

# 无标记光学成像技术

穆书奇<sup>1,2</sup>, 董大山<sup>1,2</sup>, 施可彬<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>北京大学物理学院人工微结构和介观物理国家重点实验室, 北京 100871;

<sup>2</sup>山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006

**摘要** 无标记光学成像以非侵入性的特点,能够对生物活体细胞进行长时程、无损伤的高分辨观测,在生物医学和临床诊断上有着巨大的前景。无标记成像技术可以分为特异性成像和非特异性成像两类,主要概述目前常用的无标记成像技术。详细介绍了各种无标记成像技术的成像原理、优缺点和最新研究进展。最后,对无标记光学成像未来的发展进行展望。

**关键词** 无标记显微成像; 特异性成像; 非特异性成像; 生物光子学

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1200001

## Label-Free Optical Imaging Technology

Mu Shuqi<sup>1,2</sup>, Dong Dashan<sup>1,2</sup>, Shi Kebin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

**Abstract** Label-free optical imaging technology can perform long-term, noninvasive, high-resolution imaging on living cells owing to its noninvasive characteristics. This technology has promising applications in biomedical research and clinical diagnosis. Label-free imaging technologies can be categorized into specific imaging and nonspecific imaging. In this paper, we review the commonly used label-free imaging. Herein, the imaging principles, advantages and disadvantages, as well as the recent progresses of unmarked imaging are introduced in detail. Furthermore, the future development of the label-free imaging technology is prospected.

**Key words** label-free microimaging; specific imaging; non-specific imaging; bio-photonics

## 1 引言

21 世纪以来,生物学和医学得到了快速的发展,人们对各种生命过程有了更深入的研究,极大推动了人类文明的进程。生命科学领域的不断发展离不开显微成像技术的支持,显微成像技术作为一种有力的工具,能够在细胞甚至分子尺度上观测

和解释各种生命过程。尽管经历漫长的发展历程,显微成像领域至今一直在不断扩展,新的成像方法层出不穷。

传统的光学显微镜由一系列的光学透镜与可见光照明组成。这种普通显微成像技术支持了 80% 的生命科学研究,但是受阿贝衍射极限的限制<sup>[1]</sup>,光学显微成像技术的分辨率始终存在一定的

收稿日期: 2021-11-01; 修回日期: 2021-11-22; 录用日期: 2021-11-29

基金项目: 国家自然科学基金(92150301, 91750203, 91850111, 12004013)、广东省基础与应用基础研究重大项目(2020B0301030009)

通信作者: \*kebinshi@pku.edu.cn

瓶颈,在可见光范围内横向分辨率无法超过 200 nm,纵向分辨率无法超过 600 nm。染色法和荧光成像的出现开启了特异性超分辨成像的大门。20 世纪 90 年代,研究人员提出了一系列基于荧光分子标记的超分辨光学成像方法,利用荧光分子能级跃迁、荧光灵敏度高和特异性强的特点,成功实现了对待测样品的超分辨观测。受激发射损耗显微成像(STED)<sup>[2]</sup>、随机光学重构显微成像(STORM)<sup>[3]</sup>及光活化定位显微成像(PALM)<sup>[4]</sup>等超分辨技术先后提出,已成为现代分子生物学领域研究物质结构和细胞生命过程的主要技术,成功解决了生物医学领域的众多难题,如揭示了囊泡和细胞膜的融合过程<sup>[5]</sup>、研究了 DNA 和转录因子的动力学作用过程<sup>[6]</sup>、分辨出细胞内的周期性骨架<sup>[7]</sup>等。超分辨荧光成像技术促进了众多领域的相互交叉和快速发展,因而被评选为 2014 年诺贝尔化学奖。

基于荧光标记的成像技术是现阶段生命科学研究的主要表征工具之一,但是对成像样品有较高的要求,尤其是对生物细胞样品,需要进行特定荧光标记物染色,但荧光标记物往往具有一定的生物非兼容性,会影响生物系统的正常生命功能。不仅如此,激光荧光需要较高的光子通量进行照明,这种激发带来的光毒性和荧光信号的漂白效应也限制了样品的成像时间和质量。活细胞长时程三维成像对于荧光成像仍然是亟待解决的难题。无标记光学显微成像方法能够弥补上述荧光成像存在的问题,利用成像样品内在特性或者内源性光学标记物来获得对比度,如通过成像物体对入射光场各分量进行调制,或者样品内在自发荧光物质满足一定激发条件产生自发荧光等进行成像。由于不使用额外标记物,无标记光学成像避免了对样品进行固定、切片、染色等损伤性操作,能够实现非侵入、长时程活体观测,在分子医学和临床诊断上发挥了极大的优势。无标记光学成像技术包含的成像种类多种多样,成像方式各不相同,按照成像机制是否具有对样品物质能带、共振选择性探测的能力,本综述将无标记光学成像划分为非特异性成像和特异性成像。近些年广泛关注的数字全息定量相位成像、傅里叶叠层投影、光学相干断层成像和光学衍射层析成像等技术通过物理散射信号进行探测,获取的图像信息往往是样品折射率分布,把它们归类为非特异性无标记成像。借助于先进激光技术发展起来的二次谐波显微、三次谐波显微、相

