

# 基于光纤的双光子激光扫描荧光微内窥镜的新进展

汪洁<sup>1,2</sup> 林峰<sup>2</sup><sup>1</sup> 广东技术师范学院电子与信息学院, 广东 广州 510665; <sup>2</sup> 南洋理工大学计算机工程学院, 新加坡 639789)

**摘要** 由于高选择性、高穿透性和高分辨率, 双光子显微术已经成为一种很好的非侵入式检测方法。基于光纤的双光子微内窥镜在对清醒行为动物的脑成像并达到细胞水平分辨率, 对内部器官和活体动物光学实时成像的应用研究中具极大潜力。对建立微型双光子荧光内窥镜的技术方法进行了综述, 对基于单模、多模、光子晶体光纤等方法传输激发光和荧光信号进行了分析, 着重介绍了不同扫描方式和系统设计, 并对检测方法的研究进展和应用前景进行了探讨。

**关键词** 光纤光学; 微内窥镜; 双光子; 激光扫描

**中图分类号** O436

**OCIS** 170.3880 180.2520

**文献标识码** A

## Progress of Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microendoscope Based on Optical Fiber

Wang Jie<sup>1,2</sup> Lin Feng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Electronic and Information, Guangdong Polytechnic Normal University,  
Guangzhou, Guangdong 510665, China  
<sup>2</sup> School of Computer Engineering, Nanyang Technological University, 639789, Singapore

**Abstract** Because of its high resolution, inherent optical sectioning and deep optical penetration, two-photon microscopy has been regarded as an excellent method for noninvasive detection. A potential clinical application of these microscopes based on optical fibers is their endoscopic use for optical biopsy of inner organs or brain of awake, behaving animals. The technology to build miniaturized fluorescence microendoscopes was reviewed. The different fibers used in two-photon microendoscope to propagate the excited laser and collect the fluorescence signal such as single mode, multi-mode and photonic crystal fibers were contrasted. Various scanning mode and system design were introduced. The research development and potential application were also discussed.

**Key words** fiber optics; microendoscope; two-photon; laser scanning

### 1 引言

双光子显微术是一种高分辨率, 对深度散射样品光化学成像的有力工具<sup>[1]</sup>, 可以获得更大的穿透深度。尽管如此, 对于全脑及全身来说, 光学显微成像仍停留在表层技术。一个难点是, 标准的显微镜体积庞大, 很难或不可能到达深度缠绕器官的内部。另外, 组织的振动, 如心跳、呼吸、肌肉收缩等会造成运动伪影, 尤其是需要分辨的结构在微米尺度时, 成像的稳定性非常重要。随着新型光纤和微制造技术的发展, 光纤非线性显微镜和内窥镜的研究也正迅速发展, 基于小型光纤、微创技术并配合直径为 350~1000  $\mu\text{m}$  的渐变折射率 (GRIN) 微透镜的双光子荧光微内窥镜已经被用于动物活体细胞水平的深度脑结构成像, 能对清醒行为的老鼠大脑表面皮层以下成像。双光子微内窥镜与普通双光子显微镜都具有固有的光学部分和穿透几百微米组织的特性, 不同的是双光子微内窥镜用一个微创的内窥镜探头插入深层组织, 可对更深层的组织成像。光纤的超小尺寸与良好的机械和光学性能增加了成像系统的灵活性并减小了系统的尺寸, 使光学成像技术在内部器官和活体动物中的应用成为可能。基于光纤的双光子光学成像系统可以分成 3 种类型: 1) 便携式内窥镜, 适合于对自由行为动物成像; 2) 刚性内窥镜, 允许对组织深层或者在微创条件下成像; 3) 柔性内窥镜,

