

## 压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术研究进展

王聪昊<sup>1</sup>, 张秀磊<sup>2</sup>, 崔皓东<sup>1</sup>, 马健睿<sup>1</sup>, 吴润龙<sup>3</sup>, 刘惠兰<sup>1,4</sup>, 王爱民<sup>5\*</sup>, 冯丽爽<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>北京航空航天大学仪器科学与光电工程学院, 北京 100191;

<sup>2</sup>北京航空航天大学自动化科学与电气工程学院, 北京 100191;

<sup>3</sup>北京大学分子医学研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100871;

<sup>4</sup>北京航空航天大学精密光机电一体化技术教育部重点实验室, 北京 100191;

<sup>5</sup>北京大学电子学院区域光纤通信网与新型光通信系统国家重点实验室, 北京 100871

**摘要** 双光子内窥成像技术是一种基于双光子激发原理的新型内窥成像技术,具有光学层析能力、穿透深度深、光毒性小、无标记成像等技术优势,可以同时实现细胞结构成像和功能成像,在生命科学、临床医学等领域具有巨大的发展潜力。在近十几年的发展中,压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术不断取得突破,并在生物医学成像领域实现了新应用。本文对压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术及其在国内外的研究进展进行了总结,并介绍了该技术在生物医学成像领域的应用。

**关键词** 医用光学; 双光子成像; 内窥镜; 双包层光纤; 微型显微物镜; 压电陶瓷扫描器

中图分类号 Q-334

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1907003

### 1 引言

全球范围内消化道癌症的发病率、死亡率飞速攀升,极大地危害了人类的生命健康<sup>[1]</sup>。我国是消化道癌症高发国家之一,胃癌和食道癌的发病率一直处于世界前列。近年来,结直肠癌的发病率出现了显著的增长趋势,造成了沉重的社会负担<sup>[2]</sup>。临床治疗表明,早期胃癌、结直肠癌患者的术后五年生存率均可以达到 90% 以上,而晚期胃癌、结直肠癌患者根治术后五年生存率分别仅为 20% 和 7%<sup>[3-4]</sup>。可见,发展早期癌症的检测与诊断技术对于提高人民健康水平至关重要。

消化道癌症的常规检测仪器是白光内镜,但其较难对早期病变组织进行准确诊断。荧光内镜成像和窄带成像等内窥成像技术基于图像增强原理来提高宏观组织结构的成像对比度,但仍不具备细胞尺度的成像能力<sup>[5-8]</sup>。迄今为止,组织病理学检查仍然是临床诊断癌症的“金标准”,但该方法需要经过初检、取样、切片、苏木精-伊红(HE)染色、病理检查等流程,具有耗时长、离体检测等局限性。此外,虽然采用活检取样可以对疑似病变区域进行细胞尺度下的病理特征检查,但该方法无法实现疑似病变区域的全覆盖,因此存在一定的漏检及误检风险。为了实现消化道癌症的早期诊断,迫切需要发展细胞尺度下的实时、在体、原位组织

学诊断技术。

双光子激发原理为:两个波长较长的光子几乎同时(时间上相差飞秒量级)被一个荧光分子吸收,荧光分子跃迁至高能级态,经过短暂的激发态寿命时间后,荧光分子跃迁回较低的能级状态,同时辐射出一个波长较短的光子<sup>[9-10]</sup>。1990 年,美国康奈尔大学的 Webb 课题组<sup>[11]</sup>将双光子激发原理应用到共聚焦扫描显微镜中,开辟了双光子成像的新领域。相比于宽场及共聚焦成像技术,双光子成像技术具有穿透深度大<sup>[12]</sup>、光学层切、无标记结构及功能成像、光损伤和漂白程度小等优势<sup>[13-14]</sup>。作为活体光学成像的主流成像方法之一,双光子成像在神经科学<sup>[15-16]</sup>、癌症诊断<sup>[17]</sup>、皮肤检测<sup>[18-19]</sup>等领域发挥着重要作用。

双光子内窥镜系统(TPEM)基于双光子激发原理,同时将扫描器件及微型显微物镜集成到微型内窥化探头中,并配合光纤(束)导光,实现亚细胞分辨率、无标记结构及功能成像<sup>[20-22]</sup>。双光子内窥镜系统的典型探测信号包括双光子荧光(TPF)信号及二次谐波(SHG)信号<sup>[23-24]</sup>。双光子内窥成像技术在肿瘤的浸润深度诊断、手术边缘癌残留检测及肿瘤转移评估等方面具有广阔的应用前景<sup>[25-30]</sup>,近些年吸引了众多国内外研究团队的目光。压电陶瓷扫描式双光子内窥成像是目前双光子内窥成像的首选方案。本文首先对压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术进行介绍,总结了

收稿日期: 2022-06-09; 修回日期: 2022-08-09; 录用日期: 2022-08-15

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFB1312802)、国家自然科学基金(61973019, 31830036, 61975002)

通信作者: \*fenglishuang@buaa.edu.cn; \*\*wangaimin@pku.edu.cn

该技术在国内外的研究进展,并阐述了压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术在生物医学成像领域的应用。

## 2 压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术概述

典型的双光子内窥镜系统的核心模块包括飞秒脉冲激光器光源模块、色散补偿模块、信号采集重构模块以及内窥集成探头模块。根据扫描器件是否位于集成探头内,双光子内窥镜系统可以分为近端扫描方案和远端扫描方案<sup>[31]</sup>。几种典型的扫描方案如图 1 所示。近端扫描方案下的扫描器件位于双光子内窥探头外部,如图 1(a)所示,而远端扫描方案下的扫描器件位于双光子内窥探头内部。目前近端扫描方案多采用扫描振镜实现光斑扫描,光纤束(FB)作为导光介质<sup>[32]</sup>。扫描器件置于微型化集成探头之外可以降低探头设计及封装的难度,而且该方案与台式双光子显微镜系统(TPM)的兼容性较好;但光纤束纤芯距会限制系统成像的分辨率,而且飞秒脉冲在光纤束中传输时会因严重色散而导致脉冲展宽,需要通过复杂的色散补偿模块进行补偿。以上原因导致基于光纤束的近端扫描双光子内窥镜系统的成像质量与台式 TPM 仍有一定差距。为突破上述壁垒,研究人员将扫描器件封装在微

型化内窥探头内,探索了成像性能更加优异的远端扫描方案,该方法是近年来双光子内窥成像技术的研究热点。

扫描器件位于双光子内窥集成探头内部的远端扫描方案主要包括图 1(b)所示的机电系统(MEMS)扫描及图 1(c)所示的压电陶瓷驱动光纤扫描。MEMS 扫描振镜通过驱动信号驱动反射镜面旋转实现光斑扫描,具有可批量生产、光学性能及力学性能优异等优势<sup>[33]</sup>。2006 年,斯坦福大学 Schnitzer 课题组<sup>[34]</sup>首次将 MEMS 扫描振镜用于 TPM 并对花粉进行了成像。同年,斯威本科技大学 Gu 课题组<sup>[35]</sup>首次基于 MEMS 扫描振镜与双包层光子晶体光纤(DC-PCF),研制了集成直径为 3 mm 的共光路侧视双光子内窥镜系统,并采用该内窥镜系统实现了对大鼠食管组织的 TPF 与 SHG 成像。2009 年,加州大学欧文分校的 Chen 课题组<sup>[36]</sup>探索了几种基于 MEMS 扫描振镜与 DC-PCF 的共光路内窥探头构型,并研制了探头集成直径为 10 mm、刚性长度为 140 mm 的侧视双光子内窥镜系统。MEMS 扫描振镜的远端扫描方案大多需要通过光路折转实现成像,而且受限于 MEMS 扫描振镜的封装尺寸,进一步降低基于 MEMS 扫描振镜的双光子内窥探头的横向尺寸面临巨大挑战<sup>[37-38]</sup>。

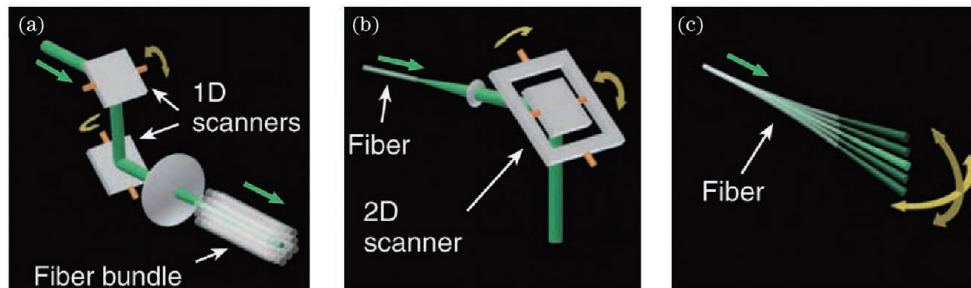


图 1 双光子内窥镜系统的典型扫描方案<sup>[31]</sup>。(a)光纤束近端扫描方案;(b)MEMS 远端扫描方案;(c)压电陶瓷驱动光纤远端扫描方案

Fig. 1 Typical scanning of two-photon endomicroscopy (TPEM) system<sup>[31]</sup>. (a) Fiber bundle based proximal scanning; (b) MEMS-based distal scanning; (c) piezoelectric ceramic based fiber distal scanning

压电陶瓷驱动光纤扫描是双光子内窥远端扫描方案的另一种技术实现形式。2001 年,马克斯-普朗克医学应用研究所 Denk 课题组<sup>[39]</sup>将压电陶瓷作为扫描机构,应用于微型化 TPM。2006 年,华盛顿大学 Li 课题组<sup>[40]</sup>首次报道了压电陶瓷管驱动双包层光纤扫描式双光子内窥镜系统。压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的典型结构如图 2 所示。飞秒脉冲激光器输出的飞秒脉冲依次经过光栅对、色散管理模块及二向色镜(DM)后透射,然后通过耦合透镜(CL)耦合进入双包层光纤(DCF)纤芯并传输至生物组织表面。压电陶瓷管与双包层光纤构成压电陶瓷光纤扫描器,通过对压电陶瓷管施加幅度调制的交流信号可实现螺旋形扫描成像。激发的荧光信号通过双包层光纤的包层后反向传输至光电倍增管,用于信号采集。该双光子内窥

镜系统样机成像的横向分辨率为  $2 \mu\text{m}$ ,帧率为 2.6 frame/s,集成探头直径为 2.4 mm。

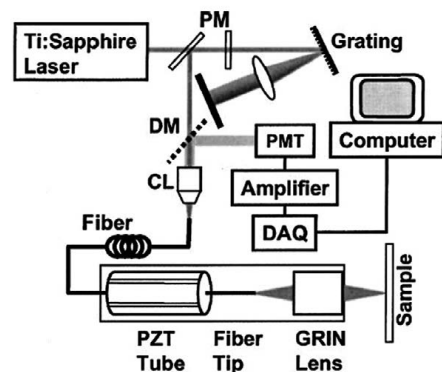


图 2 压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统<sup>[40]</sup>  
Fig. 2 Schematic of PZT scanning TPEM<sup>[40]</sup>