干反斯托克斯拉曼散射显微、受激拉曼显微、光声成像等成像方式,可以对样品的电子、分子共振及结构对称性等特异性参数进行探测,把它们归类为特异性无标记成像。下面对各种成像模态和技术进行综述讨论。

## 2 非特异性无标记成像

明场、暗场显微镜是最常见的普通光学显微镜,其使用宽场照明的方式使整个样品成像区域同时暴露在光照下,样品的像直接通过显微光学系统成像在人眼或者探测器上。然而,明场、暗场显微镜难以对具有较高透明度的生物样品进行高分辨的观测,这是由于此类样品对入射光的吸收很小,对光强的影响微乎其微,基于强度成像的普通显微镜不再适用。当入射光穿过透明样品时,由于样品的厚度、形貌和折射率分布随空间位置发生变化,此类样品对入射光场的影响主要是引入了随空间位置变化的相位调制。基于这种想法,1955 年 Zernike<sup>[8]</sup>提出了相衬显微成像技术,其原理就是利用环形相位板引入额外的相位差,使得透射光和散射光发生干涉,从而使得无法观测的相位信息转换成强度的变化。相衬显微成像技术的提出也标志着相位成像技术的诞生,探索并发展新型高灵敏、快速的相位成像方法也成为人们关注的热点。近些年来,随着计算机技术和各种光电探测器的发展,相位成像技术发展迅速,各种方法层出不穷,在生物医学领域中得到了广泛的应用,极大拓宽了无标记光学成像领域。

### 2.1 基于数字全息的定量相位成像

在光学成像中,由于光波的频率较高,探测器得到的只是光场强度分布而丢失了相位信息。为了解决光场相位探测的问题,1948 年 Gabor<sup>[9]</sup>利用干涉同时记录光场的振幅和相位信息,这种方法称为全息术。后来随着计算机技术和光电耦合器件的发展,1994 年 Schnars 等<sup>[10-11]</sup>第一次实现了全息记录 and 再现的数字化,也就是所谓的数字全息术。数字全息定量相位成像采用干涉测量的方法记录光的振幅和相位信息,根据全息记录时信号光和参考光之间是否存在夹角,可分为离轴数字全息和同轴数字全息。后来又衍生出基于时域调制的数字全息定量相位成像,该技术通过外差法或相移法引入物光和参考光的相位差的变化,对不同相位差的全息图进行解算得到相位信息<sup>[12]</sup>。

近些年数字全息定量相位成像技术发展迅速,关注点集中在提高相位测量的准确性和改善成像结果的信噪比,已在传统数字全息技术的基础上发展出很多新型数字全息成像技术。2009年,Shaked等<sup>[13]</sup>首次提出了基于微离轴干涉的两步相移干涉法,这种微离轴的成像方式减小了物光和参考光之间所需的离轴角,降低了离轴全息成像对相机频谱带宽的限制。借助这种优势,后续发展了偏振相移微离轴全息成像技术<sup>[14]</sup>和双波长微离轴全息成像技术<sup>[15-16]</sup>。2014年Guo等<sup>[17]</sup>实现了一种微离轴LED型数字全息成像方法,如图1(a)所示,通过两步盲相移干涉方法<sup>[18]</sup>并结合低时间相干性的LED照明,有效抑制了干涉背景噪声,提高了成像信噪比。在这种离轴全息成像系统中,物光和参考光非共路的成像方法会使得相位测量对环境的变化非常敏感,温度、振动等都会给相位测量带来噪声。为了进一步提高全息成像系统对环境的鲁棒性,2014年Kim等<sup>[19]</sup>发

