

细胞激光器研究进展及应用综述

杜梦聪^{1,2}, 刘倩倩^{1,2}, Marion Lang^{1,2}, 王秀翊^{1,2*}, 王璞^{1,2}

¹北京工业大学激光工程研究院, 北京 100124;

²北京市激光应用技术工程技术研究中心, 北京 100124

摘要 细胞激光器是激光光子学和生命科学交叉领域的前沿研究方向,其工作原理是,在流体环境中,将荧光蛋白、生物兼容的荧光染料及荧光素等和细胞有机结合在一起,在谐振腔光反馈作用下使弱信号得到振荡放大实现细胞的激光输出。详细阐述了基于法布里-珀罗腔和回音壁模式微腔的细胞激光器的研究现状和基本原理,由于谐振腔对光信号的反馈放大作用,与传统的荧光信号相比,激光信号能够有效增强传感探测的灵敏度,提高分辨率。通过分析细胞等生物组织中发射激光的光谱和模式等信息来研究细胞内部的生理变化过程,为医学治疗诊断、生物材料三维超分辨率成像及可集成光源研究等提供新的技术和设计思路。

关键词 激光器; 细胞激光器; 法布里-珀罗腔; 回音壁模式微腔; 生物传感; 超分辨率成像

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.120001

Research Progress and Application of Cell Lasers

Du Mengcong^{1,2}, Liu Qianqian^{1,2}, Marion Lang^{1,2}, Wang Xiuhong^{1,2*}, Wang Pu^{1,2}

¹*Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;*

²*Beijing Engineering Research Center of Applied Laser Technology, Beijing 100124, China*

Abstract Cell lasers is a frontier interdisciplinary research field of laser photonics and life sciences, the principle of which is that, under the optical feedback of the cavity, the weak signal can be oscillated and amplified via the combination of fluorescent protein, bio-compatible fluorescent dye and luciferin into cells in the fluidic environment. We present a detailed discussion about the research status and basic principles of Fabry-Perot cavity and whispering-gallery-mode microcavity. Laser-based detection can effectively enhance the sensitivity and resolution compared with the tradition fluorescence-based detection, benefitting from the feedback amplification of cavity. The physiological changes inside cells are studied with the analysis of the spectra and modes of the cell laser emission simultaneously. It'll provide new technologies and design ideas for medical diagnosis, three-dimensional super-resolution imaging of biomaterials and integrated light source research.

Key words lasers; cell lasers; Fabry-Perot cavity; whispering-gallery-mode microcavity; biosensing; super resolution imaging

OCIS codes 140.3460; 220.4830; 230.3990

1 引言

1960年7月,美国科学家西奥多·梅曼利用红宝石晶体成功研制了世界上第一台激光器^[1-2],它的诞生标志着人们有能力调控多个光子的发射方向、相位、频率和偏振等,使人们对光的认识和应用达到了更高的水平。因其在通信、测距及加工等科研和工业领域具有广泛的应用前景,各类激光器如固体

激光器^[3-6]、半导体激光器^[7-8]及光纤激光器^[9-10]不断涌现并得到了迅猛发展。但是随着激光器功率越来越高,热效应积累现象也越来越严重,同时激光器在微型化和交叉学科方向表现出强大的生命力,因此,光流体激光器这一领域便应运而生。光流体是结合光学和流体各自独特的优势而形成的一个多学科交叉的新型研究领域,其概念在2003年由美国加州理工大学提出^[11-14],其中光流体激光器就是在液

收稿日期: 2018-05-18; 修回日期: 2018-06-08; 录用日期: 2018-06-11

基金项目: 国家自然科学基金(61378088)

* E-mail: wxh2012@bjut.edu.cn

体环境中实现一些荧光材料的激光输出。其体积小,一般在微纳量级,可作为一种集成光源,有利于推动微流控芯片^[12,15-16]的发展;同时,生物机体因存在天然的液体环境,在生物医疗诊断、传感探测和成像等领域有着非常广泛的应用前景。细胞激光器是一种特殊的光流体激光器,可以在体外模拟生物体生存的液体环境或者直接在生物体内,通过向细胞内注入荧光材料等方式将荧光材料和生物细胞有机地整合在一起,在外界能量的激励下实现细胞的激光输出。2011年6月,哈佛大学的 Gather 等^[17]通过改造人胚肾细胞,使细胞可以发射出激光信号,这无论是对于基础激光光子学还是生命科学领域都具有重要的研究意义和应用价值。细胞激光器作为一个前沿交叉学科的研究领域,尚处于发展初期,本文主要综述了目前已发表的相关研究进展,分类介绍了相关理论研究,并总结分析了细胞激光器的应用和发展方向。

2 细胞激光器的研究进展

细胞激光器的实现原理与传统材料的激光器相同,都需要满足激光产生的三个必备条件,即提供能量的抽运源、产生增益信号的增益介质和提供光信号反馈的光学谐振腔^[18-19],目前细胞激光器的抽运源主要是掺钕钇铝石榴石等固体激光器以及光参量振荡器等脉冲激光器^[20-26],抽运脉冲的最佳持续时间为增益介质激发态寿命的十分之一至几倍,也有一些用的是连续激光器。增益介质是与细胞进行有机整合的一些荧光材料,如荧光蛋白^[17]、荧光染料^[27-28]、荧光素^[25]、量子点^[29]、维生素^[30]及荧光能量共振转移对^[23]等,增益介质吸收抽运能量后发射的增益信号经光学谐振腔不断振荡反馈放大,当增益大于腔内的总损耗时,形成激光输出,阈值条件为

$$n_1 \cdot \sigma_e(\lambda) = n_0 \cdot \sigma_a(\lambda) + \gamma_c, \quad (1)$$

式中, n_1 和 n_0 分别为激发态和基态中增益分子的浓度, σ_e 和 σ_a 分别为激光波长 λ 下分子的发射和吸收截面, γ_c 为空腔损耗系数。在阈值以下时,探测到的输出光信号仅是荧光材料的自发辐射光;在阈值以上时,探测到的输出光信号为荧光材料的相干受激辐射光,且随着抽运能量的增加呈线性增长。

细胞激光器按设计腔型,可以大致分为基于法布里-珀罗腔^[31]的细胞激光器的和基于回音壁模式(WGM)微腔^[30,32-40]的细胞激光器。

2.1 基于法布里-珀罗腔的细胞激光器

2.1.1 理论分析

法布里-珀罗腔采用两面平行放置的高反镜作为腔镜,光信号在腔镜之间往返传输,在轴线附近传播的光来回反射形成驻波,经过反馈光放大形成激光输出腔外。一般在实验中两个平行放置的腔镜不是绝对稳定,对周围环境的微小振动或其他外界条件极其敏感,若谐振腔发生微小的角度偏转,那么在谐振腔内往返传输的光信号经多次反射后极易溢出腔外,所以像细胞激光器这种低阈值激光器需要法布里-珀罗腔来保持一个相对稳定的状态,可以通过ABCD矩阵的方式进行稳定条件的理论计算^[41]:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{B} \\ \mathbf{C} & \mathbf{D} \end{bmatrix}. \quad (2)$$

