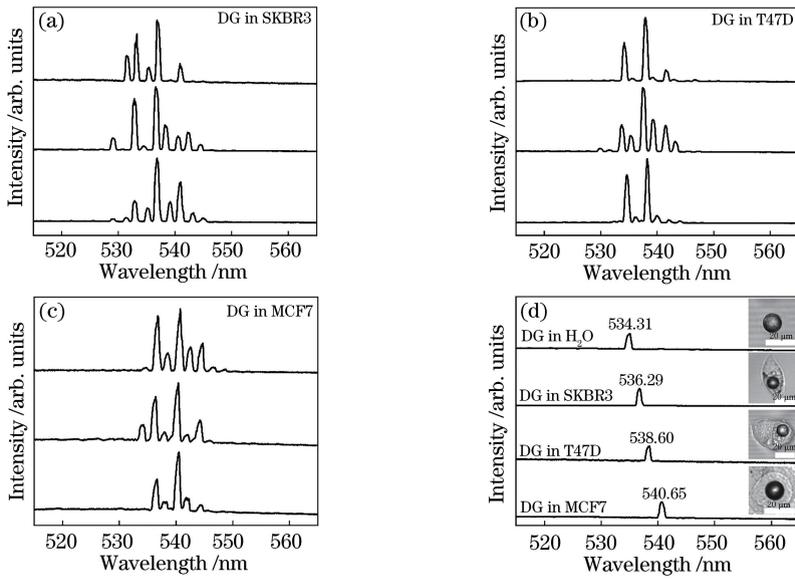


图 6 DG 微球在不同细胞内产生的回音壁模式谐振波长。(a) DG 微球在 SKBR3 细胞中;(b) DG 微球在 T47D 细胞中;(c) DG 微球在 MCF7 细胞中;(d) DG 微球在不同细胞中的回音壁模式的中心谐振峰,插图为 DG 微球在不同细胞中的荧光场图像

Fig. 6 WGM resonant wavelength of a single DG microspheres in different cells. (a) DG microspheres in SKBR3 cells; (b) DG microspheres in T47D cells; (c) DG microspheres in MCF7 cells; (d) central resonance peak of WGM of DG microsphere in different cells, and the illustrations are fluorescent field images of DG microsphere in different cells

在赤道面上可形成回音壁模式,实现的输出激光谐振峰的半峰全宽窄,能量高,对于腔外环境的变化极为敏感,可以实现对待测物质的高灵敏度检测。本实验中的 DG 微球无毒性,被细胞内吞后不影响细胞的生理状态,最终实现了不同细胞环境中回音壁模式发射峰位置不同的结果。目前所使用的微球回音壁模式谐振峰数目较多,体积较大,  $Q$  值较低,因此高  $Q$  值、小体积、低阈值、高检测灵敏度的谐振腔是未来追求的目标。

### 参 考 文 献

[1] Fan X D, Yun S H. The potential of optofluidic biosensors[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(2): 141-147.

[2] Lacey S, White I M, Sun Y Z, et al. Versatile optofluidic ring resonator lasers with ultra-low threshold [J]. *Optics Express*, 2007, 15(23): 15523-15530.

[3] Yang G, White I M, Fan X D. An opto-fluidic ring resonator biosensor for the detection of organophosphorus pesticides [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 133(1): 105-112.

[4] Vasdekis A E, Town G E, Turnbull G A, et al. Fluidic fibre dye lasers[J]. *Optics Express*, 2007, 15(7): 3962-3967.

[5] Ta V D, Caixeiro S, Fernandes F M, et al. Microsphere solid-state biosensors [J]. *Advanced Optical Materials*, 2017, 5(8): 1601022.

[6] Vahala K J. Optical microcavities[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 839-846.

[7] Guan G, Arnold S, Otugen M V. Temperature measurements using a microoptical sensor based on whispering gallery modes[J]. *AIAA Journal*, 2006, 44(10): 2385-2389.

[8] Himmelhaus M, Francois A. *In-vitro* sensing of biomechanical forces in live cells by a whispering gallery mode biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(2): 418-427.

[9] Schliesser A, Kippenberg T J. Cavity optomechanics with whispering-gallery mode optical microresonators[M] // Arimondo E, Berman P R, Lin C C. *Advances in atomic, molecular, and optical physics*. USA: Academic Press, 2010, 58: 207-323.

[10] Haroche S, Kleppner D. Cavity quantum electrodynamics[J]. *Physics Today*, 1989, 42(1): 24-30.

[11] Vollmer F, Arnold S. Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 591-596.

[12] Vollmer F, Braun D, Libchaber A, et al. Protein detection by optical shift of a resonant microcavity [J]. *Applied Physics Letters*, 2002, 80(21): 4057-4059.

[13] Arnold S, Khoshshima M, Teraoka I, et al. Shift of whispering-gallery modes in microspheres by protein adsorption[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(4): 272-

- 274.
- [14] Zhang Y X, Han D Y, Zhu K, et al. Wavelength shift of whispering-gallery-mode fiber laser caused by fiber cladding refractive index[J]. Chinese Journal of Lasers, 2009, 36(3): 691-694.  
张远宪, 韩德昱, 祝昆, 等. 包层介质折射率引起的回音壁模式光纤激光波长漂移[J]. 中国激光, 2009, 36(3): 691-694.
- [15] Humar M, Yun S H. Intracellular microlasers[J]. Nature Photonics, 2015, 9(9): 572-576.
- [16] Schubert M, Steude A, Liehm P, et al. Lasing within live cells containing intracellular optical microresonators for barcode-type cell tagging and tracking[J]. Nano Letters, 2015, 15(8): 5647-5652.
- [17] Wu X Q, Chen Q S, Xu P Z, et al. Nanowire lasers as intracellular probes[J]. Nanoscale, 2018, 10(20): 9729-9735.
- [18] Fikouras A H, Schubert M, Karl M, et al. Non-obstructive intracellular nanolasers [J]. Nature Communications, 2018, 9: 4817.
- [19] Gorodetsky M L, Ilchenko V S. Optical microsphere resonators: optimal coupling to high-Q whispering-gallery modes[J]. Journal of the Optical Society of America B, 1999, 16(1): 147-154.
- [20] Born M, Wolf E. Principles of optics[M]. Yang J S, Transl, 7th ed. Beijing: Science Press, 2004: 1-6.  
玻恩 M, 沃尔夫 E. 光学原理[M]. 杨葭荪, 译, 7版. 北京: 科学出版社, 2004: 1-6.
- [21] Chiasera A, Dumeige Y, Féron P, et al. Spherical whispering-gallery-mode microresonators [J]. Laser & Photonics Reviews, 2010, 4(3): 457-482.