展了共路的离轴全息测量方法,通过衍射光栅将0级滤波后的光作为参考光与+1级衍射物光进行离轴干涉测量,并对人体红细胞中血红蛋白浓度进行定量检测。同年Hsu等<sup>[20]</sup>利用这种共路的离轴数字全息技术实现了对海拉宫颈癌细胞的快速实时成像,如图1(b)所示。2019年,Yaghoubi等<sup>[21]</sup>提出一种更稳定的单镜头相移数字全息显微成像技术,如图1(c)所示,利用了郎奇光栅进行共路波前分割,成功实现了对活体细胞长时程、高稳定的相位成像。相比传统的马赫-曾德尔离轴全息,这种共路离轴的成像方式结构更稳定,所需光学元件更少,抗环境干扰能力更强,有效提高了成像信噪比。与此同时,科研人员也开展了一系列关于微型数字全息成像的工作。2017年,Bianco等<sup>[22]</sup>通过光刻衍射光栅方法将共路离轴全息成像小型化到芯片量级,如图1(d)所示,赋予了微流控芯片实时光学成像的能力,成功地将其运用到流式细胞的计数中<sup>[23]</sup>。

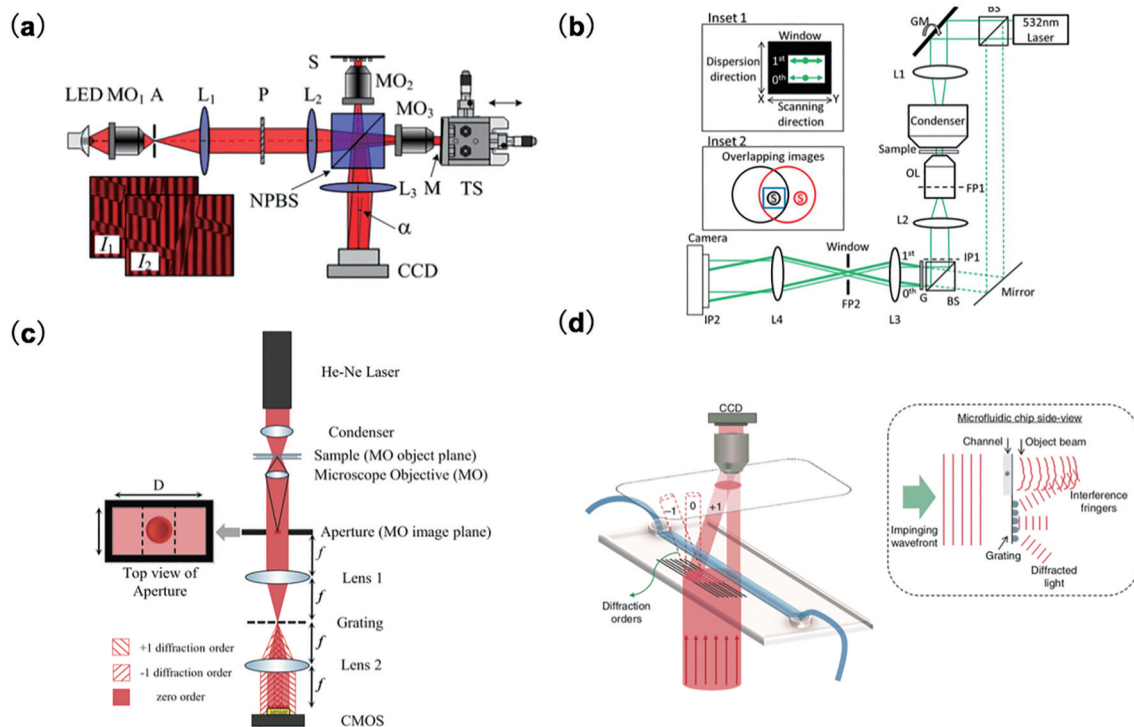


图1 数字全息定量相位成像技术。(a)微离轴LED型数字全息显微成像实验装置<sup>[17]</sup>;(b)共路离轴干涉型数字全息显微成像实验装置<sup>[20]</sup>;(c)共路相移型数字全息显微成像装置<sup>[21]</sup>;(d)片上数字全息显微成像实验装置<sup>[22]</sup>

Fig. 1 Digital holographic quantitative phase imaging. (a) Setup of the LED-based slightly off-axis digital holographic microscopy system<sup>[17]</sup>; (b) setup of the common-path off-axis interference digital holographic microscopy system<sup>[20]</sup>; (c) setup of the common-path phase-shifting digital holographic microscopy system<sup>[21]</sup>; (d) setup of the on-chip digital holographic microscopy system<sup>[22]</sup>

数字全息技术作为一种发展比较成熟的相位成像方法,已成功运用到生物医学的各个领域,在细胞的形态检测、细胞的动力学和生物学参数测

量、生物病例分析等领域发挥着极大的优势。进一步提高相位测量的灵敏度,发展快速、高稳定性的数字全息相位成像技术成为当前研究工作的重点。



除此之外,数字全息技术还可与其他技术结合,比如可以与内窥成像技术结合,用于对人体肿瘤的观测和诊断;也可以与微流控片上结合,实现对药物的快速筛选和分离,在生化工业领域具有很大的潜力。