需要满足的稳定性条件为

$$-1 < \left(\frac{\mathbf{A} + \mathbf{D}}{2} \right) < 1. \quad (3)$$

在基于法布里-珀罗腔的细胞激光器谐振腔内,光线分别要经过两次腔镜和细胞,其在腔内的入射光线传输矩阵 \mathbf{M}_1 为

$$\mathbf{M}_1 = \begin{bmatrix} 1 & L - 2R \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_{\text{cell}} - n_0}{Rn_0} & \frac{n_{\text{cell}}}{n_0} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 2R \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_0 - n_{\text{cell}}}{Rn_{\text{cell}}} & \frac{n_0}{n_{\text{cell}}} \end{bmatrix}, \quad (4)$$

反射光线传输矩阵 \mathbf{M}_2 为

$$\mathbf{M}_2 = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_{\text{cell}} - n_0}{Rn_0} & \frac{n_{\text{cell}}}{n_0} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 2R \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_0 - n_{\text{cell}}}{Rn_{\text{cell}}} & \frac{n_0}{n_{\text{cell}}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & L - 2R \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (5)$$

式中, R 为细胞半径(以HeLa细胞 $R=10 \mu\text{m}$ 为例来计算谐振腔的稳定性条件), $n_{\text{cell}}=1.371$ 为细胞内物质的有效折射率, n_0 为细胞外界环境折射率,将其近似为水溶液折射率(1.334),由谐振腔稳定条件可得

$$L_{\min} = 2R = 20 \mu\text{m}, \quad (6)$$

$$L_{\max} = 19.5R = 195 \mu\text{m}. \quad (7)$$

单个细胞置于法布里-珀罗腔内,其激光信号光线传输原理图如图1所示,图中 ω_1 和 ω_2 分别为腔内振荡产生的激光光斑大小。

细胞激光器输出微弱的激光信号,其阈值比传统的激光器低,这也符合今后生物医疗领域的应用

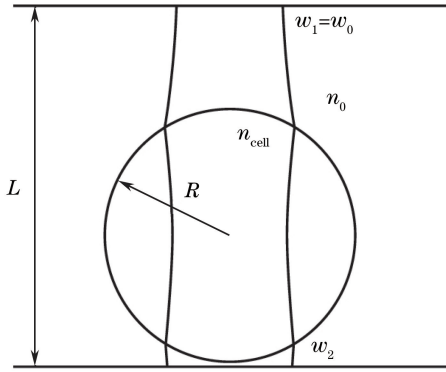


图1 基于法布里-珀罗腔细胞激光器的原理图

Fig. 1 Schematic of cell lasers based on Fabry-Perot cavity

需求,所以阈值对于细胞激光器而言是一个重要参数。一般单位长度荧光材料所提供增益为

$$g(z) = N \left[W(z) \tau \left(\frac{B}{c} + \sigma_{ss} \right) - \sigma_{ss} \right], \quad (8)$$

式中, N 为荧光材料的分子浓度, τ 为荧光寿命, c 为光在真空中的传播速度, σ_{ss} 为激光波长所对应的吸收截面。其中,

$$B = \frac{\lambda^4 E(\lambda) n}{8\pi\tau}, \quad (9)$$

$$W(z) = \frac{J(z)\sigma_0}{h\nu}, \quad (10)$$

式中, n 为激光介质的折射率, $J(z)$ 为抽运强度在 z 轴方向的变化函数, σ_0 为抽运波长所对应的吸收截面, $h\nu$ 为光子能量, $E(\lambda)$ 为自发辐射的线性函数,且

$$\int_0^{\infty} E(\lambda) d\lambda = \phi, \quad (11)$$

式中 ϕ 为量子产率。腔内往返一次的信号光光强可通过

$$\frac{dI}{dz} = I(z)g(z) \quad (12)$$

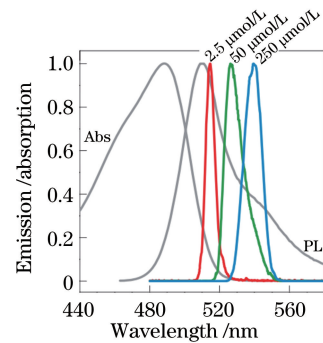
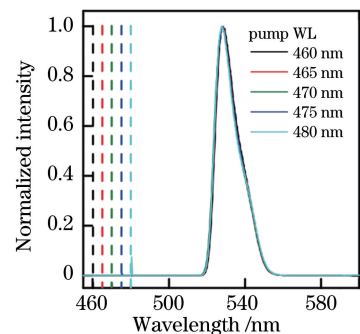
求得。

在达到阈值时,腔内往返一次的光强等于初始时的光强,用这种方法来计算细胞激光器的阈值,但在实验中常通过测量数据的拟合曲线来确定阈值。

2.1.2 实验研究现状

2011年6月,哈佛大学医学院的 Gather 等^[17]成功研制出了基于法布里-珀罗腔的细胞激光器。抽运源采用波长为 465 nm 的光参量振荡器,脉宽为 5 ns,重复频率为 10 Hz。增益材料为绿色荧光蛋白(GFP)^[42],GFP 是目前生物医学领域中常用的成像和追踪试剂,在细胞内可以稳定转录表达,具备

良好的光学性质,例如高于 $2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ 的跃迁截面、接近 80% 的荧光量子产率、ns 量级的荧光寿命以及在外界合适波长的激光抽运下可形成准四能级的激光系统,是良好的细胞激光器增益介质。由图 2 可以看到,在相同的抽运条件下,随着 GFP 水溶液浓度的增加,其荧光光谱整体发生红移,这与荧光蛋白本身的重吸收作用有关,一般在高于 100 μm 条件下,未被抽运的 GFP 荧光分子会增大腔内的损耗,因而激光器的阈值也会随之增加,通常生物组织内 GFP 浓度为 $\mu\text{mol/L}$ 到 mmol/L 量级^[43-44],因此,选择单个表达 GFP 的细胞进行激光输出来实现低阈值的细胞激光器。同时,GFP 具有较宽的吸收光谱范围,而且由图 3 可知,在不同的抽运波长如 460、465、470、475、480 nm 下,发射荧光光谱基本一致。实验中使用的 HEK293 人胚肾细胞,直径为 13.8 μm ,是细胞生物学中常用来进行转染的哺乳动物细胞,将其置于 37 $^\circ\text{C}$ 、二氧化碳体积分数为 5% 的标准条件下培养,使用 GeneJuice(Novagen)作为转染试剂,在转染 72 h 后用胰蛋白酶收集细胞,并使用标准荧光辅助细胞分选试剂(FACS Aria III, BD)选择出稳定表达 GFP 的细胞,清洗后悬浮于完全培养皿内,细胞数浓度在 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 左右。

图2 GFP 的发射和吸收光谱^[17]Fig. 2 Emission and absorption spectra of GFP^[17]图3 不同抽运波长下 GFP 的发射光谱^[17]Fig. 3 Emission spectra at different pump wavelengths^[17]