**收稿日期:** 2010-03-12; **收到修改稿日期:** 2010-04-08

**作者简介:** 汪洁 (1973—), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物医学荧光光学检测方面的研究。E-mail: janew03@gmail.com

可以深入器官内部成像。它们为早期癌症和微创外科手术的模式转变提供了光学显微镜工具。

在双光子荧光成像仪器的小型化方面已有很多研究,目前难点是有效激发光传输、光束扫描、双光子荧光信号收集和小型探头的制造。具体来说要解决以下难题:1)近红外波段超短脉冲激光的传输和非线性光信号的收集。光纤的色散和自相位调制等非线性效应会导致脉冲宽度和光谱的展宽,降低激发效率;光纤的低数值孔径和小芯径限制了可见光信号的高效收集、系统的信噪比和成像深度。2)扫描机制,扫描器件应该具有毫米量级的尺寸,并能实现快速扫描和高图像分辨率来实时监测生物过程。3)系统设计,系统设计是微内窥镜研究的关键,直接决定了系统的灵活性、功能和应用范围。目前,美国斯坦福大学 B. A. Flusberg 等<sup>[2~23]</sup>对基于光纤的双光子微内窥镜进行了研究。

## 2 光纤及光纤耦合器

### 2.1 光纤

在光纤成像系统中,使用合适的光纤类型是内窥镜设计的关键。单模光纤能传输高质量的激光束并改善成像系统的层析能力,是最普遍使用的一种类型。但是,由于超快脉冲通过单模光纤通信时由于群速度色散、自相锁模和自陡效应带来了光谱展宽,导致非线性激发和穿透深度极大降低。另一方面,低的数值孔径和小芯径也使单模光纤对成像系统的光学像差十分敏感,而且,小芯径就好像是共焦针孔一样,阻碍了生物组织中焦平面以外的多次杂散光,结果导致成像所需光子不足。光纤有相对大的数值孔径和芯径,能较好地收集信号。不足的是,多模光纤的多空间模式不能在近衍射限处聚焦产生有效的高分辨率的非线性激发。

光子晶体光纤(PCF)能克服常规光纤的局限,它利用光子晶体的物理机制传导光,打破了常规光纤的全反射原理限制。PCF 可以分成高指数芯径光纤和光子带隙光纤(PBF)两类。在高折射率光纤中,二维的光子晶体的有效折射率比芯径材料低,能被用来作为光纤包层。因此,在外包硅-空气的光子晶体包层的固体硅芯径中能改进全反射模式传导。或者,由于光子晶体带隙支持传播模式,空芯 PBF 可在外包光子带隙材料包层的真空中传播。PCF 能通过设计光纤中二维光子晶体的结构实现普通光纤不能具备的功能,彻底改变了光纤传输光束的方式。

M. T. Myaing 等<sup>[24]</sup>采用商用双包层光纤(DCF)传输激发光与收集荧光,双包层光纤由中心的单模纤芯和内外两层覆层组成,如图 1 所示,纤芯和内包层的直径分别为  $3.6 \mu\text{m}$  和  $90 \mu\text{m}$ ,数值孔径分别为 0.19 和 0.23。当用同一根光纤激发纤芯和收集荧光(通过纤芯和内包层)时,使用双包层光纤能增强荧光的收集,这主要是由双包层的特性,光能在内包层区域全反射的结果。它的收集区域是常规单模光纤的 400 倍,内包层的数值孔径也是常规单模光纤的 2 倍。大的收集区域和大的数值孔径也使收集效率对渐变折射透镜(GRIN)物镜的色差差的敏感度降低。激发光通过纤芯传输,而荧光通过纤芯和内包层收集。