在压电陶瓷扫描式的远端扫描方案中,激发光和荧光共用一根双包层传输光纤,整个光路呈直筒状,因此该扫描方案在探头横向尺寸上比 MEMS 扫描式远端扫描方案更具集成优势。在临床内窥成像的应用环境中,内窥镜探头的封装直径越小,对病人的创伤越小。基于此,压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术是近年来国内外研究团队聚焦的关键技术。压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的关键在于其微型化成像用内窥集成探头的研制。集成探头内的核心器件包括传输用双包层光纤、微型显微物镜及压电陶瓷光纤扫描器,这些核心器件的性能直接决定了双光子内窥镜系统的成像质量。

压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统对双包层光纤的性能要求较为严苛。双包层光纤具备双重传输功能,其中的光纤纤芯用于低损耗、低色散地传输飞秒脉冲,光纤包层用于反向传输 TPF、SHG 等荧光信号。光纤涂覆层介质的折射率低于包层介质的折射率,因此,包层的荧光信号满足全反射条件,可以稳定传输。包层的数值孔径越高,对荧光信号的收集能力就越强。双光子内窥镜系统用双包层光纤可以分为实心双包层光纤及空心双包层光纤。飞秒脉冲在实心双包层光纤中传输时会因非线性效应而导致脉宽展宽,因此需要用复杂的光栅对、棱镜对等色散管理模块进行色散补偿<sup>[41]</sup>。近年来,随着特种光纤技术的发展,空心光纤以其低损耗、低色散、宽带宽传输等优异的特性<sup>[42-43]</sup>,被众多研究者关注并应用于非线性光学成像技术领域。2014 年,不列颠哥伦比亚大学 Tang 课题组<sup>[44]</sup>报道了啁啾光子晶体光纤(PCF)在超短脉冲传输上的传输损耗及色散特性:在传输波长 780 nm 下,光纤的群速度色散(GVD)约 0.46 ps/(nm·km),传输损耗约为 5.1 dB/m±2 dB/m。高传输损耗特性限制了该光纤在双光子内窥镜系统中的进一步应用。2019 年,维也纳医科大学 Unterhuber 课题组<sup>[45]</sup>报道了 Kagome 空心光子晶体光纤的超短脉冲传输特性:在无色散预补偿条件下,脉冲在 1 m 光纤中传输后可实现 10 fs 和 6.6 nJ 的单脉冲输出,同时可以保证 80% 的输出效率。此外,该课题组通过台式 TPM 对小鼠肠道切片进行成像实验,验证了该 Kagome 光纤优秀的导光能力。尽管以上工作验证了空心光纤在超短脉冲传输上的优异性能,但由于上述光纤不具备双包层结构,因此无法在压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统中直接应用。2018 年,法国艾克斯-马赛大学 Rigneault 课题组<sup>[46]</sup>首次报道了双包层 Kagome 光纤,并实现了 TPF、SHG 和相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)多模态非线性内窥镜系统。2020 年,法国里尔大学的 Kudlinski 课题组<sup>[47]</sup>报道了非线性内窥镜系统用双包层反谐振光纤(DC-ARF),该光纤在 700~1000 nm 范围内以小于 1 ps/(nm·km)的群速度色散(GVD)传输飞秒脉冲。但是,Kagome 及反谐振光纤的输出数

值孔径较低。为了实现高分辨率成像,通常采用熔接微珠<sup>[46-47]</sup>以及熔接梯度折射率透镜光纤<sup>[48]</sup>等方法对光纤端面进行处理,以实现较高的数值孔径输出。

微型显微物镜是双光子内窥镜系统实现高分辨率高信噪比荧光成像的关键成像器件。与宽场及共聚焦内窥镜系统不同的是,双光子内窥镜系统使用近红外波长光源作为激发光,同时收集可见光波长的荧光信号。在保证高数值孔径以满足高成像分辨率的前提下,微型显微物镜需要同时对轴外像差进行校正以及对不同工作波长进行消色差处理,这使得高性能微型显微物镜的设计及加工极具挑战性。微型透镜组及梯度折射率透镜是微型显微物镜的两种主要实现形式,其中:微型透镜组可以根据设计校正像差,能够保证成像质量,但较难实现 1 mm 以下的封装尺寸;梯度折射率透镜成本低廉、尺寸小巧且表面为平面,便于内窥探头集成封装,在深部生物组织的中继成像上具有优势,但通常无法控制色差,成像视场有限<sup>[49]</sup>。2010 年,康奈尔大学 Xu 课题组<sup>[50]</sup>研制了一种针对 800 nm 波长设计的双视场微型显微物镜,其大视野成像(大视野成像视场为 1 mm×1 mm,分辨率为 2.2 μm)可以对大面积可疑区域进行筛查,从而确定病变区域;同时,其高分辨(高分辨率成像视场为 188 μm×188 μm,分辨率为 0.98 μm)双光子成像可以实现精准诊断。2013 年,该课题组<sup>[51]</sup>研制了针对 800 nm 双光子成像与 406 nm 单光子成像的双视场微型显微物镜(大视野成像视场为 1.3 mm×1.3 mm,分辨率为 4.5 μm;高分辨率成像视场为 160 μm×160 μm,分辨率为 0.57 μm),并对未染色的肿瘤小鼠肺部组织进行了成像验证实验<sup>[52]</sup>。2014 年,该课题组<sup>[53]</sup>面向前列腺癌诊断需求,研制了基于梯度折射率透镜的手持式双光子内窥镜系统;该系统的内窥探头集成直径为 1 mm,刚性长度为 80 mm;其中的梯度折射率透镜能够实现光学中继及成像。2015 年,霍华德休斯医学研究所 Ji 课题组与 Aponte 课题组<sup>[54]</sup>联合开发了基于梯度折射率透镜的微创双光子内窥镜系统,首次以亚细胞分辨率对小鼠黑质(深度 4.4 mm)及下丘脑外侧(深度 5.0 mm)的神经元活动实现了观测。2017 年,日本埼玉大学 Sato 课题组与 Nakai 课题组<sup>[55]</sup>联合开发了配置梯度折射率透镜与电调谐透镜的快速变焦双光子内窥镜系统,并采用该系统实现了小鼠背侧 CA1 海马和杏仁核的在体多焦面钙信号成像。围绕微型显微物镜这一核心器件的技术研发对于双光子内窥镜系统实现在体原位实时光学活检具有重要意义。研发消色差高数值孔径微型显微物镜有助于双光子内窥镜系统实现更高的成像分辨率。降低微型显微物镜的封装直径有助于双光子内窥镜系统最终走向临床应用。

压电陶瓷光纤扫描器基于压电器件的逆压电效应工作。在外加电场作用下,压电器件会产生微小的机

械变形,且形变量与电场强度呈正相关关系。将光纤与压电器件连接,并施加一定频率的交变电压,就可以借助压电器件的微小位移带动光纤谐振实现二维扫描。不同结构、不同尺寸的扫描器的谐振特性不同,因此具有不同的扫描轨迹。压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统可以实现的二维扫描方式包括螺旋形<sup>[56-58]</sup>、李萨如图形<sup>[59-62]</sup>和栅格形<sup>[63-64]</sup>三种。螺旋形扫描是目前实现压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的主流扫描方案。压电陶瓷扫描的驱动形式及轨迹特点可参见综述文献<sup>[65]</sup>,在此不再赘述。压电陶瓷扫描器的谐振特性会影响双光子内窥镜系统的扫描帧率及视场。从硬件优化角度来看,通过降低光纤悬臂的长度来提升扫描器的谐振频率<sup>[66]</sup>以及采用光纤扫描驱动信号制动策略<sup>[67-68]</sup>等均是提升成像帧率的有效方法。探索光纤端面工程方法可以拓展成像视场<sup>[69]</sup>及提高成像通量。实现高帧率、低畸变、小型化扫描压电陶瓷扫描器件的国产批量化制备,对于研制面向临床医学成像用双光子内窥镜系统具有重要价值。

近年来,众多国内外研究单位持续对传输用双包层光纤、微型显微物镜和压电陶瓷光纤扫描器等核心器件进行技术攻关及改进,在双光子微型化内窥探头

集成技术上取得了重要突破,并在此基础上研制了不同的压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统,采用这些系统开展了生物医学领域的成像应用研究。接下来重点介绍近几年国内外压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的代表性研究进展。

### 3 压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的研究进展

#### 3.1 国际研究进展

2011年,美国康奈尔大学 Xu 课题组<sup>[70]</sup>报道了压电双晶片栅格扫描式双光子内窥镜系统,该系统的成像指标如下:横向分辨率为  $0.8 \mu\text{m}$ ,成像视场为  $110 \mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$ ,帧率为  $4.1 \text{ frame/s}$ 。该课题组研制的集成探头的外径为  $3 \text{ mm}$ ,刚性长度为  $40 \text{ mm}$ ,如图 3(a)所示。图 3(b)~(d)展示了该系统对  $50 \sim 70 \mu\text{m}$  深度处小鼠肺部的 TPF 成像结果,在图 3(b)所示图像中可见肺泡壁(箭头 w)和管腔(字母 a),在图 3(c)所示图像中可见支气管(箭头 b)。图 3(e)~(g)展示了距表面  $35 \sim 55 \mu\text{m}$  深度处小鼠结肠的 TPF 成像结果,在图 3(e)所示图像中可见肠细胞(字母 e),在图 3(f)所示图像中存在隐窝(箭头 c)和杯状细胞(箭头 g)。

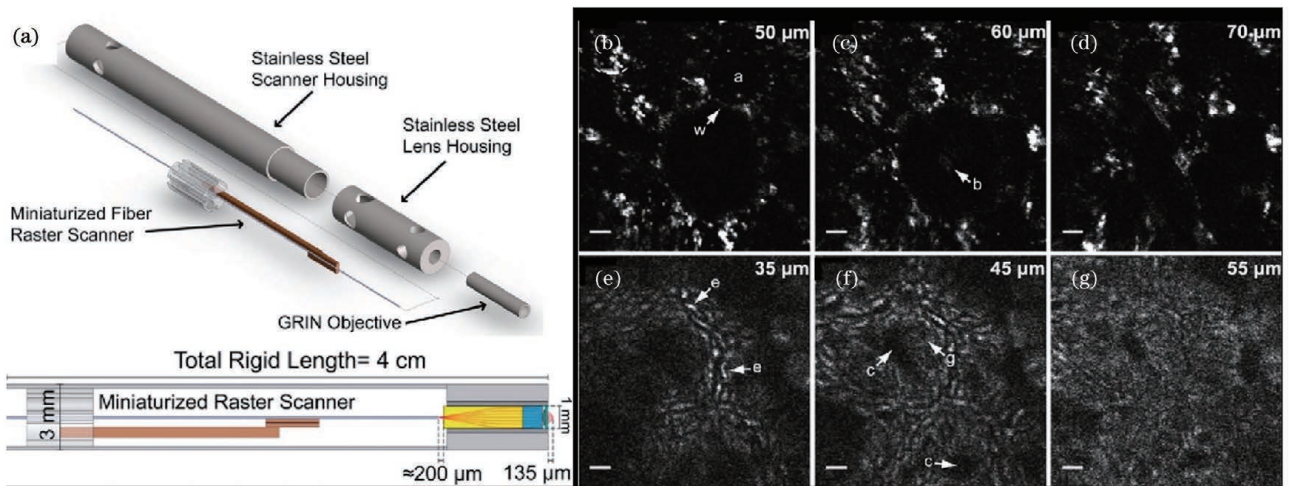


图 3 栅格扫描式双光子内窥镜系统及其成像结果<sup>[70]</sup>。(a)系统示意图;(b)~(d)小鼠肺部的 TPF 成像结果;(e)~(g)小鼠结肠的 TPF 成像结果