实验装置如图 4 所示,谐振腔是两片涂覆有高反膜的分布布拉格反射镜(DBR)的石英基板,两块布拉格反射镜之间用校准直径为 $20\ \mu\text{m}$ 的玻璃珠粘合而成,这样不仅可以给细胞留有足够的存在空间,有效避免细胞因受外界压力而产生形变,而且可以将两片高反镜固定,形成一个相对稳定的谐振腔。取制备好的细胞悬液 $10\ \mu\text{L}$,置于两片布拉格反射镜之间,由于毛细作用,细胞将自然进入谐振腔内并很快实现均匀分布,整个谐振腔安装在三维调整平台上以便调整样品细胞,使抽运光能够均匀地作用于细胞。 $465\ \text{nm}$ 激光器经 $40\times$ 的显微物镜聚焦,使光斑缩小至单个细胞尺寸,减少悬液中细胞间的相互作用,从而减少散射损耗。在抽运光的激励下,可以得到如图 5 所示的输出激光能量随抽运光能量拟合曲线的激光阈值。图 6 为在不同抽运条件下(分别为 $0.9\ \text{nJ}$ 和 $5.0\ \text{nJ}$)探测到的输出光谱图,可以看到在阈值附近略高于阈值时,为单个激光峰、半峰全宽小于 $0.04\ \text{nm}$,当抽运能量不断增加,会出现更多的谱峰,显示出丰富又不规则的强度模式,经验证这是一种介于拉盖尔和高斯之间的横模结构,可能是由于其对细胞内的折射率变化极其敏感。综上所述,单个细胞受激辐射产生的增益足以弥补生物细胞间的散射和吸收损耗,形成激光输出,并且在一段时间内细胞仍能保持其生理活性。

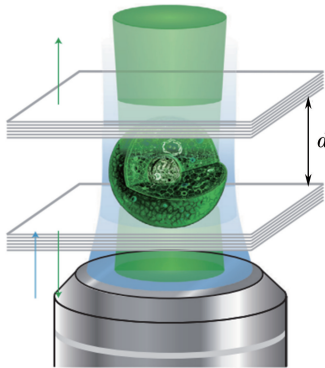


图 4 单细胞激光器装置图^[17]

Fig. 4 Installation diagram of single cell lasers^[17]

同年 8 月, Gather 等^[45]采用相同的实验装置,实现了单个大肠杆菌细胞的激光输出。通过对大肠杆菌进行基因改造,使其稳定转录表达 GFP,实现阈值为 $160\ \text{nJ}$ 的激光输出。

2.2 基于回音壁模式微腔的细胞激光器

2.2.1 理论分析

光学微腔^[46]将光限制在微纳量级的谐振腔内,被广泛应用于新型激光器、光通信及非线性光学器

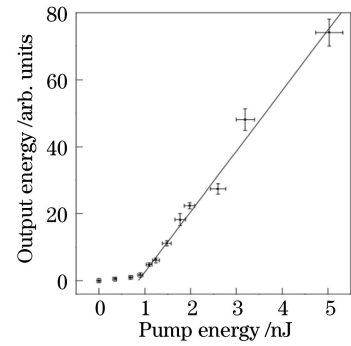


图 5 激光输出能量随抽运光能量变化^[17]

Fig. 5 Laser output energy as a function of pump energy^[17]

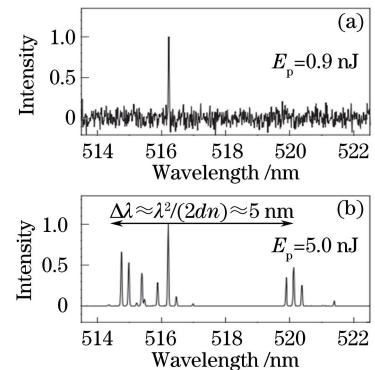


图 6 抽运能量分别为 $0.9\ \text{nJ}$ (a) 和 $5\ \text{nJ}$ (b) 时的输出光谱图^[17]

Fig. 6 Output spectra for pump energies of $0.9\ \text{nJ}$ (a) and $5\ \text{nJ}$ (b), respectively^[17]

件等领域。回音壁最早是建在光滑整齐的围墙建筑内,比如北京天坛的回音壁,声波可以沿墙面不断反射前进,使相聚一两百米的人可以通过回音壁墙面进行沟通。同样地,当传输的声音信号变为光信号,并在光学微腔内进行传输即为回音壁模式的微腔,从某种程度上可以理解为法布里-珀罗腔中往返传输的光线沿圆形轨迹绕腔前行,如图 7 所示。回音壁模式光线在腔内应满足两个基本条件方可实现稳定传输^[47],其中一个为全内反射条件,公式如下:

$$\theta > \theta_c = \arcsin(n_2/n_1), \quad (13)$$

式中, n_1 为腔内介质折射率, n_2 为腔外介质折射率。当光线入射角度大于某一临界角时,根据折射率导光原理,光线会被限制在高折射率介质内传输,而不发生折射。另一个条件为相位匹配条件,谐振波长的计算公式为

$$\lambda = \frac{2\pi R n_{\text{eff}}}{m}, \quad (14)$$

式中, R 为光学微腔的半径, n_{eff} 为介质的有效折射率, m 为整数。

这种限制光场的方式可以使腔内光强度非常

高,能有效提高抽运效率,从而极大地降低激光阈值,在很大程度上可以满足细胞生物学中的应用需求。

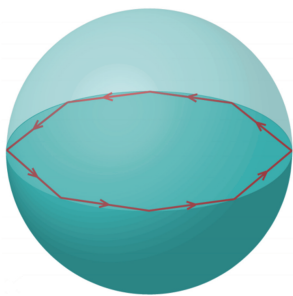


图7 回音壁模式原理图

Fig. 7 Schematic of whispering gallery mode

目前已报道的关于回音壁模式微腔的制备材料主要包括:液滴^[48-49],利用液体强表面张力形成的光滑边界形成天然的光学微腔;玻璃,利用熔融石英烧结成微球或者将光纤通过熔融拉锥的方式制成环形谐振腔^[50-52];半导体,多采用微纳加工及刻蚀的方式制备微盘腔^[53-54];聚合物^[55-56],加工容易、结构灵活且成本低,近年来应用广泛,可以通过掺杂或者表面涂覆荧光材料的方式制成各种形式的光学微腔。

2.2.2 实验研究现状

2015年,哈佛大学医学院的Humar等^[57]研制了多款基于回音壁模式微腔的细胞激光器。按照微腔的制备材料可以将其分为以下两类。

1) 使用油滴或是从新鲜猪皮组织中提取的脂肪细胞。实验中使用的抽运源为535 nm脉冲激光器,脉宽为5 ns,重复频率为10 Hz。增益介质为尼罗红染料,与聚苯醚油均匀混合为折射率为1.69、直径在4~20 μm 的无毒低黏度液滴,使用显微注射器将其注入HeLa细胞内,如图8所示。在抽运光激励下,可以得到如图9所示的输出光谱图,观察其精细结构可以发现每一个模式内均有多个小的分裂谱线,这是因为细胞在外界激光抽运下受力不均,整个细胞近似为椭球型而产生多个子模式,实验测得激光阈值为nJ量级,细胞在一段时间内仍能保持其正常的生理活性。