不同类型的光纤和光纤耦合器在双光子微内窥镜中都有应用。F. Helmchen 等<sup>[25]</sup>建立了一种小型头戴式双光子光纤显微镜装置,能对清醒的、自由活动的小鼠脑部稳定成像。激发光用单模光纤传导,用光纤头部的振动扫描机制成像,首次对麻醉鼠大脑皮层进行成像,获得了血液中加荧光标记的脉管和用钙标记的  $2/3$  锥体神经元图像。对毛细血管血液流动和树突状钙瞬变能通过线扫描测量,具有较高的分辨率。整个系统如图 2 所示。红外脉冲激光由钛-蓝宝石激光器发出,经过一对衍射光栅色散补偿后耦合入单模光纤。显微镜设计,由灵活的激光元件联接显微镜,可固定在小鼠头部。除了光纤,包括电线等都是驱动扫描、控制聚焦和为光电倍增管(PMT)提供支持 and 输出电压的必要部分。从光纤头部出来的光通过一微型电机带动下移动的水浸物镜校准和聚焦,光纤头部的偏转范围用来扫描,PMT 探测荧光。小型扫描器和 PMT 可作物镜支架,也可设计成为两个可分离的单元。整个装置安装在一金属盘上,置于在老鼠的颅窗之上。整个显微

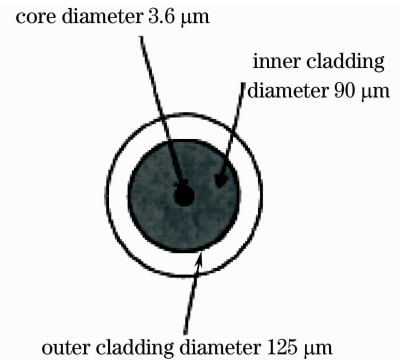


图 1 双包层光纤横截面结构

Fig. 1 Cross-sectional structure of double-clad fiber

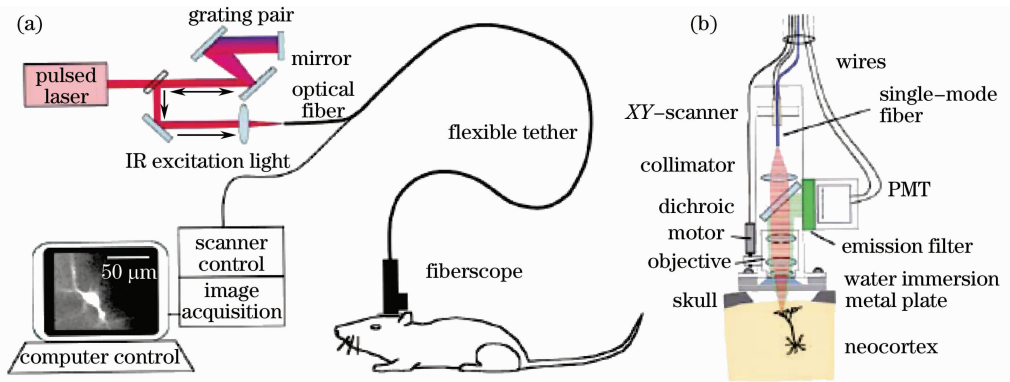


图 2 双光子光纤显微镜装置

Fig. 2 Two-photon fiberscope setup

透镜长 7.5 cm、重 25 g,可以常规地戴在小鼠头部。

B. A. Flusberg 等<sup>[26]</sup>利用柔性的光子带隙光纤近无失真地传输了超快激发光脉冲,因为光克尔效应在空气纤芯中可忽略,所以这种光纤传输超快光脉冲时几乎没有自相调制(SPM)影响。他们建立的这种结构小巧的双光子荧光微内窥镜,采用复合 GRIN 内窥镜探头和直流电机远程调节成像平面,成像头盔包括光纤扫描器和两个调焦机构,重量仅 3.9 g,并能达到微米量级分辨率,可对活鼠脑内海马血管进行可视化。

W. Göbel 等<sup>[21]</sup>利用空心光子晶体光纤传输范围在 800 nm 左右的超短脉冲激光,脉冲能量达 4.6 nJ,无需预啾啾单元,170 fs 脉冲能在 812 nm 基本不失真近零色散地传输。由于有空气导航脉冲,依赖于光强度的非线性效应很小,350 mW 平均输出功率仅有 15% 的脉冲展宽发生。它非常适合于要求单模传输高能量超短脉冲激光到光纤输出面的小型双光子显微镜。