Fig. 3 Raster scanning TPEM and its imaging<sup>[70]</sup>. (a) System schematic; (b)–(d) two-photon fluorescence (TPF) images of mouse lung; (e)–(g) TPF images of mouse colon

2015年,法国利摩日大学 Louradour 课题组<sup>[71]</sup>报道了基于压电陶瓷的螺旋扫描式双光子内窥镜系统,系统结构如图 4(a)所示。该系统的横向分辨率为  $0.8 \mu\text{m}$ ,成像视场为  $450 \mu\text{m} \times 450 \mu\text{m}$ ,帧率为  $8 \text{ frame/s}$ ;集成探头的外径为  $2.2 \text{ mm}$ ,刚性长度为  $37 \text{ mm}$ 。通过引入非线性光纤补偿传输光纤的脉冲展宽,探头端可输出脉宽不超过  $40 \text{ fs}$  的飞秒脉冲。该系统采用的是定制的空气-二氧化硅实心 DC-PCF,纯硅纤芯用于传输飞秒脉冲,群速度色散约为  $67 \text{ ps}/(\text{km} \cdot \text{nm})$ ,环形空气孔形成的双包层结构实现荧光收集。图 4(b)~(c)所示为 DC-PCF 的纤芯与

包层结构。该光纤同时具备保偏性能,可以实现 I 型胶原蛋白的非线性偏振测量<sup>[72]</sup>。图 4(d)所示为小鼠经纤维化诱导 6 d 后肾脏不同深度处的 TPF(红色)及 SHG(绿色)成像结果。

2017年,美国约翰斯·霍普金斯大学 Li 课题组<sup>[73]</sup>搭建了实时高灵敏度双光子内窥镜系统。该系统的横向分辨率为  $0.7 \mu\text{m}$ ,成像视场为  $110 \mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$ ,帧率为  $3 \text{ frame/s}$ ;集成探头的外径为  $2 \text{ mm}$ ,刚性长度为  $35 \text{ mm}$ 。图 5(a)为消色差微型显微物镜的结构,该物镜中的梯度折射率透镜 1 用于将光纤出射的光束准直,梯度折射率透镜 2 与平凸透镜实现高



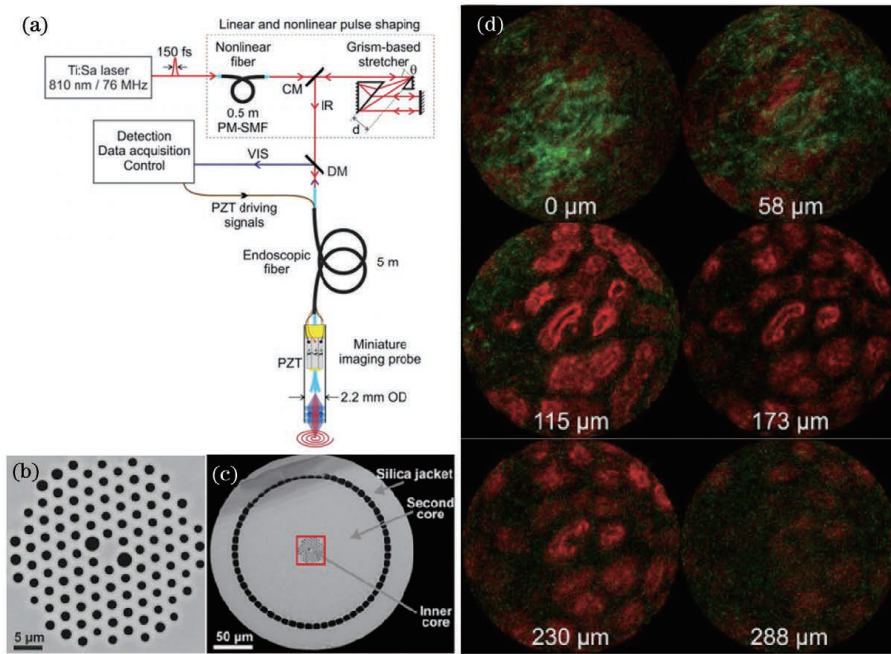


图 4 压电陶瓷螺旋扫描双光子内窥镜系统<sup>[71]</sup>。(a)系统示意图;(b)DC-PCF 的纤芯结构;(c)DC-PCF 的包层结构;(d)小鼠肾脏不同深度处的成像结果

Fig. 4 PZT spiral scanning TPTEM<sup>[71]</sup>. (a) System schematic; (b) structure of DC-PCF inner core; (c) structure of DC-PCF cladding; (d) TPF images of mouse kidney at different depths

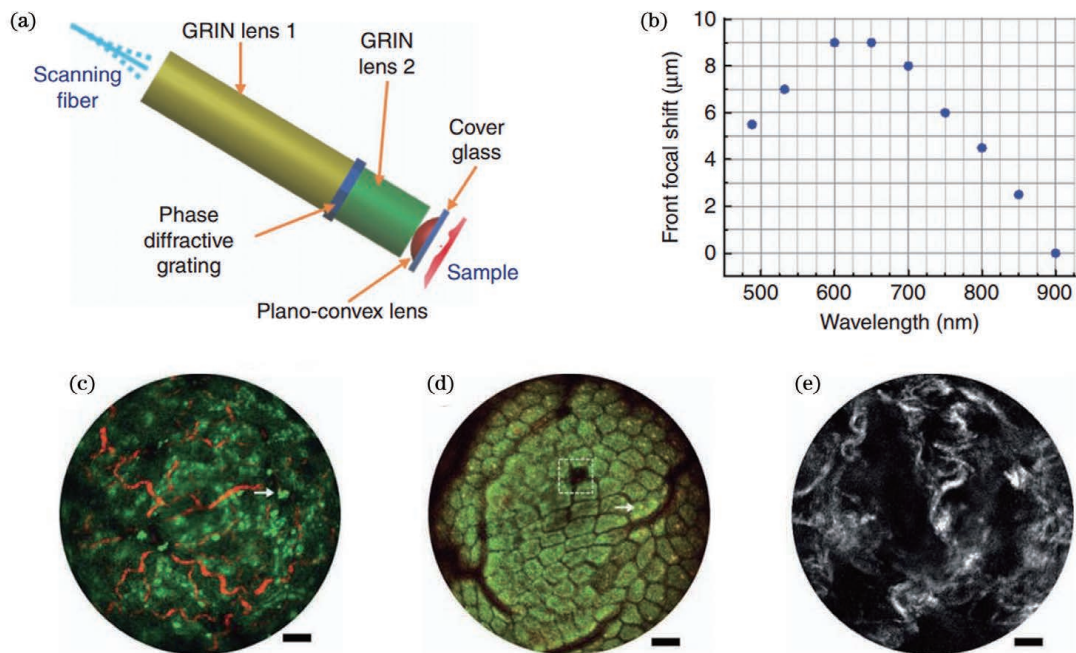


图 5 消色差微型物镜结构以及双光子内窥镜系统对小鼠不同组织的成像结果<sup>[73]</sup>。(a)消色差微型物镜结构;(b)焦距测试结果;(c)小鼠肝脏的成像结果;(d)小鼠小肠的成像结果;(e)小鼠宫颈组织的成像结果

Fig. 5 Structure of achromatic micro-objective and TPTEM imaging of different mouse tissues<sup>[73]</sup>. (a) Structure of achromatic micro-objective; (b) focal shift test results; (c) images of mouse liver; (d) image of mouse small intestine; (e) image of mouse cervix tissue

数值孔径会聚,圆形相位衍射光栅用于抵消色差从而减小焦移。由图 5(b)所示的物镜焦移测试结果可知,在 480~900 nm 波段,该微型物镜的焦移控制在 10 μm 以下。图 5(c)所示为离体小鼠肝脏的成像结果,图中箭头所示的 TPF 信号来自维生素 A。图 5(d)

所示为小鼠小肠上皮细胞的成像结果,虚线框所示为杯状细胞。图 5(e)所示为早产小鼠模型宫颈组织中胶原纤维结构的 SHG 成像结果。此外,研究人员采用该微型化双光子内窥镜系统首次实现了对活体小鼠肾皮质小管代谢的实时监测<sup>[74]</sup>,关于这一部分成像结

果的详细介绍请参考本文 4.1 节。

2019 年,韩国科学技术研究院 Jeong 课题组<sup>[75]</sup>报道了基于压电陶瓷的李萨如扫描式双光子内窥镜系统。该系统的横向分辨率为  $0.7\ \mu\text{m}$ ,成像视场为  $60\ \mu\text{m}\times 60\ \mu\text{m}$ ,帧率为 5 frame/s;集成探头的外径为 2.6 mm,刚性长度为 30 mm。图 6(a)~(b)所示为该微型化内窥探头的结构及外观。由图 6(c)可以看出,该压电陶瓷光纤扫描器的结构特点是双包层光纤制备的三个  $0.5\ \text{mm}\times 0.5\ \text{mm}\times 0.5\ \text{mm}$  的硅基质量块和

一个微弹簧。它们可以实现压电陶瓷扫描器双轴谐振频率的分离,从而降低两轴的机械串扰,提高扫描过程中的成像均匀度<sup>[76]</sup>。在 2.5、10、20、50、100 ms 内获得的稳定李萨如扫描图像如图 6(d)所示。图 6(e)所示为 Alexa Fluor 488 染色小鼠肾脏肾小管结构切片的 TPF 成像结果。图 6(f)~(g)所示为静脉注射异硫氰酸荧光素(FITC)后小鼠小肠及耳部微血管的 TPF 成像结果。尽管该刚性调制方法可使压电陶瓷光纤扫描器的成像均匀度提升,但成像视场相比常规扫描方案要小。