猪皮的脂肪细胞内含有单一的规则球形脂滴,将1 mL含有1 mg/mL胶原酶和1% 10 mmol/L尼罗红的丙酮溶液的磷酸盐缓冲液(PBS)注射到皮下猪脂肪组织中,细胞直径为45 μm ,如图10和图11所示。猪皮组织在37 $^{\circ}\text{C}$ 、二氧化碳体积分数为5%的条件下培养15 min,用535 nm激光抽运,输出信号经芯径200 μm 的多模光纤耦合至光谱探测

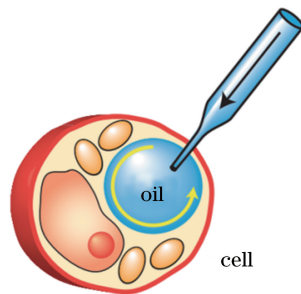


图8 注入油滴细胞激光器^[57]

Fig. 8 Injected oil droplet cell lasers^[57]

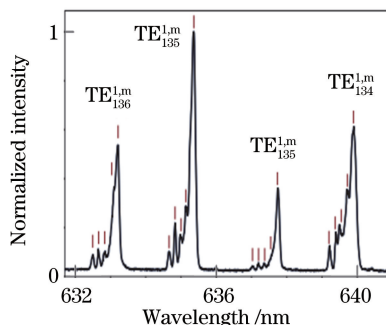


图9 油滴激光器的输出光谱图^[57]

Fig. 9 Output spectrum of injected oil droplet lasers^[57]

器,得到输出光谱如图12所示,证明了在天然的细胞内也可实现激光输出,该类型激光器被评为2015年十大新型激光器之一。

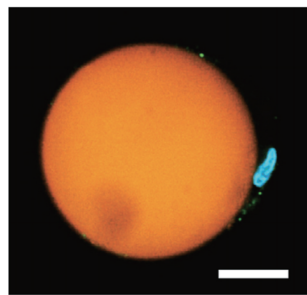
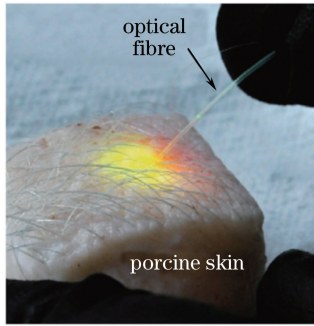
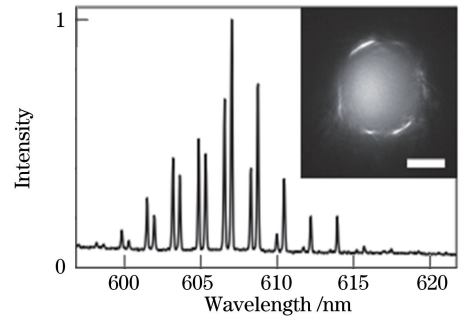
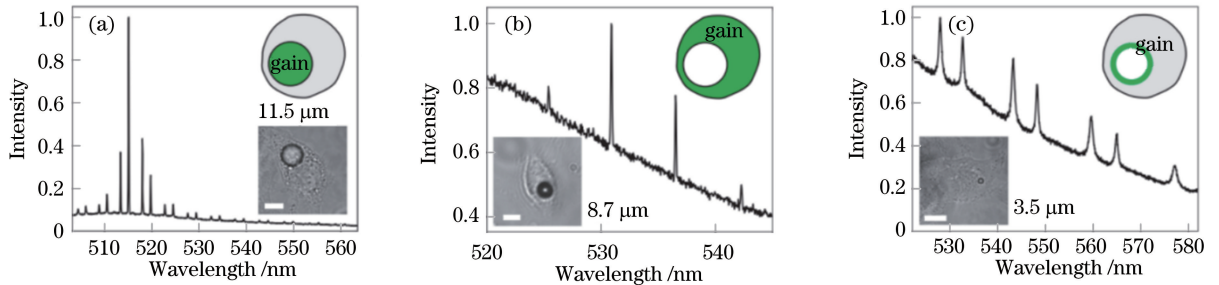


图10 含有大脂滴(橙色)的脂肪细胞的共聚焦显微图像^[57]

Fig. 10 Confocal image of an adipocyte containing a large lipid droplet (orange)^[57]

2) 使用聚合物材质的微球作为谐振腔,巨噬细胞和非吞噬细胞(如HeLa和NIH3T3细胞)可以吞噬直径达20 μm 的微球,利用HeLa细胞的细胞内吞作用使微球进入细胞内部形成微腔,同时根据荧光染料所提供增益的不同位置,分别实现了直径为11.5 μm 的荧光微球、在荧光染料标记细胞内的直径为8.7 μm 的BaTiO₃微球及经荧光染料(Alexa Fluor 488)表面涂覆的直径3.5 μm 的BaTiO₃微球回音壁模式的激光输出,输出光谱图如图13所示。

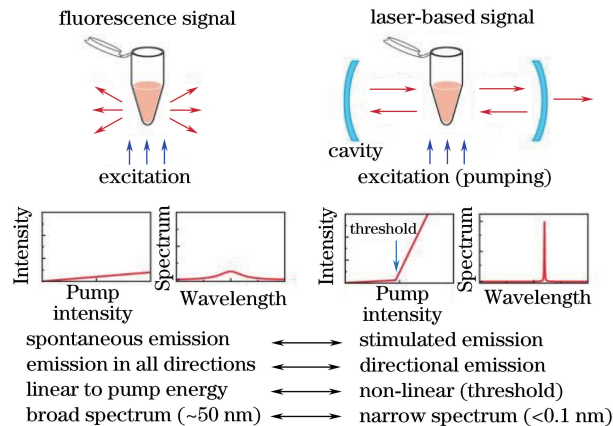
图 11 猪皮细胞激光器实物图^[57]Fig. 11 Physical device diagram of porcine skin cell laser^[57]图 12 脂肪细胞输出光谱^[57]Fig. 12 Output spectrum of adipocyte^[57]图 13 三种微球谐振腔及其输出光谱图^[57]。(a)增益在微球内;(b)增益在微球外;(c)增益在微球表面Fig. 13 Three types of microsphere resonators and their output spectra^[57]. (a) Gain in microspheres;

(b) gain outside microspheres; (c) gain on the surface of microspheres

3 细胞激光器的应用前景

虽然目前关于细胞激光器的研究仍处于起步阶段,但它打开了激光光子学和生命科学领域崭新的

大门,为基础学科研究和应用提供了许多新的可能性。相比于目前生物医学各个领域中所常用到的荧光信号探测方法,采用激光信号探测的方式具有其自身独特的优势^[58],如图 14 所示。

图 14 荧光探测和激光探测的对比^[58]。(a) 荧光信号;(b) 激光信号Fig. 14 Comparison of fluorescence-based detection and laser-based detection^[58]. (a) Fluorescence signal; (b) laser-based signal

1) 荧光信号来源于材料的自发辐射光,在各个方向上都有信号,而激光信号则是受激辐射光,经过谐振腔的反馈放大,具有良好的方向性。

2) 荧光信号的发射能量随抽运能量呈较平缓的线性变化,而激光信号在抽运能量低于阈值时变化趋势与荧光信号类似,但当抽运能量高于阈值时,

输出能量陡增,样品信号探测的分辨率和灵敏度都远高于荧光探测。

3) 一般情况下,发光材料的荧光光谱的谱线都较宽,大约在 50 nm 数量级,但是激光信号经过粒子数反转,其输出光谱线宽极窄,一般小于 0.1 nm,能够对样品探测过程进行及时响应。