## 2.2 光纤耦合器

D. Bird 等<sup>[12,27]</sup>首次将单模光纤耦合器引入双光子荧光显微成像,证明了三端口的单模光纤耦合器能传输近红外波段的超短脉冲激发光并收集荧光。D. Bird 等研制的这种基于单模光纤耦合器、微棱镜和 GRIN 柱形透镜的双光子荧光微内窥镜,能对内部结构直径约 3.0 mm 样品横截面成像,具有光学选择性,轴向分辨率为 3.2 mm。使用单模光纤耦合器能将纵向分辨率提高 30%,且使系统更紧凑并具有自准直的特性。仪器信号水平可以通过给微棱镜表面加二色涂层得到提高。

L. Fu 等<sup>[13]</sup>报道了利用双包层光子晶体光纤耦合器,1×2 型双包层光子晶体光纤耦合器用熔锥法制作而成,具有 1.1 dB 的低损耗,整个可见光和近红外波长范围分束比为 97:3。对于激光能量分束特性,耦合器的双包层特征促进了近红外的单模光束从可见多模光束中分离,这正是理想的非线性光学显微成像。制作双包层光子晶体光纤的难点在于要通过双包层区域,分别在纤芯和内包层区域保持单模及多模导航而完成模式耦合。耦合器的核心单模直径为 20 μm,内包层直径为 165 μm,空气孔和绕核空气孔间距比为 0.26,在近红外区提供单模传输;环状空气孔用来限制波长 800 nm 时数值孔径为 0.6 的内包层中光的多模传输。结合 GRIN 透镜,用这种耦合器来建立双光子荧光微型显微镜,获得了高分辨率的三维双光子和二次谐波图像。

## 3 扫描方式

常规的扫描方式如振镜、摇摆旋转多边形镜和光声扫描仪都不能小型化。为研究快速生物过程,如血液流动和神经细胞活动等,应用于光纤双光子微内窥镜的扫描方法有<sup>[28]</sup>:机械偏转或光纤悬臂振动<sup>[25,29]</sup>、微机电系统(MEMS)微镜、共焦光纤束扫描(牺牲了一定的空间分辨率和灵敏度)。这些结构的显著优点是可以把体积减小到厘米甚至毫米量级并且还具具有可调、快速线扫描率达到约 1 kHz。归纳起来,这几种扫描机制如图 3 所示<sup>[9]</sup>:(a)近端扫描,级联振镜扫描激发光通过光纤束尾端;(b)近端线扫描,一圆柱形透镜聚焦激发光与一条线扫描通过一个方向的光纤束端面;(c)近端空间光调制扫描,它能依次照明像素而无需扫描光束;(d)远端二维镜扫描,压电驱动倾斜镜或者在二个角度方向驱动微型 MEMS 镜;(e)远端光纤头扫描,传输激

发光的光纤头部由激励器带动下机械谐振;(f)远端光纤物镜扫描,光纤和物镜同时固定在一悬臂由激励器带动机械谐振。

### 3.1 光纤悬臂

M. T. Myaing 等<sup>[24]</sup>报道了一种小型、柔性光纤扫描双光子荧光成像内窥镜,采用管状压电激励器完成二维扫描,双包层光纤传输激发光和收集双光子荧光信号,已经成功地对荧光珠和癌细胞进行了实时成像。光纤悬臂粘在激励器顶端,管状压电激励器外表面分成4部分形成两对驱动电极( $\pm x$ 和 $\pm y$ ),这种自由悬臂探头长度约为8.2 mm,扫描频率范围为1323~1330 Hz,常规最大扫描直径为120~220  $\mu\text{m}$ ,最大峰-峰驱动电压为75 V,整个扫描微透镜直径约为2.4 mm。