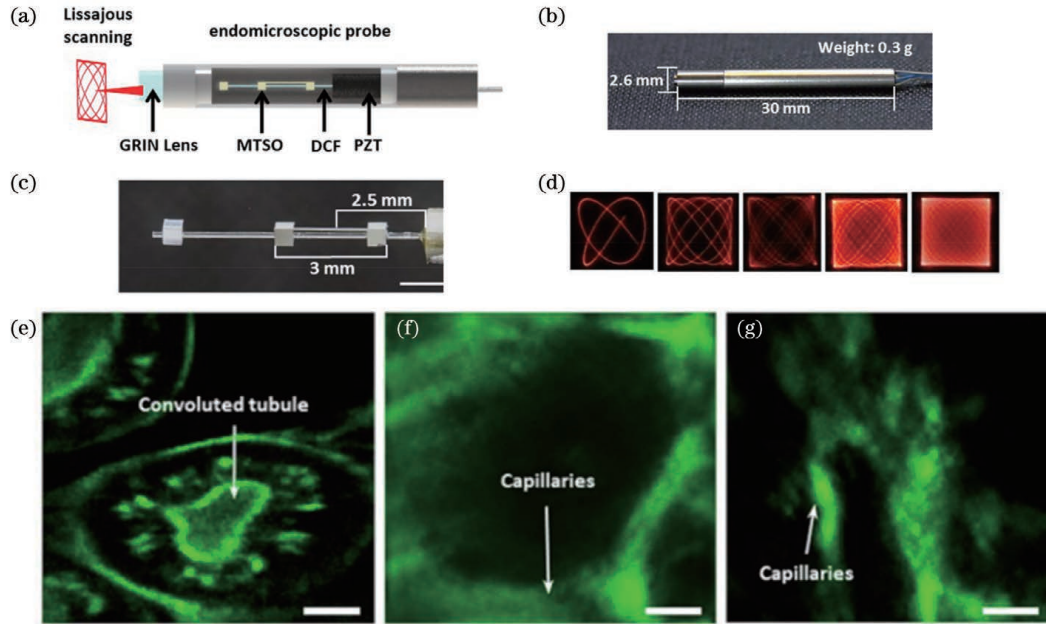


图 6 李萨如扫描双光子内窥镜系统的探头结构、外观以及该系统对小鼠不同组织的 TPF 成像结果<sup>[75]</sup>。(a)~(b)探头结构及外观;(c)李萨如式压电陶瓷光纤扫描器的结构;(d)2.5、10、20、50、100 ms 内李萨如扫描轨迹;(e)小鼠肾脏切片的 TPF 成像结果;(f)小鼠小肠的 TPF 成像结果;(g)小鼠耳部的 TPF 成像结果

Fig. 6 Structure and appearance of TPTEM probe based on Lissajous scanning and TPF images of mouse tissues captured by TPTEM<sup>[75]</sup>. (a)~(b) Structure and appearance of probe; (c) structure of Lissajous PZT fiber scanner; (d) time-lapse images for Lissajous scanning captured for 2.5, 10, 20, 50, and 100 ms; (e) TPF image of mouse liver slice; (f) TPF image of mouse small intestine; (g) TPF image of mouse ear

2021 年,德国 GRINTECH 公司 Messerschmidt 团队与莱布尼兹光子技术研究所 Popp 课题组<sup>[77]</sup>联合报道了基于 TPF、SHG 及相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)的多模态非线性内窥镜系统,其结构如图 7(a)所示。该系统的横向分辨率小于  $0.9\ \mu\text{m}$ ,视场为  $180\ \mu\text{m}\times 180\ \mu\text{m}$ ,帧率为 1 frame/s;集成探头的外径为 2.4 mm,刚性长度为 39 mm。使用图 7(b)所示的定制单模双芯纯硅双包层光纤分别传输斯托克斯光及泵浦光。采用图 7(c)所示的双波段消色差微型显微物镜实现低损耗、高峰值功率激光传输以及反向信号的高效采集。采用该系统对人体上皮组织进行 CARS 成像及 TPF 多模态成像,成像结果如图 7(d)~(e)所示。

### 3.2 国内研究进展

2016 年,华中科技大学付玲课题组<sup>[78]</sup>报道了四片压电片式双光子内窥镜系统,其结构如图 8(a)所示。该系统的横向分辨率为  $2.2\ \mu\text{m}$ ,视场为

$200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}$ ,成像帧率为 1.25 frame/s;集成探头的外径为 3.5 mm,刚性长度为 53 mm,如图 8(b)所示。通过对扫描器施加阻尼复位控制信号可以压缩非成像时段的占比,提高成像帧率。图 8(c)给出了经吡啶黄染色的离体小鼠结肠图像,在图中可见单个肠细胞及管状腺体。图 8(d)所示为离体小鼠肺部组织的管腔和肺泡壁结构。

2018 年,北京航空航天大学冯丽爽课题组与北京大学王爱民课题组<sup>[79]</sup>联合报道了一款高收集效率微型显微物镜,该物镜的外观如图 9(a)所示。物镜像方工作距离为  $150\ \mu\text{m}$ ,便于内窥探头紧贴生物组织使用。为了提高荧光收集效率,他们对显微物镜进行了轴向色差优化设计。仿真结果显示,该显微物镜的荧光收集效率较梯度折射率透镜提高了 2 倍以上。2021 年,该联合课题组报道了基于 DC-ARF 的压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统<sup>[80]</sup>,并证实了 DC-ARF 在无端面工程方法下的成像能力。光纤端面结构如图 9(b)



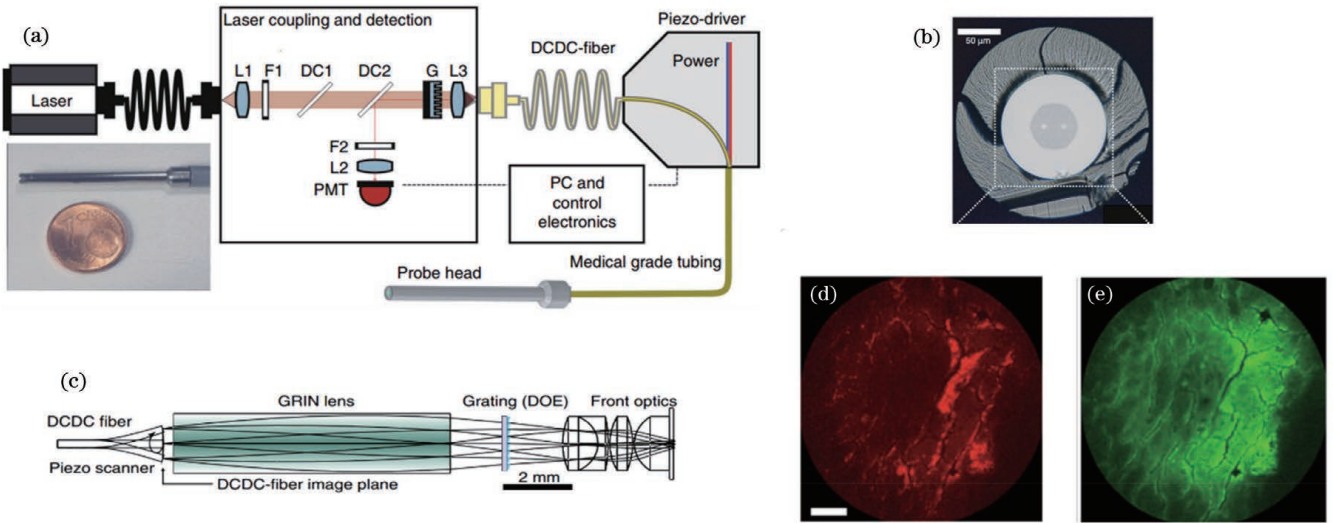


图 7 多模态内窥镜系统的结构及其成像结果<sup>[77]</sup>。(a)系统结构;(b)双芯纯硅双包层光纤的结构;(c)消色差物镜的结构;(d)人体上皮组织的 CARS 成像结果;(e)人体上皮组织的 TPF 成像结果

Fig. 7 Structure and imaging of multimodal endomicroscopy<sup>[77]</sup>. (a) System structure; (b) structure of double-core pure silica double-clad fiber (DCF); (c) structure of achromatic objective; (d) coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) image of human epithelial tissue; (e) TPF image of human epithelial tissue

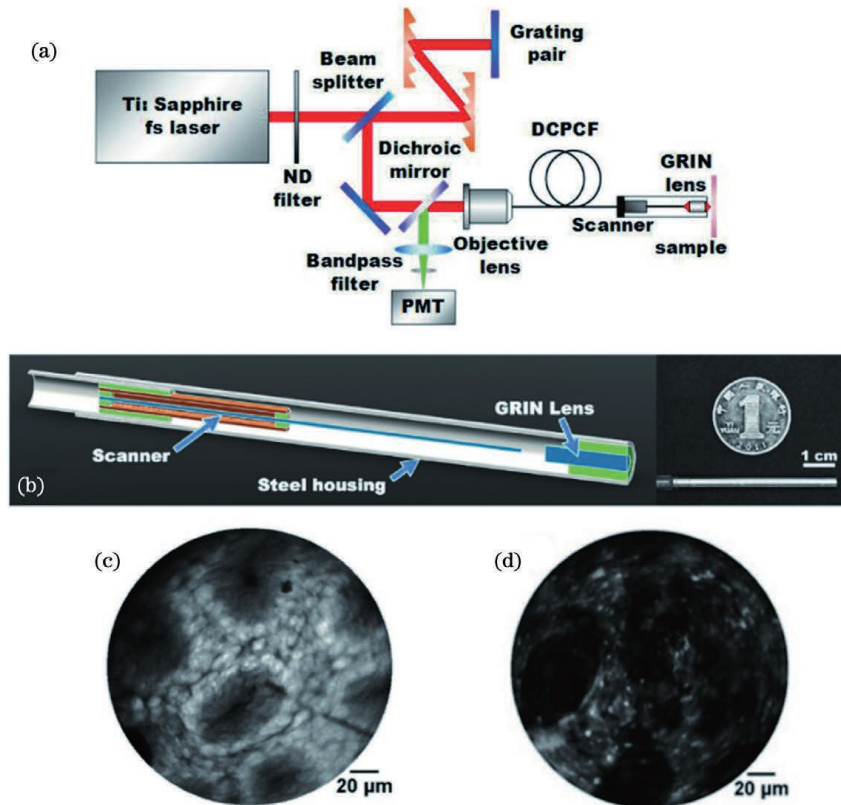


图 8 双光子内窥镜系统的探头结构以及系统成像结果<sup>[78]</sup>。(a)四片压电片式双光子内窥镜系统;(b)集成探头的结构及外观;(c)~(d)离体小鼠结肠及肺部图像

Fig. 8 Probe structure and imaging of TPME<sup>[78]</sup>. (a) Schematic of four-plate piezoelectric TPME; (b) structure and photograph of integrated TPME probe; (c)–(d) images of mouse colon and lung