3.1 生物传感

2015年, Humar 等^[57]借助于回音壁模式微腔的细胞激光器实现了细胞对于外界环境中氯化钠溶液的传感探测。将 Alexa Fluor 488 荧光染料涂覆在直径为 $3.5\ \mu\text{m}$ 的微球表面, 经过细胞内吞作用进入 HeLa 细胞内作为传感微腔, 当外界环境中加入氯化钠溶液时, 由于渗透作用, 细胞内的水迅速溢出细胞, 细胞体积的变小导致细胞质中分子浓度增加, 从而微球腔内外的折射率差发生改变, 回音壁模式峰值发生偏移。

2017年, Humar 等^[59]将 HeLa 细胞与表面涂覆了 GFP 的 BaTiO_3 微球一起在完全培养基条件下培养, 培养温度为 $37\ ^\circ\text{C}$ 、二氧化碳体积分数为 5% , 在长时间细胞培养检测过程中, 发现那些内吞了微球的细胞在有丝分裂过程中, 微球会传递给两

个子细胞中的一个, 并且整个有丝分裂过程中微球光谱会发生 $30\ \text{pm}$ 的频移, 如图 15(a) 所示, 这是因为细胞的有丝分裂过程会引起细胞内环境的变化, 从而改变微腔内外的折射率差, 使光谱产生频移, 如图 15(b) 所示, 实现了对细胞正常生命活动的光学传感探测, 有利于进一步了解基础细胞生物学过程。

同年, Schubert 等^[60]采用直径为 $15\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯绿色荧光微球作为谐振微腔, 将 3T3 成纤维细胞作为研究对象, 从 5% 的低体积分数状态开始培养, 并进行了长达 $41\ \text{h}$ 的追踪实验, 共观察到三次细胞有丝分裂过程, 在整个实验过程中, 微球均处于细胞内, 比较第一次和最后一次探测到的光谱, 其自由光谱范围变化了 $6\ \text{pm}$, 如图 16 所示, 实现了对连续几代细胞的光学传感探测。

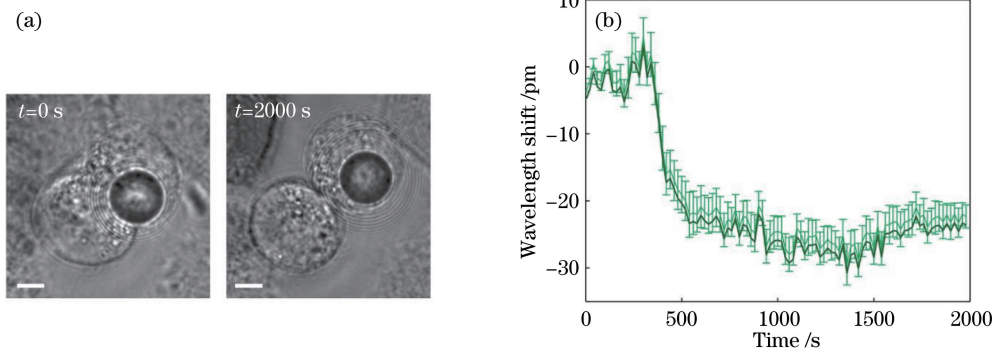


图 15 HeLa 细胞分裂过程的 BaTiO_3 微球^[59]。(a) 微球在细胞内的明场图像; (b) 有丝分裂过程的光谱频移
Fig. 15 BaTiO_3 microsphere during HeLa cell division^[59]. (a) Bright-field images of microspheres in cells; (b) measured spectral shifts of mitosis progress

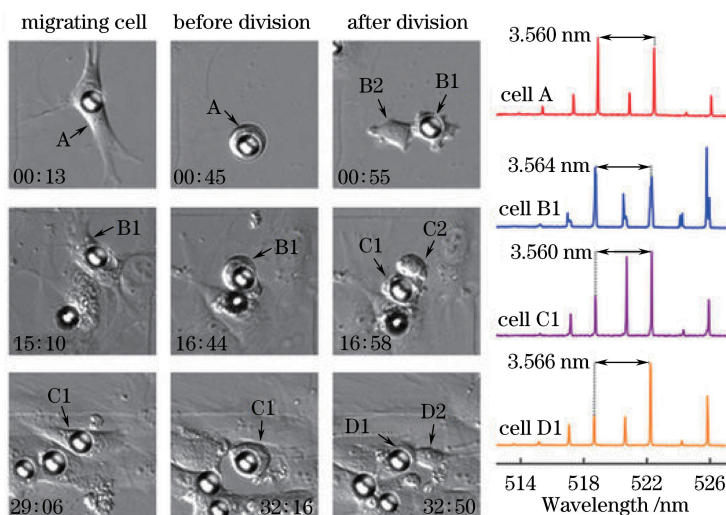


图 16 3T3 细胞分裂过程的聚苯乙烯微球图像及相应的发射光谱^[60]。

母细胞表示为 A(红色), 随后的子代分别用 B(蓝色), C(紫色)和 D(橙色)标记

Fig. 16 Polystyrene microsphere images and corresponding emission spectra of 3T3 cell division process^[60]. Mother cells are denoted as A (red) and subsequent daughter generations are labeled with B (blue), C (violet) and D (orange), respectively

此外,基于法布里-珀罗腔的细胞激光器还可以应用于细胞计数及活体细胞生物分析等。将两面平行的高反腔镜垂直放置,细胞在腔内的流体通道内流动,在外界激光器抽运下,通过对输出光谱进行探测,可以实现对细胞的精准计数、低浓度荧光分子的探测及对由某种特定材料结构变化而引起输出光谱变化的单分子传感探测^[58],如图 17 所示。通过设计不同的谐振腔型,选择不同的荧光材料,可以设计出很多传感装置,在活体细胞的体外生物特性传感分析方面有许多未知的领域需要探索。

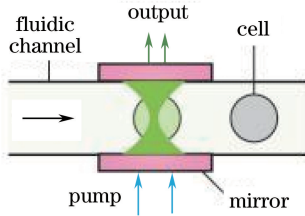


图 17 活体细胞生物分析装置^[58]

Fig. 17 Living cell biological analysis device^[58]

3.2 细胞标记

2015 年,在 Humar 等^[58]报道的工作中,直径为 $8\sim 12\ \mu\text{m}$ 的荧光聚苯乙烯微球经细胞内吞作用进入 HeLa 细胞内部,在外界激光器抽运下实现微球腔的回音壁模式的细胞激光输出。由细胞内部动力学理论可知:

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \approx \frac{\Delta n'}{n'} + \frac{\Delta d}{d}, \quad (15)$$

式中, λ 为出射激光波长, n' 为微腔折射率, d 为微腔直径。对于直径为 $8\sim 12\ \mu\text{m}$ 的微球,以光谱分辨率为 $2\ \text{nm}$ 计算,通过输出光谱可以分辨出 2000 个不同尺寸的微球,如果同时使用不同发射波段的荧光染料,那么可分辨的微球数量将成倍增加,甚至可以达到人体内细胞数量,如图 18 所示。利用此项单一技术来单独标记靶向细胞,使得同时追踪上千个细胞成为可能,从而可以研究每一个细胞的生命活动过程,并进行目标组织细胞的定位。