R. Le Harzic 等<sup>[30]</sup>报道了一种利用空心光子晶体二极管晶体光纤,它用单模传输激发光多模收集信号。系统的双光子荧光响应的轴向和横向分辨率分别为5.8  $\mu\text{m}$ 和0.6  $\mu\text{m}$ 。得到了790~840 nm不同波长的荧光检测信号,所获图像的最大视场范围为420  $\mu\text{m}$ ×420  $\mu\text{m}$ 。且采用雪崩光电二极管,它的探测效率比用光电倍增管高,系统具有细胞分辨率,对活体成像和诊断极具潜力。光纤由光纤夹头置于三维纳米位移平台,通过优化光纤中的耦合光,激发光脉冲通过PCF导入超小的光纤显微镜头。经由PCF光纤的激光耦合入定制的GRIN镜,它带有1 mm高的NIR90°反射棱镜和1.3 mm的二色分束镜。设计GRIN物镜最大水浸数值孔径为0.65,工作距离170  $\mu\text{m}$ 。空气中的工作距离小于95  $\mu\text{m}$ 。可见光范围内的荧光发射光子耦合入多模聚酰亚胺光纤,硅纤芯和包层直径分别为600  $\mu\text{m}$ 和660  $\mu\text{m}$ 。经过2 mm×2 mm BG39发射滤光片确保没有透射或反射激光后,用雪崩二极管代替PMT探测光子信号。

### 3.2 微机电系统

由于MEMS器件体积小、功耗低、微光束操作能力优异、有利于建造“芯片显微镜”,为克服常规双光子荧光内窥镜对体积的限制,科研工作者们研究了基于MEMS的扫描器,它能在0.5~3 mm尺度的单片MEMS上完成二维扫描。W. Piyawattanametha 等<sup>[4]</sup>在单晶硅片上制作的扫描微镜,由垂直方向的静电激励器二维驱动,光学偏转角范围为0~16°。轴向最快频率为3.52 kHz,飞秒脉冲光经过光栅对和显微物镜后被耦合到双包层光子晶体光纤,光纤中出射的光经过MEMS扫描镜后被GRIN透镜聚焦到样品上,非线性光信号则通过MEMS扫描镜后被光纤收集到探测器。

这种MEMS是在3.2 mm×3.0 mm金属模片上制作750  $\mu\text{m}$ ×750  $\mu\text{m}$ 的扫描微镜、6块垂直具万向节设计的梳形微镜激励驱动器。内外扭转弹簧大小分别为259  $\mu\text{m}$ ×6  $\mu\text{m}$ 和416  $\mu\text{m}$ ×8  $\mu\text{m}$ 。其中6块梳状激励器,2块绕内轴快速驱动,4个绕外轴慢速驱动。每一块固定和可活动的梳齿互相交错为一个方向提供静电扭矩。垂直静电梳状激励器比平行板相应装置提供更强大的动力和转角范围。扫描器可在双重硅绝缘片上批量制作,所有的单晶硅片上层厚度为30  $\mu\text{m}$ ,底层厚度为30  $\mu\text{m}$ ,中间层厚度为531  $\mu\text{m}$ 。微镜为可移动梳齿和内部扭转弹簧位于上层。外框为外部扭转弹簧并固定梳齿制作在两层之间。如果梳齿厚度有明显提高,静电力矩会使微镜增加转角而转动。制作过程分4个深度离子蚀刻反应步骤,前3步是由环状转换掩模依次从上到下层自动对准梳齿,最后一步是去除镜子后的感光底层,释放万向节旋转。

MEMS系统的限制在于,扫描器的很多反射光线产生的衍射,如果聚焦光束扫描样品,最大可分辨焦斑数值 $N$ 就被整个扫描角比例范围限制。尽管MEMS器件制作工艺复杂,需要昂贵的设备,但它能集成微器件,在构建小型显微镜中有巨大的优势。

### 3.3 光纤束扫描机制

典型的光纤束扫描双光子显微镜<sup>[20]</sup>,以30000根芯径组成的熔融相干光纤束和渐变折射率物镜为主要部件,由标准的双光子激光扫描显微镜系统聚焦激发光,在光纤束表面扫描,激发光依次耦合入每根纤芯,荧光信号也由这些光纤束探测。