所示,系统结构如图 9(c)所示。DC-ARF 的群速度色散约为  $5.5 \text{ ps}/(\text{nm} \cdot \text{km}) @ 920 \text{ nm}$ ,在  $800 \sim 1000 \text{ nm}$  波段内的传输损耗小于  $0.15 \text{ dB/m}$ ,这意味着该光纤具有宽带宽、低损耗、低色散导光的优异特性。该系统的横向分辨率为  $3.1 \mu\text{m}$ ,视场为  $200 \mu\text{m} \times$

$200 \mu\text{m}$ ,帧率为  $0.7 \text{ frame/s}$ ;集成探头的外径为  $5.8 \text{ mm}$ ,刚性长度为  $49.1 \text{ mm}$ ,如图 9(d)所示。图 9(e)为倒置显微镜拍摄的胃壁组织切片图像,图 9(f)~(g)为双光子内窥镜系统对胃壁组织切片的成像结果,胃小凹、腺体及胃上皮结构清晰可见,

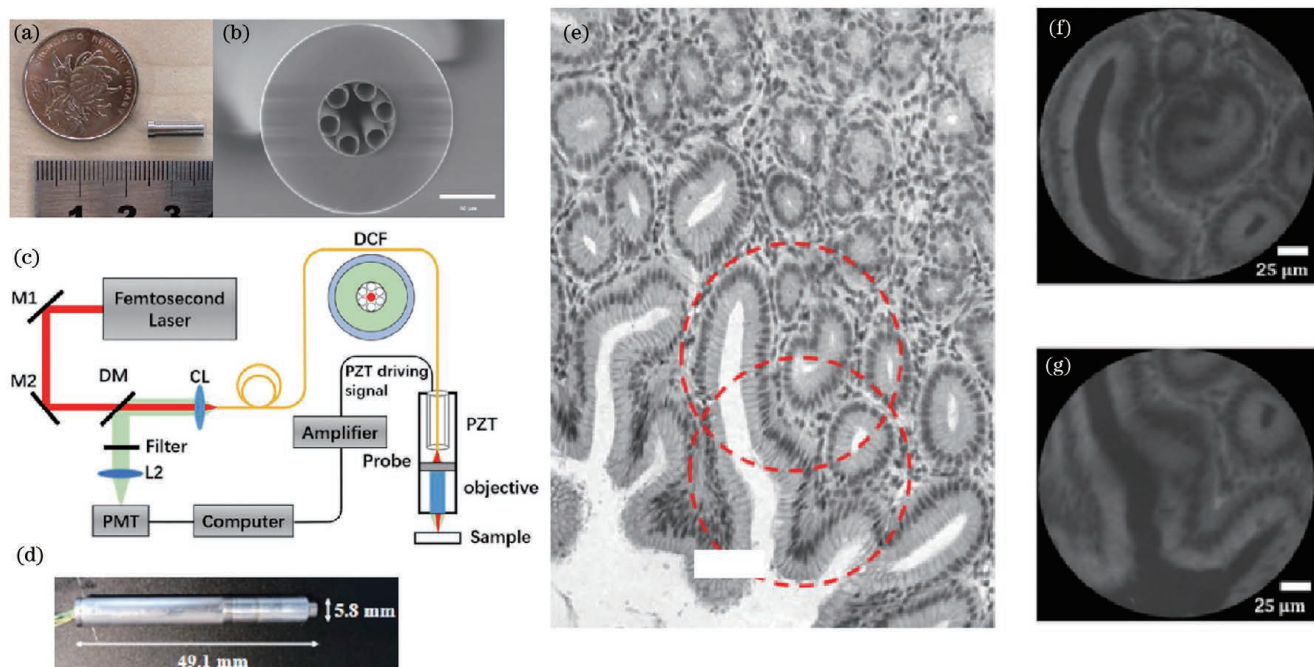


图 9 压电陶瓷螺旋扫描式双光子内窥镜系统及其成像结果<sup>[79-80]</sup>。(a)微型显微物镜外观;(b)DC-ARF 结构;(c)压电陶瓷螺旋扫描式双光子内窥镜系统示意图;(d)集成探头外观;(e)光学显微镜采集的胃壁切片图像;(f)~(g)胃壁切片的 TPF 成像结果

Fig. 9 PZT spiral scanning TPEM and its imaging<sup>[79-80]</sup>. (a) Appearance of miniature micro-objective; (b) structure of DC-ARF; (c) schematic of PZT spiral scanning TPEM; (d) appearance of integrated TPEM probe; (e) inverted microscope captured stomach wall slice image; (f)–(g) TPF images of stomach wall slice

验证了该系统对组织结构的成像能力。2022 年,该课题组在理论仿真与实验测试的基础上,探索了微型化双光子内窥集成探头成像分辨率的提升方法<sup>[81]</sup>,他们通过熔接机放电将微珠附着于 DC-ARF 纤芯中(以扩大其输出数值孔径),将系统的成像分辨率提升至  $1.3 \mu\text{m}$ 。

由目前国内外该领域的研究进展可以看出,压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统的集成技术已经取得长足进展,成像性能和集成化探头尺寸基本可以满足内窥镜的应用需求,该技术对生物组织器官原位、实时、无创、高分辨率结构及功能成像的能力已经得到充分验证。一部分研究单位仍聚焦在双光子内窥集成探头指标提升方案的研究上,以期通过核心器件的优化以及新原理和新方法的引入进一步推动压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术指标的提升;相当一部分研究单位则开展了满足临床生物安全性及兼容性需求的小型化内窥成像系统的研制以及该系统在生物医学成像领域的应用。

## 4 成像应用

### 4.1 组织器官的结构成像及功能成像

生物细胞及组织中含有黑色素、弹性蛋白、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)等内源性荧光物质,这些物质在不用外加染色剂的条件下就可以发生双光子荧光效应,并产生特定

波长的信号光。细胞内 NADH、FAD 的含量与细胞代谢水平密切相关,可用于评估细胞及组织的功能状态。2017 年,美国约翰斯·霍普金斯大学 Li 课题组<sup>[69]</sup>基于小鼠肾缺血再灌注模型,研究了双光子内窥镜系统用于活体小鼠肾皮质小管氧化还原率的功能成像。氧化还原率的定义为 FAD 含量与 NADH 和 FAD 总含量的比值。缺血时,NADH 浓度增加,氧化还原率下降,供氧时反之。图 10(a)~(c)、图 10(d)~(f)、图 10(g)~(i)分别表示缺血前、缺血中、再供血三种状态下的成像结果。可见,当肾脏处于缺血状态时,氧化还原率减小,出现红色区域,如图 10(f)所示;再供血后,氧化还原率恢复,红色区域消失,如图 10(i)所示。双光子荧光寿命成像技术可以记录双光子激发下荧光信号随时间衰减的动态信息,NADH 及 FAD 的荧光寿命观测结果可为肿瘤检测及诊断提供参考<sup>[82-85]</sup>。2022 年,深圳大学屈军乐课题组与刘丽炜课题组<sup>[86]</sup>报道了基于光纤束的双光子内窥荧光寿命成像系统,该系统的部分成像结果如图 10(j)~(r)所示。图 10(j)~(l)、图 10(m)~(o)、图 10(p)~(r)分别表示肾脏、肝脏及异种移植肿瘤的双光子荧光强度、双光子荧光寿命及 HE 染色成像结果。实验结果表明,双光子荧光寿命成像特征在对比度上优于强度图像。以上成像结果展示了双光子内窥镜系统在生物医学领域对组织器官进行无标记结构成像及功能成像的广阔前景。



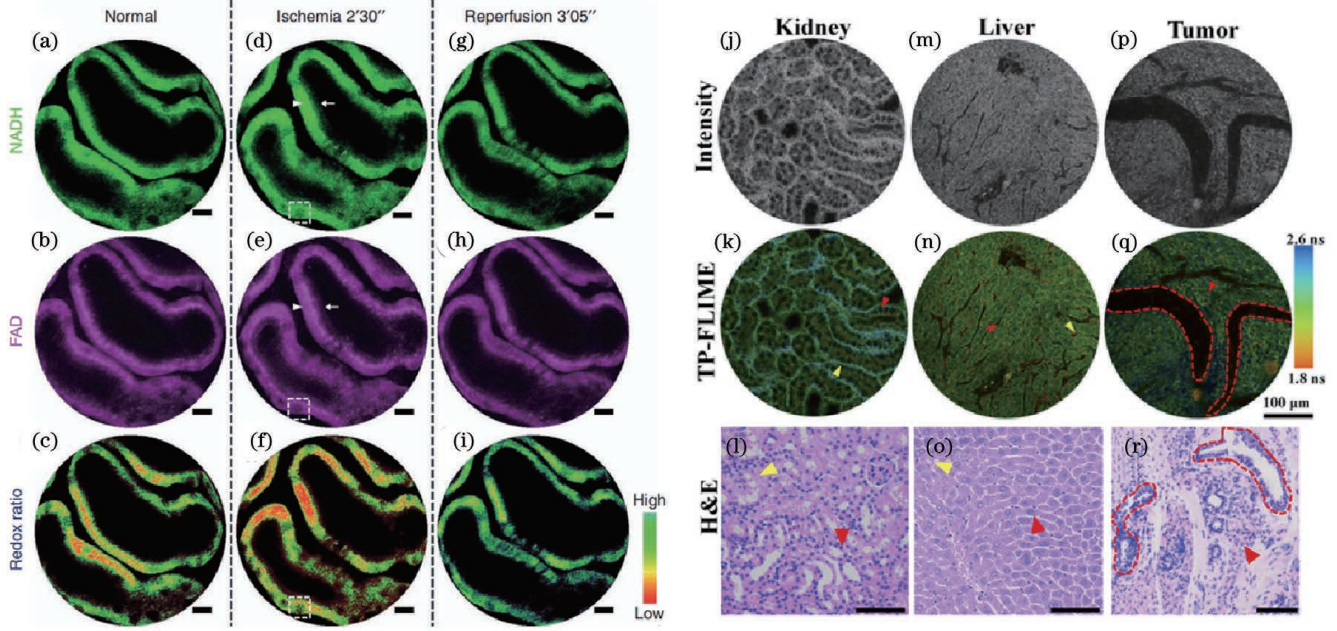


图 10 组织成像。(a)~(i)小鼠肾脏缺血再灌注模型氧化还原率的双光子成像结果<sup>[69]</sup>；(j)~(r)肾脏、肝脏及异种移植肿瘤的荧光强度、荧光寿命及 HE 染色成像结果<sup>[86]</sup>

Fig. 10 Tissues imaging. (a)–(i) TPF redox images of mouse kidney ischemia-reperfusion model *in vivo*<sup>[69]</sup>; (j)–(r) fluorescence intensity, lifetime and HE staining images for kidney, liver and tumor<sup>[86]</sup>

#### 4.2 自由活体运动动物脑成像

在神经科学领域,脑成像技术是探索人类大脑奥秘的必要手段。光学成像技术具有特异性、时空分辨率高、多模态复合、安全性高等优势<sup>[87]</sup>。发展实现大脑神经元及神经网络活动持续稳定观察和动态数据获取的新型光学成像系统,从而实现分析、理解和模仿大脑,对于脑科学研究来说至关重要<sup>[88]</sup>。