同年,Schubert 等^[60]借助于在不同的细胞内探测到的主激光波长 λ_{max} 和激光光谱中两个 TE 峰值间距 $\Delta\lambda$ 不同的原理,使用 6 个巨噬细胞内吞聚苯乙烯荧光微球的样品(C1~C6),进行长达 19 h 的跟踪探测,检测过程中细胞能保持正常的生理活性,并且每次探测的光谱主峰波长和峰值间距基本不变,只有一个细胞(细胞 C3),主峰位置有较大频移($0.15\ \text{nm}$)、 $\Delta\lambda$ 不变($\Delta\lambda = 4.638\ \text{nm}$),如图 19 所示,在实验上验证了细胞标记追踪应用的稳定性和

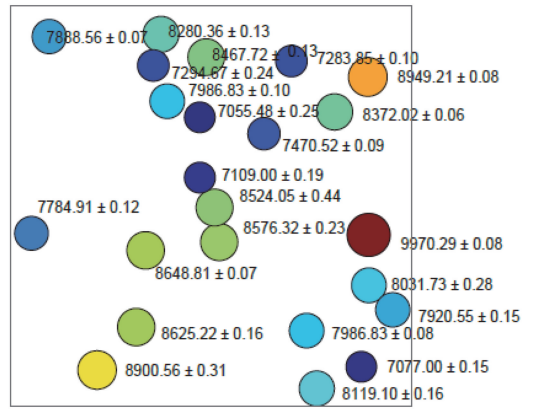


图 18 微球高光谱图像所对应的直径^[57]

Fig. 18 Corresponding diameters of hyperspectral image of microspheres^[57]

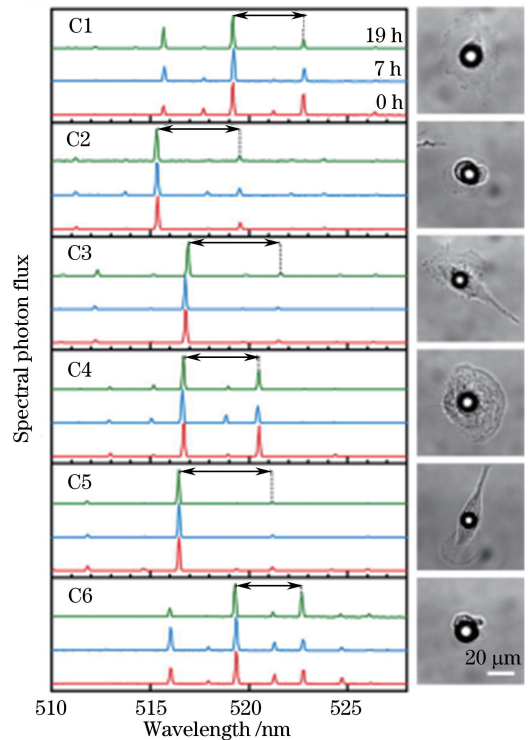


图 19 在 0,7,19 h 时每个细胞发射光谱及 0 h 的明场图像^[60]

Fig. 19 Emission spectra of each cell at 0, 7, 19 h and bright-field images of each cell at 0 h^[60]

生物兼容性。

2017 年,Humar 等^[61]在之前工作的基础上,制成一个微流控芯片装置,通道截面为 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 、长 $58.5\ \text{mm}$,通道一端是待测细胞悬液($2.1 \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$)的注射通道,另一端用于收集细胞的磷酸盐缓冲液,芯片安装在倒置显微镜装置中,方便进行成像和光谱探测,如图 20 所示。将测得的光谱减去宽带背景噪声,并进行洛伦兹线性拟合得出 WGM 峰

值波长,得到每一个光谱所对应细胞的 WGM 峰值排列的条形码,如图 21 所示,进而可以得到一套完备的参考条码库,实现更高精度的细胞标记。

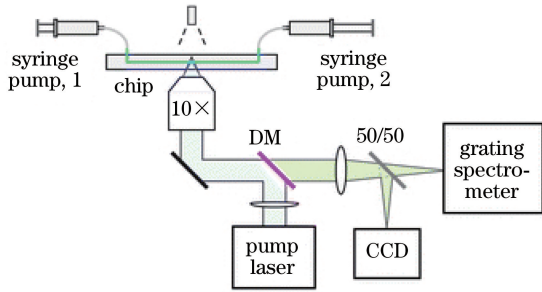


图 20 微流控芯片装置图^[61]

Fig. 20 Schematic of the microfluidic chip setup^[61]

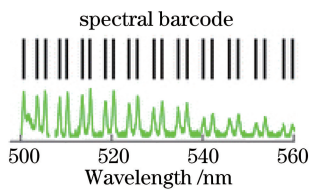


图 21 处理得到的光谱条形码^[61]

Fig. 21 Spectrum barcode after data processing^[61]

3.3 医学诊断治疗

利用输出激光自身的光热及光化学作用,在外界光信号激励下发射激光,利用热效应杀死病变组织;同时可对目标组织处(比如癌性肿瘤区域)被改造的细胞进行定位,通过事先运载的光敏性药物,在外界光信号激励下,释放药物进行靶向治疗,这些潜在应用都有望用来增强光动力治疗效果^[62],特别是在外部光学刺激无法达到的深度组织中,可实现对病变组织的靶向定位、定向载药和治疗。

3.4 成像领域

目前用来提高显微镜成像分辨率和灵敏度的方法是借助于受激辐射,基于此便有了受激辐射耗尽显微镜(STED)^[63]、受激拉曼散射显微镜(SRS)^[64]

和抽运探针显微镜^[65-66]。将基于法布里-珀罗腔的细胞激光器放置于待成像分析的样品组织中,通过聚焦抽运来达到细胞激光器的阈值,控制细胞激光器的开闭,这样被选中的细胞激光器可作为局部抽运光源,如图 22 所示。此方法可用来提高三维成像分辨率,实现低背景噪声成像,同时也是减少成像治疗过程中光学衰减及增加光学穿透深度的有效方法,通过成像可以看到组织的三维结构信息,有利于实现精确光学诊断,比如癌症^[67]和动脉粥样硬化^[68]等疾病。

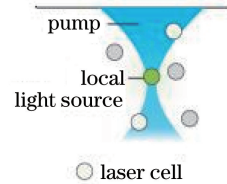


图 22 细胞激光器作成像光源的原理图^[58]

Fig. 22 Schematic of cell lasers for imaging source^[58]