由钛-蓝宝石飞秒激光器发出的初始脉冲宽度为100 fs的脉冲激光,先反复通过衍射光栅对,由一标准

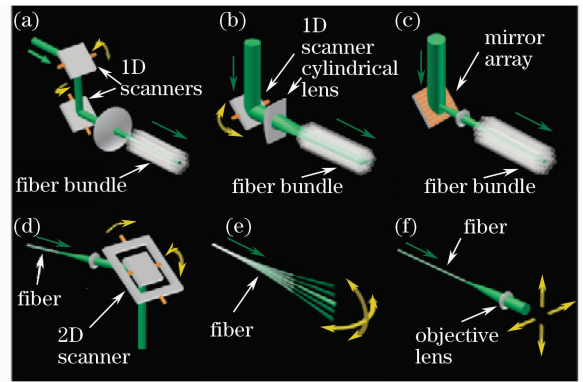


图3 扫描机制

Fig. 3 Scanning mechanisms

的双光子激光扫描显微镜耦合进 1.4 m 长的光纤束,GRIN 物镜联接光纤束的正面末端,从光纤芯形成的发散光束由成像 GRIN 校准并由 GRIN 物镜重聚焦,通过光纤束和耦合镜由 PMT 探测荧光信号。通过相干光学成像导航的双光子激发,允许相干传输并保持空间关系的成像,主要优点在于这种光纤束的扫描机构能设置于光纤入口,可用灵活超小的显微镜探头实现对生物组织深层成像。它能容易地分辨微米量级的荧光珠和花粉粒,也能对活体鼠脑部荧光标记的血管成像。

## 4 系统设计

系统设计是微内窥镜的关键之一,它直接影响到微内窥镜的功能和应用,新一代成像仪器将基于微制造组件,采用光纤结合 GRIN 透镜的结构使双光子激光扫描显微镜结构更小巧紧凑,满足应用需求。

最近报道的一种便携式双光子光纤微内窥镜系统<sup>[5]</sup>,大小仅与一角硬币(美元)相当,如图 4 所示。它使用 GRIN 透镜和光子带隙光纤,适用于对自由运动的小鼠脑成像,快速线扫描采集频率为 3.5 Hz,达到微米量级的分辨率。MEMS 扫描镜能使光在两个角度方向偏转,超快光脉冲激光先由准直仪准直,由空心光子带隙光纤传输,可以消除超快脉冲畸变。微镜偏转以光栅模式扫描,通过二色微棱镜进入 GRIN 微透镜,在物镜焦点处对样品平面聚焦,产生荧光返回 GRIN 微透镜,系统的激发和收集数值孔径分别为 0.46 和 0.61,微透镜的工作距离为 400  $\mu\text{m}$ 。对样品的输出功率可以达 60 mW。当慢轴在直流模式(5 Hz)下被驱动时,快轴也由共振被驱动。所成像为 402 pixel $\times$ 162 pixel,每秒 5 帧,双面快轴获得。最大视场为 80  $\mu\text{m}\times$ 20  $\mu\text{m}$ ,成像没有帧平均。