2017年,北京大学程和平院士课题组<sup>[89]</sup>报道了面向脑科学应用的 MEMS 扫描式第一代高时空分辨率微型化双光子显微镜系统。该系统采用 920 nm 高性能传输 PCF 实现生物探针 GCaMP6s 的高效率激发,配合高数值孔径微型显微物镜成像及定制的收集光纤束对荧光信号进行高效收集。基于以上核心器件,该系统实现了与台式 TPM 相媲美的成像质量。

该系统的横向分辨率为  $0.65 \mu\text{m}$ ,视场为  $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ ,帧率为 40 frame/s。集成微型化探头重 2.15 g,外观如图 11(a)所示。图 11(b)为 GCaMP6f 表达小鼠神经元胞体的成像结果。该微型化双光子显微镜系统可对自由活体运动动物大脑神经结构的动力学信息实现高速高分辨率成像。2021年,该课题组研发了 MEMS 扫描式第二代大视场三维微型化双光子显微镜系统<sup>[90]</sup>。该系统的成像视场拓展至  $420 \mu\text{m} \times 420 \mu\text{m}$ ,成像范围是第一代双光子显微镜系统的 7.8 倍。该系统的探头集成了轴向扫描机制,并将物镜工作距离扩展至 1 mm,集成微型化探头重 4.2 g,外观如图 11(c)所示。图 11(d)所示为 GCaMP6s 表达小鼠神经元的三维成像结果。该微型化显微镜系统可以实现三维空间内近千个神经网络集群的成像,并

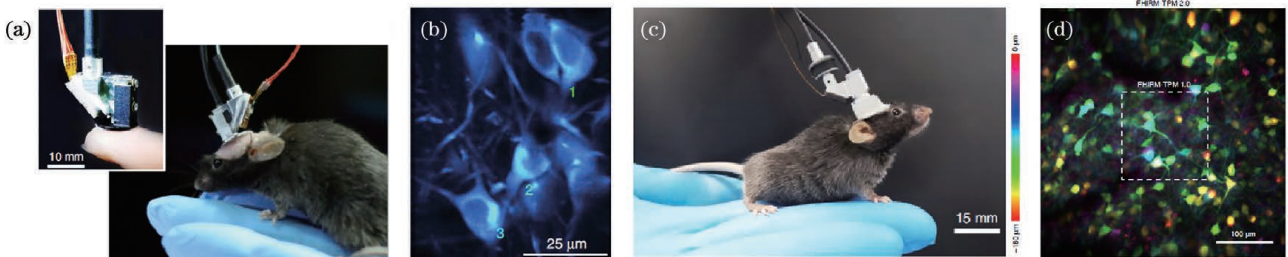


图 11 用于自由活体小鼠脑成像的微型化双光子显微镜系统。(a)微型化双光子显微镜探头的外观(指尖及小鼠佩戴)<sup>[89]</sup>；(b)GCaMP6f 表达小鼠神经元胞体的成像结果<sup>[89]</sup>；(c)大视场三维微型化双光子显微镜探头的外观(小鼠佩戴)<sup>[90]</sup>；(d)GCaMP6s 表达小鼠神经元三维成像结果<sup>[90]</sup>

Fig. 11 Miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice. (a) Appearance of miniature two-photon microscopy probe on a fingertip and mounted to mouse head<sup>[89]</sup>; (b) image of neuronal somata in GCaMP6f-expressing mouse<sup>[89]</sup>; (c) appearance of enlarged field-of-view, three-dimensional miniature two-photon microscopy probe mounted to mouse head<sup>[90]</sup>; (d) three-dimensional image of neurons in GCaMP6s-expressing mouse<sup>[90]</sup>

可对同一视野内的神经元进行长达一个月的成像观测记录。

压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统近年来被研究人员拓展到了自由活体动物脑成像的应用研究中。2021 年,美国约翰斯·霍普金斯大学 Li 课题组<sup>[91]</sup>报道了压电陶瓷扫描式双光子内窥镜系统应用于自由活体小鼠脑成像的研究进展,探头外观如图 12(a)所示。光电换向器使内窥探头具有主动

旋转跟踪和补偿能力。该系统能够同时稳定记录自由行为小鼠运动皮层中 50 多个神经元的钙离子动态变化,GCaMP6m 表达小鼠神经元树突的成像结果如图 12(b)~(d)所示。2022 年,该课题组提出了基于深度学习及欠采样策略的提高成像速度的方法,该方法可使双光子内窥镜系统以 26 frame/s 的视频级帧率成像,同时保持了较高的信噪比和成像分辨率<sup>[92]</sup>。

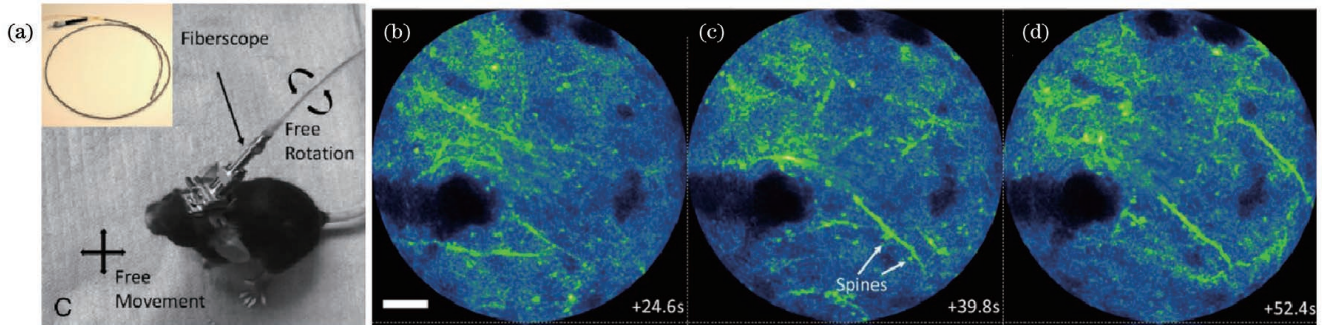


图 12 压电陶瓷扫描式双光子显微镜探头及成像结果<sup>[91]</sup>。(a)探头外观(小鼠佩戴);(b)~(d)GCaMP6m 表达小鼠树突成像结果  
Fig. 12 Probe and imaging of PZT-scanning two-photon microscopy<sup>[91]</sup>. (a) Appearance of probe attached to the head of a freely behaving mouse; (b)~(d) images of GCaMP6m-expressing mouse dendritic spines

## 5 结束语

作为亚细胞尺度的光学活检技术,双光子内窥成像技术可以实现生物组织在体原位实时结构成像及功能成像,具有重要的科学研究价值以及广阔的临床应用前景。本文首先介绍了双光子成像的基本原理以及双光子内窥显微镜系统的基本结构,概述了双光子内窥的分类,指出了压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术是目前主流的研究方案;随后,重点阐述了近年来压电陶瓷扫描式双光子内窥系统核心器件技术的突破性进展。在此基础上,本文介绍了该领域近年来颇具代表性的扫描式双光子内窥系统的研究进展,总结了其在组织器官结构、功能成像以及自由活体运动动物脑成像方面的应用。

关于双光子内窥成像技术的未来发展,有以下建议:1)进一步提升核心器件的性能,提升压电陶瓷扫描式双光子内窥系统的成像指标及成像通量。随着光通信用低传输损耗光纤制造技术、先进微纳加工及集成技术、增强现实/虚拟现实(AR/VR)光显示技术等新技术的发展,双包层光纤、微型显微物镜以及具有高谐振频率可精密控制的压电陶瓷扫描器得到快速发展。研究人员一方面可围绕双光子内窥成像技术高分辨、大视场、快速实时成像的研究目标,设计高数值孔径微型显微物镜等核心器件,以提升成像分辨率,另一方面可研制高谐振频率压电陶瓷扫描器,以提升成像帧率。以上技术会进一步提升压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术的成像质量并拓展其应用范围。2)开展基于 MEMS 扫描振镜的双光子内窥系统的研究。随着面向自动驾驶用激光雷达技术的普及,高谐振频

率、大扫描范围 MEMS 扫描技术得到飞速发展。基于高速谐振超小型 MEMS 技术的内窥镜系统有望为双光子内窥成像技术拓展新的技术方向。3)开展一次性内窥镜技术研究。针对传统复用内窥镜结构复杂、很难彻底清洗和消毒、因交叉感染风险导致的使用不安全等问题,围绕核心器件的加工工艺突破及批量化生产开展研究,推动双光子内窥集成探头走向低成本、耗材化。4)探索以双光子成像技术为主的多模态成像技术。结合三光子<sup>[93-94]</sup>、相干拉曼散射<sup>[95]</sup>、共聚焦<sup>[96-97]</sup>、光学相干断层扫描<sup>[98-99]</sup>等光学成像技术,实现多模态、跨尺度、高时空分辨率融合的内窥成像。

可以预见,压电陶瓷扫描式双光子内窥成像技术作为双光子成像技术的重要研究方向之一,在未来重大应用需求牵引和医工交叉深度融合创新下,有望为生命科学研究和临床医学应用开启光学活检成像应用的新范式。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Min Y W, Min B H, Lee J H, et al. Endoscopic treatment for early gastric cancer [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(16): 4566-4573.
- [4] Tang Y B, Anandasabapathy S, Richards-Kortum R. Advances in optical gastrointestinal endoscopy: a technical review [J]. Molecular Oncology, 2021, 15(10): 2580-2599.
- [5] Axon A. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage[J]. Best Practice & Research Clinical