3.5 可植入体内的新型光源

细胞激光器通常具备良好的生物兼容性,因此,可作为植入生物组织体内的新型光源而不引起机体的免疫反应。2017年,Humar等^[69]报道了关于可植入角膜、血液内和皮肤的微型激光器,如图 23 所示,图 23(a)为将直径为 $8\ \mu\text{m}$ 的绿色荧光聚苯乙烯微球植入新鲜的牛角膜内(折射率取值范围为 $1.37\sim 1.38$);图 23(b)为掺杂尼罗红染料、直径为 $40\ \mu\text{m}$ 的生物可降解 PLA 微球,将其植入人血液内,可以看到微球周围被红细胞包裹,但不会阻碍激光的发射;图 23(c)为直径 $49.8\ \mu\text{m}$ 的尼罗红染料 PLA 微球,利用标准纹身机植入猪皮组织内,在皮肤表面下方 $100\ \mu\text{m}$ 处可实现激光发射。这些结果表明,基于回音壁模式的微型激光器可以植入体内,实现体内发光。这有望为将来实现体内的光动力治疗或光热治疗提供新型光源。

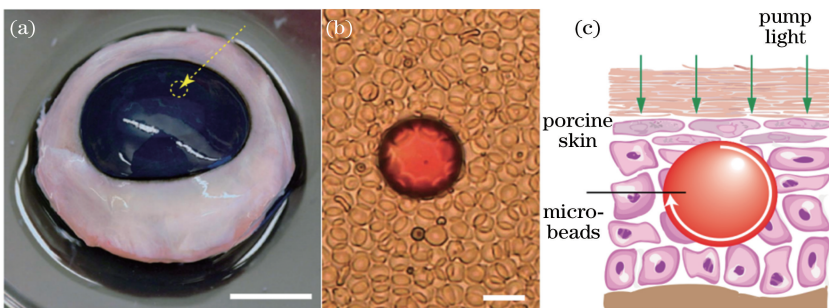


图 23 可植入生物组织的微型激光光源^[69]。(a)植入牛角膜;(b)植入人血液;(c)植入皮肤组织

Fig. 23 Micro-laser source for implantable biological tissue^[69]. (a) Implant in the bovine cornea;

(b) implant in the blood; (c) implant in the skin tissue

4 结 论

细胞激光器是 21 世纪以来学科交叉融合^[70]发展趋势下出现的一种新型激光器,关于它的研究目前仍处于起步阶段,但其有着广阔的发展空间。本文总结了细胞激光器的研究现状,按照腔型设计原理分为法布里-珀罗腔和回音壁模式微腔,并作了相应的理论和实验原理分析;同时,基于细胞激光器的理论实验研究,着重介绍了其在生物传感、细胞标记、医学诊断治疗及成像领域的应用实例和应用发展前景。在今后的科学研究中,不仅可以设计研究新的谐振腔型,比如采用化学抽运和电抽运等方式、制备基于光子晶体的谐振微腔、利用细胞质内包含的各种细胞器和微结构形成闭环散射路径来提供光反馈,形成细胞随机激光器;还可以探索细胞激光器在光学、生物学和医学等领域的应用。

参 考 文 献

- [1] Zhao K H, Zhong X H. Optics[M]. Beijing: Peking University Press, 1984.
赵凯华, 钟锡华. 光学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1984.
- [2] Maiman T H. Stimulated optical radiation in ruby [J]. Nature, 1960, 187: 493-494.
- [3] Zhao B L. The latest development of solid-state lasers[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 1981, 18(9): 1-10.
赵伯林. 固体激光器的最近进展[J]. 激光与光电子学进展, 1981, 18(9): 1-10.
- [4] Qing G. The new development of solid-state lasers [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 1984, 21(5): 4-7.
卿光. 固体激光器的新发展[J]. 激光与光电子学进展, 1984, 21(5): 4-7.
- [5] Hong G. The new development of solid-state lasers [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 1986, 23(2): 10-14.
红光. 固体激光器的新进展[J]. 激光与光电子学进展, 1986, 23(2): 10-14.
- [6] Gan Q J, Jiang B X, Zhang P D, *et al.* Research progress of high average power solid-state lasers[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(1): 010003.
甘啟俊, 姜本学, 张攀德, 等. 高平均功率固体激光器研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(1): 010003.

- [7] Werle P. A review of recent advances in semiconductor laser based gas monitors [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1998, 54(2): 197-236.
- [8] Lang J H, Gu B, Xu Y, *et al.* The GaN-based semiconductor materials LDs[J]. Laser Technology, 2003, 27(4): 321-324, 327.
郎佳红, 顾彪, 徐茵, 等. GaN 基材料半导体激光器综述[J]. 激光技术, 2003, 27(4): 321-324, 327.
- [9] Lou Q H, Zhou J, Zhu J Q, *et al.* Recent progress of high-power fiber lasers[J]. 2006, 35(2): 135-138.
楼祺洪, 周军, 朱健强, 等. 高功率光纤激光器研究进展[J]. 红外与激光工程, 2006, 35(2): 135-138.
- [10] Wu Z L, Lou Q H, Zhou J, *et al.* Research progress of pumping methods for fiber laser [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2004, 41(4): 30-34.
吴中林, 楼祺洪, 周军, 等. 光纤激光器的抽运方法研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2004, 41(4): 30-34.
- [11] Erickson D, Sinton D, Psaltis D. Optofluidics for energy applications[J]. Nature Photonics, 2011, 5: 583-590.
- [12] Psaltis D, Quake S R, Yang C. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics [J]. Nature, 2006, 442(7101): 381-386.
- [13] Monat C, Domachuk P, Eggleton B J. Integrated optofluidics: a new river of light [J]. Nature Photonics, 2007, 1: 106-114.
- [14] Helbo B, Kristensen A, Menon A. A micro-cavity fluidic dye laser[J]. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003, 13(2): 307-311.
- [15] Fan X D, White I M. Optofluidic microsystems for chemical and biological analysis [J]. Nature Photonics, 2011, 5: 591-597.
- [16] Schmidt H, Hawkins A R. The photonic integration of non-solid media using optofluidics [J]. Nature Photonics, 2011, 5: 598-604.
- [17] Gather M C, Yun S H. Single-cell biological lasers [J]. Nature Photonics, 2011, 5: 406-410.
- [18] Lan X J. Laser Technology [M]. Beijing: Science Press, 2000.
蓝信钜. 激光技术[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [19] Zhou B K, Gao Y Z, Chen T R, *et al.* Laser Principle [M]. 7th ed. Beijing: National Defense Industry Press, 2014.
周炳琨, 高以智, 陈倜嵘, 等. 激光原理[M]. 7 版. 北京: 国防工业出版社, 2014.