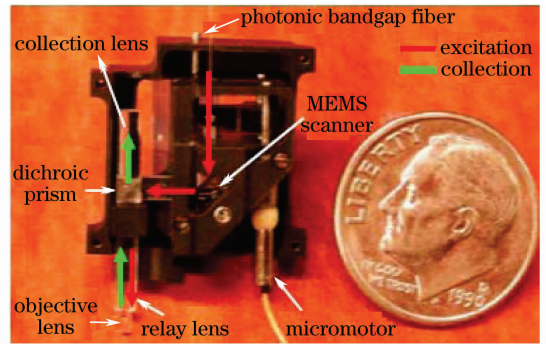


图 4 微内窥镜照片

Fig. 4 Photograph of microendoscope

C. J. Engelbrecht 等<sup>[28]</sup>报道了一种小型超轻的双光子光纤显微镜,用空心的光子晶体光纤有效传输近红外飞秒脉冲,螺旋光纤扫描器用来控制光束共振,GRIN 透镜激发荧光,经二色分束镜,由光电倍增管远端收集信号。所有的光学元件直径只有 1 mm,显微镜镜头套仅重 0.6 g,并能达到微米量级的分辨率,典型帧频为 25 Hz,视场范围可达到 200  $\mu\text{m}$ 。可对麻醉鼠小脑中的浦肯野细胞树突的钙信号进行功能成像。显微镜能方便地由小鼠或大鼠随身携带,能对自由行为动物进行功能成像。这些双光子微内窥镜系统能在很小的空间使所有元件完美组合在一起,结构精巧,都是以先进的系统设计和微制造技术与工艺为基础。

## 5 总结与展望

在一些生物医学领域如光学活检、对器官内部和自由行为动物脑成像,以及功能研究包括啮齿动物脑部和耳蜗的血液流动测量、用钙荧光标记的麻醉动物的神经元活动等,对仪器的灵敏度和稳定性要求很高,需小体积,可灵活移动的仪器。现有的方法很难应用于清醒的动物或者达到细胞水平的分辨率,应用广泛的 CCD 成像虽然已经揭示了自由移动的活鼠的触须刺激反应的大量行为模式,但它对脑组织的穿透深度较小,不具备选择性,空间分辨率远远低于单分子<sup>[31]</sup>,难以满足对神经系统特性的研究需要。发展双光子荧光内窥镜的主要障碍是用结构复杂体积庞大的光学元件传输超短脉冲激光和接收荧光信号,随着新型光纤和微制造技术的迅猛发展,着眼于对活体三维成像的高分辨率的小型双光子光纤微内窥镜可以解决这一问题。

目前已有关于便携式、刚性和柔性的双光子光纤微内窥镜系统的报道。使用空心光子晶体光纤、双包层光子晶体光纤可使超快光谱时域和频域的展宽大大减少,能同时传递激发光和收集荧光信号。压电激励器和 MEMS 微镜在双光子光学成像微型扫描机制中具有很好的性能,使它能应用于深度脑组织和器官组织内部,如胃和食道的成像。

随着微型元器件的制造和工艺飞速发展,光学显微镜越来越小型化,功能越来越强。它在发展无需外科手术切片的实时生物研究和诊断工具方面具有巨大潜力,在光动力疗法、显微外科和早期癌症检测中可以得