- Gastroenterology, 2006, 20(4): 697-708.
- [6] Li H, Hou X H, Lin R, et al. Advanced endoscopic methods in gastrointestinal diseases: a systematic review [J]. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery, 2019, 9(5): 905-920.
- [7] Sheena B, Richards-Kortum R R, Sharmila A. Progress and challenges of global high-resolution endoscopy [J]. International Archives of Internal Medicine, 2020, 4(1): 24.
- [8] 毛亚敏, 迟崇巍, 叶津佐, 等. 新型内窥镜成像系统的研究进展 [J]. 中国医疗器械信息, 2015, 21(10): 10-15.  
Mao Y M, Chi C W, Ye J Z, et al. Research development of new endoscopic imaging systems [J]. China Medical Device Information, 2015, 21(10): 10-15.
- [9] Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen [J]. Annalen Der Physik, 1931, 401(3): 273-294.
- [10] Kaiser W, Garrett C G B. Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2 : \text{Eu}^{2+}$  [J]. Physical Review Letters, 1961, 7(6): 229-231.
- [11] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.
- [12] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.
- [13] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [14] 李少强, 耿俊娴, 李艳萍, 等. 多光子成像技术的生物医学应用新进展 [J]. 物理学报, 2020, 69(22): 20201039.  
Li S Q, Geng J X, Li Y P, et al. New advances in biomedical applications of multiphoton imaging technology [J]. Acta Physica Sinica, 2020, 69(22): 20201039.
- [15] Svoboda K, Yasuda R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience [J]. Neuron, 2006, 50(6): 823-839.
- [16] Sahu P, Mazumder N. Advances in adaptive optics-based two-photon fluorescence microscopy for brain imaging [J]. Lasers in Medical Science, 2020, 35(2): 317-328.
- [17] Perry S W, Burke R M, Brown E B. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2012, 40(2): 277-291.
- [18] Wang J J, Zhen Z, Wang Y Q, et al. Non-invasive skin imaging assessment of human stress during head-down bed rest using a portable handheld two-photon microscope [J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 899830.
- [19] 应亚宸, 张广杰, 贾荟琳, 等. 多光子皮肤成像技术及其应用 [J]. 中国光学, 2019, 12(1): 104-111.  
Ying Y C, Zhang G J, Jia H L, et al. Multi-photon skin tissue imaging technology and its applications [J]. Chinese Optics, 2019, 12(1): 104-111.
- [20] Engelbrecht C J, Johnston R S, Seibel E J, et al. Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging *in vivo* [J]. Optics Express, 2008, 16(8): 5556-5564.
- [21] Hage C H, Leclerc P, Brevier J, et al. Towards two-photon excited endogenous fluorescence lifetime imaging microendoscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(1): 142-156.
- [22] Kučikas V, Werner M P, Schmitz-Rode T, et al. Two-photon endoscopy: state of the art and perspectives [J/OL]. Molecular Imaging and Biology, 2021: 1-15 [2022-06-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34779969/>.
- [23] 张子一, 王明雪, 刘志贺, 等. 二次谐波在生物医学成像中的应用 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207008.  
Zhang Z Y, Wang M X, Liu Z H, et al. Application of second harmonic generation in biomedical imaging [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207008.
- [24] Mostaçõ-Guidolin L, Rosin N L, 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.
- [25] Chen J X, Zhuo S M, Chen G, et al. Establishing diagnostic features for identifying the mucosa and submucosa of normal and cancerous gastric tissues by multiphoton microscopy [J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2011, 73(4): 802-807.
- [26] Yan J, Zheng Y, Zheng X L, et al. Real-time optical diagnosis of gastric cancer with serosal invasion using multiphoton imaging [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31004.
- [27] 董小玉, 刘秀敏, 刘张苑珠, 等. 胃肠道肿瘤的多光子成像与光学活检 [J]. 分子影像学杂志, 2017, 40(3): 344-349.  
Dong X Y, Liu X M, Liu Z Y Z, et al. Multiphoton imaging and optical biopsy of gastrointestinal tumors [J]. Journal of Molecular Imaging, 2017, 40(3): 344-349.
- [28] Chen D X, Liu Z, Liu W J, et al. Predicting postoperative peritoneal metastasis in gastric cancer with serosal invasion using a collagen nomogram [J]. Nature Communications, 2021, 12: 179.
- [29] Kantelhardt S R, Leppert J, Krajewski J, et al. Imaging of brain and brain tumor specimens by time-resolved multiphoton excitation microscopy *ex vivo* [J]. Neuro-Oncology, 2007, 9(2): 103-112.
- [30] Chen D F, Nauen D W, Park H C, et al. Label-free imaging of human brain tissue at subcellular resolution for potential rapid intra-operative assessment of glioma surgery [J]. Theranostics, 2021, 11(15): 7222-7234.
- [31] Flusberg B A, Cocker E D, Piyawattanametha W, et al. Fiber-optic fluorescence imaging [J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 941-950.
- [32] Göbel W, Kerr J N D, Nimmerjahn A, et al. Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiber bundle and a gradient-index lens objective [J]. Optics Letters, 2004, 29(21): 2521-2523.
- [33] Qiu Z, Piyawattanametha W. MEMS actuators for optical microendoscopy [J]. Micromachines, 2019, 10(2): 85.
- [34] Piyawattanametha W, Barretto R P J, Ko T H, et al. Fast-scanning two-photon fluorescence imaging based on a microelectromechanical systems two-dimensional scanning mirror [J]. Optics Letters, 2006, 31(13): 2018-2020.
- [35] Fu L, Jain A, Xie H K, et al. Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror [J]. Optics Express, 2006, 14(3): 1027-1032.
- [36] Tang S, Jung W, McCormick D, et al. Design and implementation of fiber-based multiphoton endoscopy with microelectromechanical systems scanning [J]. Journal of Biomedical Optics, 2009, 14(3): 034005.
- [37] Duan X, Li H, Qiu Z, et al. MEMS-based multiphoton endomicroscope for repetitive imaging of mouse colon [J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(8): 3074-3083.
- [38] Li G M, Duan X Y, Lee M, et al. Ultra-compact microsystems-based confocal endomicroscope [J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2020, 39(7): 2406-2414.
- [39] Helmchen F, Fee M S, Tank D W, et al. A miniature head-mounted two-photon microscope: high-resolution brain imaging in freely moving animals [J]. Neuron, 2001, 31(6): 903-912.
- [40] Myaing M T, MacDonald D J, Li X D. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope [J]. Optics Letters, 2006, 31(8): 1076-1078.
- [41] Zhang Y Y, Akins M L, Murari K, et al. A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(32): 12878-12883.
- [42] Litchinitser N M, Abeeluck A K, Headley C, et al. Antiresonant reflecting photonic crystal optical waveguides [J]. Optics Letters, 2002, 27(18): 1592-1594.
- [43] Wei C L, Weiblen R J, Menyuk C R, et al. Negative curvature fibers [J]. Advances in Optics and Photonics, 2017, 9(3): 562.
- [44] Yu J L, Zeng H S, Lui H, et al. Characterization and application of chirped photonic crystal fiber in multiphoton imaging [J]. Optics Express, 2014, 22(9): 10366-10379.
- [45] Andreatina M, Le T, Drexler W, et al. Ultrashort pulse Kagome hollow-core photonic crystal fiber delivery for nonlinear optical imaging [J]. Optics Letters, 2019, 44(7): 1588-1591.

- [46] Lombardini A, Mytskaniuk V, Sivankutty S, et al. High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope[J]. *Light: Science & Applications*, 2018(1): 932-939.
- [47] Kudlinski A, Cassez A, Vanvincq O, et al. Double clad tubular anti-resonant hollow core fiber for nonlinear microendoscopy[J]. *Optics Express*, 2020, 28(10): 15062-15070.
- [48] Septier D, Mytskaniuk V, Habert R, et al. Label-free highly multimodal nonlinear endoscope[J]. *Optics Express*, 2022, 30(14): 25020-25033.
- [49] 宗伟健. 微型双光子显微镜及自由活动小鼠神经成像[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- Zong W J. Miniature two-photon microscopy and neuroimaging of free-moving mice[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2017.
- [50] Chen M H, Xu C, Webb W W. Endoscope lens with dual fields of view and resolutions for multiphoton imaging [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(16): 2735-2737.
- [51] Ouzounov D G, Rivera D R, Webb W W, et al. Miniature varifocal objective lens for endomicroscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(16): 3103-3106.
- [52] Ouzounov D G, Rivera D R, Williams W O, et al. Dual modality endomicroscope with optical zoom capability[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(9): 1494-1503.
- [53] Huland D M, Jain M, Ouzounov D G, et al. Multiphoton gradient index endoscopy for evaluation of diseased human prostatic tissue *ex vivo* [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(11): 116011.
- [54] Bocarsly M E, Jiang W C, Wang C, et al. Minimally invasive microendoscopy system for *in vivo* functional imaging of deep nuclei in the mouse brain[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(11): 4546-4556.
- [55] Sato M, Motegi Y, Yagi S, et al. Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(9): 4049-4060.
- [56] Zhao Y B, Nakamura H, Gordon R J. Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(4): 1159-1172.
- [57] Li Z, Yang Z, Fu L. Scanning properties of a resonant fiber-optic piezoelectric scanner[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2011, 82(12): 123707.
- [58] Akhondi F, Qin Y K, Peyghambarian N, et al. Compact fiber-based multi-photon endoscope working at 1700 nm[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(5): 2326-2335.
- [59] Bazaei A, Yong Y K, Moheimani S O R. High-speed Lissajous-scan atomic force microscopy: scan pattern planning and control design issues [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2012, 83(6): 063701.
- [60] Tuma T, Lygeros J, Kartik V, et al. High-speed multiresolution scanning probe microscopy based on Lissajous scan trajectories[J]. *Nanotechnology*, 2012, 23(18): 185501.
- [61] Liang W X, Murari K, Zhang Y Y, et al. Increased illumination uniformity and reduced photodamage offered by the Lissajous scanning in fiber-optic two-photon endomicroscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(2): 021108.
- [62] Park H C, Seo Y H, Hwang K, et al. Micromachined tethered silicon oscillator for an endomicroscopic Lissajous fiber scanner [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(23): 6675-6678.
- [63] Li Z, Fu L. Note: a resonant fiber-optic piezoelectric scanner achieves a raster pattern by combining two distinct resonances [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2012, 83(8): 086102.
- [64] Do D, Yoo H, Gweon D G. Fiber-optic raster scanning two-photon endomicroscope using a tubular piezoelectric actuator[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(6): 066010.
- [65] Park H C, Guan H H, Li A, et al. High-speed fiber-optic scanning nonlinear endomicroscopy for imaging neuron dynamics *in vivo* [J]. *Optics Letters*, 2020, 45(13): 3605-3608.
- [66] Hwang K, Seo Y H, Jeong K H. Microscanners for optical endomicroscopic applications [J]. *Micro and Nano Systems Letters*, 2017, 5(1): 1-11.
- [67] Lee C M, Engelbrecht C J, Soper T D, et al. Scanning fiber endoscopy with highly flexible, 1 mm catheterscopes for wide-field, full-color imaging[J]. *Journal of Biophotonics*, 2010, 3(5/6): 385-407.
- [68] 于海洋, 章慧英, 刘思梦, 等. 单光纤扫描内窥成像制动技术研究[J]. *光子学报*, 2021, 50(5): 0511003.
- Yu H Y, Zhang H Y, Liu S M, et al. Research of fiber braking in the single fiber scanning endoscopic imaging system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2021, 50(5): 0511003.
- [69] Liang W X, Park H C, Li K Y, et al. Throughput-speed product augmentation for scanning fiber-optic two-photon endomicroscopy[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2020, 39(12): 3779-3787.
- [70] Rivera D R, Brown C M, Ouzounov D G, et al. Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(43): 17598-17603.
- [71] Ducourthial G, Leclerc P, Mansuryan T, et al. Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18303.
- [72] Bao H C, Boussioutas A, Jeremy R, et al. Second harmonic generation imaging via nonlinear endomicroscopy [J]. *Optics Express*, 2010, 18(2): 1255-1260.
- [73] Liang W X, Hall G, Messerschmidt B, et al. Nonlinear optical endomicroscopy for label-free functional histology *in vivo* [J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(11): e17082.
- [74] 石玉洁, 张广杰, 陆政元, 等. 新型多光子成像技术研究进展 [J]. *中国光学*, 2018, 11(3): 296-306, 280.
- Shi Y J, Zhang G J, Lu Z Y, et al. Advances in multiphoton microscopy technologies[J]. *Chinese Optics*, 2018, 11(3): 296-306, 280.
- [75] Kim D Y, Hwang K, Ahn J, et al. Lissajous scanning two-photon endomicroscope for *in vivo* tissue imaging[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3560.
- [76] Park H C, Seo Y H, Jeong K H. Lissajous fiber scanning for forward viewing optical endomicroscopy using asymmetric stiffness modulation[J]. *Optics Express*, 2014, 22(5): 5818-5825.
- [77] Pshenay-Severin E, Bae H, Reichwald K, et al. Multimodal nonlinear endomicroscopic imaging probe using a double-core double-clad fiber and focus-combining micro-optical concept[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 207.
- [78] Wang Y, Li Z, Liang X B, et al. Four-plate piezoelectric actuator driving a large-diameter special optical fiber for nonlinear optical microendoscopy[J]. *Optics Express*, 2016, 24(17): 19949-19960.
- [79] 吴丹磊, 冯丽爽, 王爱民. 高收集效率双光子内窥镜的光学设计[J]. *激光与光电子学进展*, 2018, 55(7): 071801.
- Wu D L, Feng L S, Wang A M. Optical design of two-photon endoscopy objective with high collection efficiency[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2018, 55(7): 071801.
- [80] Wang C H, Liu H L, Ma J R, et al. Spiral scanning fiber-optic two-photon endomicroscopy with a double-cladding antiresonant fiber[J]. *Optics Express*, 2021, 29(26): 43124-43135.
- [81] Wang C H, Liu H L, Cui H D, et al. Two-photon endomicroscopy with microsphere-spliced double-cladding antiresonant fiber for resolution enhancement[J]. *Optics Express*, 2022, 30(15): 26090-26101.
- [82] 李慧, 夏先园, 陈廷爱, 等. 双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207010.
- Li H, Xia X Y, Chen T A, et al. Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207010.
- [83] Skala M C, Riching K M, Gendron-Fitzpatrick A, et al. *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous



- epithelia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(49): 19494-19499.
- [84] Knorr F, Yankelevich D R, Liu J, et al. Two-photon excited fluorescence lifetime measurements through a double-clad photonic crystal fiber for tissue micro-endoscopy[J]. Journal of Biophotonics, 2012, 5(1): 14-19.
- [85] Hage C H, Leclerc P, Fabert M, et al. A readily usable two-photon fluorescence lifetime microendoscope [J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(5): e201800276.
- [86] Lin F R, Zhang C S, Zhao Y H, et al. *In vivo* two-photon fluorescence lifetime imaging microendoscopy based on fiber-bundle[J]. Optics Letters, 2022, 47(9): 2137-2140.
- [87] 付玲, 骆清铭. 生物医学光学成像的进展与展望[J]. 中国科学: 生命科学, 2020, 50(11): 1222-1236.  
Fu L, Luo Q M. Progress and prospect of biomedical optical imaging[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2020, 50(11): 1222-1236.
- [88] 莫驰, 陈诗源, 翟慕岳, 等. 脑神经活动光学显微成像技术[J]. 科学通报, 2018, 63(36): 3945-3960.  
Mo C, Chen S Y, Zhai M Y, et al. *In vivo* optical imaging of brain activity [J]. Chinese Science Bulletin, 2018, 63(36): 3945-3960.
- [89] Zong W J, Wu R L, Li M L, et al. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice[J]. Nature Methods, 2017, 14(7): 713-719.
- [90] Zong W J, Wu R L, Chen S Y, et al. Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging[J]. Nature Methods, 2021, 18(1): 46-49.
- [91] Li A, Guan H H, Park H C, et al. Twist-free ultralight two-photon fiberscope enabling neuroimaging on freely rotating/walking mice[J]. Optica, 2021, 8(6): 870-879.
- [92] Guan H H, Li D W, Park H C, et al. Deep-learning two-photon fiberscope for video-rate brain imaging in freely-behaving mice [J]. Nature Communications, 2022, 13: 1534.
- [93] Klioutchnikov A, Wallace D J, Frosz M H, et al. Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats[J]. Nature Methods, 2020, 17(5): 509-513.
- [94] Huang L, Zhou X, Liu Q H, et al. Miniaturized multimodal multiphoton microscope for simultaneous two-photon and three-photon imaging with a dual-wavelength Er-doped fiber laser[J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(2): 624-635.
- [95] Lukic A, Dochow S, Bae H, et al. Endoscopic fiber probe for nonlinear spectroscopic imaging [J]. Optica, 2017, 4(5): 496-501.
- [96] Wang J F, Li H, Tian G, et al. Near-infrared probe-based confocal microendoscope for deep-tissue imaging[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(10): 5011-5025.
- [97] Li H, Hao Z Y, Huang J F, et al. 500  $\mu\text{m}$  field-of-view probe-based confocal microendoscope for large-area visualization in the gastrointestinal tract [J]. Photonics Research, 2021, 9(9): 1829-1841.
- [98] Moon S, Lee S W, Rubinstein M, et al. Semi-resonant operation of a fiber-cantilever piezotube scanner for stable optical coherence tomography endoscope imaging [J]. Optics Express, 2010, 18(20): 21183-21197.
- [99] Gora M J, Suter M J, Tearney G J, et al. Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(5): 2405-2444.

## Research Advances in Piezoelectric Ceramic Scanning Two-Photon Endomicroscopy Technology

Wang Conghao<sup>1</sup>, Zhang Xiulei<sup>2</sup>, Cui Haodong<sup>1</sup>, Ma Jianrui<sup>1</sup>, Wu Runlong<sup>3</sup>, Liu Huilan<sup>1,4</sup>,  
Wang Aimin<sup>5\*</sup>, Feng Lishuang<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> School of Instrumentation and Optoelectronic Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

<sup>2</sup> School of Automation Science and Electrical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

<sup>3</sup> State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>4</sup> Key Laboratory of Precision Opto-Mechatronics Technology (Ministry of Education), Beihang University, Beijing 100191, China;

<sup>5</sup> State Key Laboratory of Advanced Optical Communication System and Networks, School of Electronics, Peking University, Beijing 100871, China

### Abstract

**Significance** The incidence and mortality rates of digestive tract cancers are rising quickly globally, greatly endangering human life and health. Most digestive tract tumors come from precancerous lesions, and the development of early cancer detection and diagnosis technology is crucial to improving people's health. To date, histopathological examination is still the "gold standard" for the clinical diagnosis of cancer, but this method has limitations, such as time-consuming and *in vitro* detection. Additionally, while biopsy sampling can examine the pathological characteristics of the suspected lesion area at the cellular scale, it cannot achieve full coverage of the suspected lesion area, so there is a certain risk of missed detection and false detection. Therefore, there is an urgent need to develop real-time, *in vivo*, *in situ* histological diagnostic techniques at the cellular scale to achieve early diagnosis of GI (gastrointestinal) cancers.

Two-photon endomicroscopy is a new type of endomicroscopic imaging technology based on the principle of two-photon excitation, with the technical advantages of optical-sectioning capability, deep penetration, low phototoxicity, and label-free imaging. This technique can realize structural imaging and functional imaging, which has great potential for applications in life science and clinical medicine.

Piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopy is the current preferred solution for two-photon endomicroscopy imaging technology. In recent years, this technique has achieved technological breakthroughs and new

applications. This paper summarizes piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopic imaging technology and the research progress and introduces its application in the field of biomedical imaging.

**Process** Section 2 introduces three typical two-photon endomicroscopy systems: fiber bundle proximal scanning scheme, MEMS distal scanning scheme, and piezoelectric ceramic-driven fiber distal scanning scheme (Fig. 1). Subsequently, the system structure and breakthroughs in core device technology of piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopy in recent years are summarized (Fig. 2). It mainly includes low-dispersion low-loss transmission double-cladding fiber, high-imaging resolution miniature objective, and high resonant frequency piezoelectric ceramic fiber scanner.

On this basis, we introduce in Section 3 the recent research progress of the representative piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopy in this field. In the abroad research progress, the works from the following research groups are summarized, including Chris Xu's group from Cornell University (Fig. 3), Frédéric Louradour's group from Université de Limoges (Fig. 4), Xingde Li's group from Johns Hopkins University (Fig. 5), Ki-Hun Jeong's group from the KAIST (Fig. 6), and a joint team of Bernhard Messerschmidt's and Juergen Popp's groups from the GRINTECH and the Leibniz Institute of Photonic Technology, respectively (Fig. 7). In the domestic research progress, the work from the following research groups is summarized, including Ling Fu's group from the Huazhong University of Science and Technology (Fig. 8), and a joint team of Lishuang Feng's and Aimin Wang's groups from the Beihang University and the Peking University, respectively (Fig. 9). It can be concluded that the capability of this technology for *in situ*, real-time, noninvasive, and high-resolution structural and functional imaging of biological tissues and organs has been fully verified. A part of the research units continues to focus on the research of a two-photon endomicroscopy integrated probe. The capability of the piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopy technology can be improved further by optimizing the core device and introducing new principles and methods; parts of the research units have conducted the development of a miniaturized endomicroscopy system to meet the clinical biosafety and compatibility requirements and develop its application in the biomedical imaging field.

In Section 4, we summarize two-photon endomicroscopy applications in structural and functional imaging of tissues and brain imaging of freely-moving animals. The following research groups' work, including Xingde Li's group from the Johns Hopkins University [Fig. 10 (a)–(i) and Fig. 12], a joint team of Liwei Liu and Junle Qu's group from Shenzhen University [Fig. 10 (j)–(r)], and Heping Cheng's group from the Peking University (Fig. 11), is summarized.

**Conclusions and Prospects** As a subcellular-scale optical biopsy technology, two-photon endomicroscopy can achieve real-time structural and functional imaging of biological tissues *in situ*, which has important scientific research value and broad clinical application prospects. The following recommendations are considered for the future development of two-photon endomicroscopy: 1) further breakthroughs in core device performance to improve the imaging capability and throughput of piezoelectric ceramic scanning two-photon endomicroscopy; 2) research on two-photon endomicroscopy technology based on MEMS scanning mirrors; 3) research on disposable endomicroscopy technology; 4) exploration of two-photon imaging technology-based multimodal imaging technology. It is foreseeable that piezoelectric ceramic scanning two-photon endoscopic imaging technology, as one of the important research directions of two-photon imaging technology, is expected to open a new paradigm of optical biopsy imaging applications for life science research and clinical medicine applications.

**Key words** medical optics; two-photon imaging; endomicroscopy; double-cladding fiber; miniature micro-objective; piezoelectric ceramic scanner