- [20] Balslev S, Kristensen A. Microfluidic single-mode laser using high-order Bragg grating and antiguiding segments[J]. *Optics Express*, 2005, 13(1): 344-351.
- [21] Li Z N, Zhang Z Y, Emery T, *et al.* Single mode optofluidic distributed feedback dye laser[J]. *Optics Express*, 2006, 14(2): 696-701.
- [22] Sun Y, Fan X. Distinguishing DNA by analog-to-digital-like conversion by using optofluidic lasers[J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 124(5): 1236-1239.
- [23] Chen Q S, Zhang X W, Sun Y Z, *et al.* Highly sensitive fluorescent protein FRET detection using optofluidic lasers[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(14): 2679-2681.
- [24] Aubry G, Kou Q, Soto-Velasco J, *et al.* A multicolor microfluidic droplet dye laser with single mode emission[J]. *Applied Physics Letters*, 2011, 98(11): 111111.
- [25] Wu X, Chen Q S, Sun Y Z, *et al.* Bio-inspired optofluidic lasers with luciferin[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 102(20): 203706.
- [26] 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.
- [27] Sun Y Z, Shopova S I, Wu C S, *et al.* Bioinspired optofluidic FRET lasers via DNA scaffolds [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(37): 16039-16042.
- [28] Zhang X W, Lee W, Fan X D. Bio-switchable optofluidic lasers based on DNA Holliday junctions [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(19): 3673-3675.
- [29] Schäfer J, Mondia J P, Sharma R, *et al.* Quantum dot microdrop laser[J]. *Nano Letters*, 2008, 8(6): 1709-1712.
- [30] Nizamoglu S Gather M C, Yun S H. All-biomaterial laser using vitamin and biopolymers [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(41): 5943-5947.
- [31] Yang Y, Liu A Q, Lei L, *et al.* A tunable 3D optofluidic waveguide dye laser via two centrifugal Dean flow streams [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(18): 3182-3187.
- [32] Shopova S I, Zhou H Y, Fan X D, *et al.* Optofluidic ring resonator based dye laser [J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(22): 221101.
- [33] Lee W, Fan X D. Intracavity DNA melting analysis with optofluidic lasers [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(21): 9558-9563.
- [34] Qian S X, Snow J B, Tzeng H M, *et al.* Lasing droplets: highlighting the liquid-air interface by laser emission[J]. *Science*, 1986, 231(4737): 486-488.
- [35] Moon H J, Chough Y T, An K. Cylindrical microcavity laser based on the evanescent-wave-coupled gain[J]. *Physical Review Letters*, 2000, 85(15): 3161-3164.
- [36] Azzouz H, Alkhafadiji L, Balslev S, *et al.* Levitated droplet dye laser[J]. *Optics Express*, 2006, 14(10): 4374.
- [37] Kiraz A, Sennaroglu A, Doganay S, *et al.* Lasing from single, stationary, dye-doped glycerol/water microdroplets located on a superhydrophobic surface [J]. *Optics Communications*, 2007, 276(1): 145-148.
- [38] Jiang X S, Song Q H, Xu L, *et al.* Microfiber knot dye laser based on the evanescent-wave-coupled gain [J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(23): 233501.
- [39] Tanyeri M, Perron R, Kennedy I M. Lasing droplets in a microfabricated channel [J]. *Optics Letters*, 2007, 32(17): 2529-2531.
- [40] Tang S K, Li Z Y, Abate A R, *et al.* A multi-color fast-switching microfluidic droplet dye laser[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(19): 2767-2771.
- [41] Humar M, Gather M C, Yun S H. Cellular dye lasers: lasing thresholds and sensing in a planar resonator[J]. *Optics Express*, 2015, 23(21): 27865-27879.
- [42] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*[J]. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, 59(3): 223-239.
- [43] Chen Y, Wei L N, Müller J D. Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15492-15497.
- [44] Lu P, Vogel C, Wang R, *et al.* Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25: 117-124.
- [45] Gather M C, Yun S H. Lasing from *Escherichia coli* bacteria genetically programmed to express green fluorescent protein [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(16): 3299-3301.

- [46] Vahala K J. Optical microcavities[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 839-846.
- [47] He L N, ÖzdemirŞ K, Yang L. Whispering gallery microcavity lasers[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2012, 7(1): 60-82.
- [48] Ashkin A, Dziedzic J M. Observation of resonances in the radiation pressure on dielectric spheres [J]. *Physical Review Letters*, 1977, 38(23): 1351-1354.
- [49] Tzeng H M, Wall K F, Long M B, *et al.* Laser emission from individual droplets at wavelengths corresponding to morphology-dependent resonances [J]. *Optics Letters*, 1984, 9(11): 499-501.
- [50] Yang L, Vahala K J. Gain functionalization of silica microresonators[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(8): 592-594.
- [51] Takashima H, Fujiwara H, Takeuchi S, *et al.* Fiber-microsphere laser with a submicrometer sol-gel silica glass layer codoped with erbium, aluminum, and phosphorus[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(10): 101103.
- [52] Snee P T, Chan Y, Nocera D G, *et al.* Whispering-gallery-mode lasing from a semiconductor Nanocrystal/Microsphere resonator composite [J]. *Advanced Materials*, 2005, 17(9): 1131-1136.
- [53] McCall S L, Levi A F J, Slusher R E, *et al.* Whispering - gallery mode microdisk lasers [J]. *Applied Physics Letters*, 1992, 60(3): 289-291.
- [54] Van Campenhout J, Rojo-Romeo P, Regreny P, *et al.* Electrically pumped InP-based microdisk lasers integrated with a nanophotonic silicon-on-insulator waveguide circuit [J]. *Optics Express*, 2007, 15(11): 6744-6749.
- [55] Chao C Y, Guo L J. Polymer microring resonators fabricated by nanoimprint technique [J]. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, 2002, 20(6): 2862.
- [56] Dong C H, He L, Xiao Y F, *et al.* Fabrication of high-Q polydimethylsiloxane optical microspheres for thermal sensing[J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 94(23): 231119.
- [57] Humar M, Yun S H. Intracellular microlasers [J]. *Nature Photonics*, 2015, 9: 572-576.
- [58] Fan X D, Yun S H. Optofluidic bio-Lasers: concept and applications [J]. *Nature Methods*, 2014, 11: 141-147.
- [59] Humar M, Yun S H. Whispering-gallery-mode emission from biological luminescent protein microcavity assemblies[J]. *Optica*, 2017, 4(2): 222-228.
- [60] Schubert M, Volckaert K, Karl M, *et al.* Lasing in live mitotic and non-phagocytic cells by efficient delivery of microresonators [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40877.
- [61] Humar M, Upadhy A, Yun S H. Spectral reading of optical resonance-encoded cells in microfluidics[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(16): 2777-2784.
- [62] Kim Y R, Kim S, Choi J W, *et al.* Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer [J]. *Theranostics*, 2015, 5(8): 805-817.
- [63] Hell S W. Far-field optical nanoscopy [J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1153-1158.
- [64] Wang M C, Min W, Freudiger C W, *et al.* RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8: 135-138.
- [65] Min W, Lu S J, Chong S S, *et al.* Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy [J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1105-1109.
- [66] Wang P, Slipchenko M N, Mitchell J, *et al.* Far-field imaging of non-fluorescent species with sub-diffraction resolution [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7: 449-453.
- [67] Polson R C, Vardeny Z V. Random lasing in human tissues [J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(7): 1289-1291.
- [68] Nadkarni S K, Bouma B E, Helg T, *et al.* Characterization of atherosclerotic plaques by laser speckle imaging [J]. *Circulation*, 2005, 112(6): 885-892.
- [69] Humar M, Dobravec A, Zhao X W, *et al.* Biomaterial microlasers implantable in the cornea, skin, and blood [J]. *Optica*, 2017, 4(9): 1080-1085.
- [70] Prasad P N. Introduction to biophotonics [M]. He S L, Trans. Zhejiang: Zhejiang University Press, 2006.
普拉萨德. 生物光子学导论 [M]. 何赛灵, 译. 浙江: 浙江大学出版社, 2006.