到广泛应用。双光子光纤微内窥镜将会在基础研究和临床医学领域应用,对医学诊断和微创外科手术产生深远影响,使高分辨率的活体检测和功能检测迈入新纪元。

### 参 考 文 献

- 1 W. Denk, Multi-photon microscopy in neuroscience [J]. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences I*, 2002, **4620**: 62~63
- 2 B. A. Flusberg, J. C. Jung, E. D. Cocker *et al.*. Fiber optic two-photon fluorescence microendoscopy: towards brain imaging in freely moving mice [C]. *CLEO*, 2005, **3**: 2233~2235
- 3 K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska *et al.*. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits [J]. *J. Neurosci.*, 2006, **26**(41): 10380~10386
- 4 W. Piyawattanametha, R. P. J. Barretto, T. H. Ko *et al.*. Fast-scanning two-photon fluorescence imaging based on a microelectromechanical systems two-dimensional scanning mirror [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(13): 2018~2020
- 5 W. Piyawattanametha, E. D. Cocker, R. P. J. Barretto *et al.*. A portable two-photon fluorescence microendoscope based on a two-dimensional scanning mirror [C]. *IEEE LEOS International Conference*, 2007, 6~7
- 6 J. C. Jung, M. J. Schnitzer. Multiphoton endoscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(11): 902~904
- 7 J. C. Jung, A. D. Mehta, E. Aksay *et al.*. In vivo mammalian brain imaging using one-and two-photon fluorescence microendoscopy [J]. *J. Neurophysiol.*, 2004, **92**(5): 3121~3133
- 8 A. D. Mehta, J. C. Jung, B. A. Flusberg. Fiber optic in vivo imaging in the mammalian nervous system [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004, **14**(5): 617~628
- 9 B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha *et al.*. Fiber-optic fluorescence imaging [J]. *Nat. Meth.*, 2005, **2**(12): 941~950
- 10 L. Fu, M. Gu. Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy [J]. *J. Microscopy*, 2007, **226**(3): 195~206
- 11 H. Bao, J. Allen, R. Pattie *et al.*. Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a  $475\ \mu\text{m}\times 475\ \mu\text{m}$  field of view for in vivo imaging [J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(12): 1333~1335
- 12 D. Bird, M. Gu. Two-photon fluorescence endoscopy with a micro-optic scanning head [J]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(17): 1552~1554
- 13 L. Fu, M. Gu. Double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(10): 1471~1473
- 14 L. Fu, X. Gan, M. Gu. Nonlinear optical microscopy based on double-clad photonic crystal fibers [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(14): 5528~5534
- 15 Ming Che Chan, Shi Wei Chu, Chien Hung Tseng *et al.*. Cr: Forsterite-laser-based fiber-optic nonlinear endoscope with higher efficiencies [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2008, **71**(8): 559~563
- 16 D. Bird, M. Gu. Fibre-optic two-photon scanning fluorescence microscopy [J]. *J. Microscopy*, 2002, **208**(1): 35~48
- 17 F. Helmchen, M. S. Fee, D. W. Tank *et al.*. A two-photon fiber-scanning microscope for cortical imaging in awake, behaving rodents [J]. *Biophysical Journal*, 2000, **78**(1): 2625
- 18 F. Helmchen, W. Denk. Corrigendum: deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nat. Meth.*, 2006, **3**(3): 235~235
- 19 F. Helmchen, W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nat. Meth.*, 2005, **2**(12): 932~940
- 20 W. Gobel, J. N. D. Kerr, A. Nimmerjahn *et al.*. Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiberbundle and a gradient-index lens objective [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(21): 2521~2523
- 21 W. Gobel, A. Nimmerjahn, F. Helmchen. Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(11): 1285~1287
- 22 F. Helmchen. Miniaturization of fluorescence microscopes using fibre optics [J]. *Experimental Physiology*, 2002, **87**(06): 737~745
- 23 F. Helmchen, C. C. H. Petersen. New views into the brain of mice on the move [J]. *Nat. Meth.*, 2008, **5**(11): 925~926
- 24 M. T. Myaing, D. J. MacDonald, X. Li. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(8): 1076~1078
- 25 F. Helmchen, M. S. Fee, D. W. Tank *et al.*. A miniature head-mounted two-photon microscope: high-resolution brain imaging in freely moving animals [J]. *Neuron*, 2001, **31**(6): 903~912
- 26 B. A. Flusberg, J. C. Jung, E. D. Cocker *et al.*. In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope [J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(17): 2272~2274

- 27 D. Bird, M. Gu. Compact two-photon fluorescence microscope based on a single-mode fiber coupler [J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(12): 1031~1033
- 28 C. J. Engelbrecht, R. S. Johnston, E. J. Seibel *et al.*. Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(8): 5556~5564
- 29 W. Gobel, B. M. Kampa, F. Helmchen. Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning [J]. *Nat. Meth.*, 2007, **4**(1): 73~79
- 30 R. Le Harzic, M. Weinigel, I. Riemann *et al.*. Nonlinear optical endoscope based on a compact two axes piezo scanner and a miniature objective lens [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(25): 20588~20596
- 31 I. Ferezou, F. Haiss, L. J. Gentet *et al.*. Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice [J]. *Neuron*, 2007, **56**(5): 907~923