## 2.2 傅里叶叠层投影显微成像

解决相位问题的另一种方法是通过已知波长的强度或者振幅测量的结果,直接通过算法推演得到相位信息。2013年 Zheng 等<sup>[24]</sup>提出了傅里叶叠层投影显微成像技术(FPM),该技术结合了叠层相位恢复算法<sup>[25-27]</sup>和合成孔径的方法<sup>[28-30]</sup>,使用LED阵列作

为光源提供了可变角度的照明,通过相位迭代算法寻求在频域满足重叠约束条件并在空间域满足强度测量条件的最优解。不同于其他相干合成孔径的方法<sup>[30]</sup>,傅里叶叠层显微成像技术不使用干涉记录的方法,通过相位恢复算法从不同频谱支持的多幅低分辨强度图中获得真实、扩展的高分辨复振幅图。傅里叶叠层显微成像的原理如图 2(a)所示,成像的样品放置在低数值孔径物镜的焦面,依次点亮 LED 得到不同入射角度照明下的图像,其中相邻照明角度要满足子孔径空间频率重叠要求以实现约束。

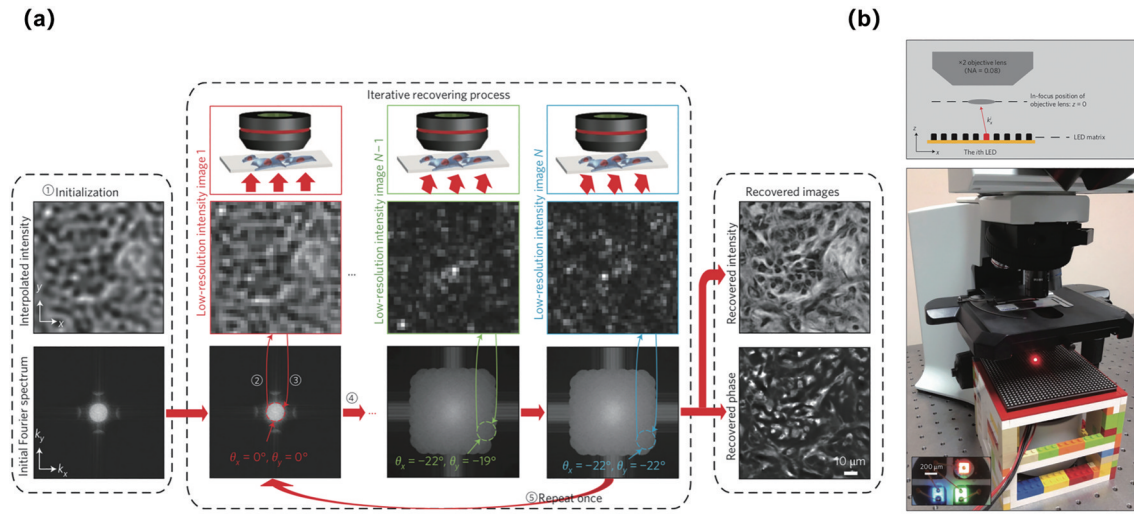


图 2 傅里叶叠层显微成像技术。(a)迭代恢复处理流程<sup>[24]</sup>;(b)成像装置

Fig. 2 Fourier ptychographic microscopy. (a) Iterative recovery procedure<sup>[24]</sup>; (b) imaging setup

傅里叶叠层显微成像具体的重建过程如下所述。

1) 初始化高分辨的样品复振幅透过率  $O(x, y) = \sqrt{I_h} \exp(i\varphi_h)$ , 其中初始时假设样品为振幅型, 满足  $\varphi_h = 0$ 。  $I_h$  为任意低分辨子孔径光强图经上采样后得到的初始高分辨光强图。物体的频谱为  $O(k_x, k_y) = \mathcal{F}\{O(x, y)\}$ ,  $\mathcal{F}$  为傅里叶变换操作, 相应的  $\mathcal{F}^{-1}$  为傅里叶逆变换操作, 系统的相干传递函数为  $P(k_x, k_y)$ 。

2) 在每一个 LED ( $k_x^i, k_y^j$ ) 的照明下, 计算得到与之对应的低分辨估计光场为

$$\sqrt{I_l} \exp(i\varphi_l) = \mathcal{F}^{-1}\left\{O(k_x - k_x^i, k_y - k_y^j)P(k_x, k_y)\right\}. \quad (1)$$

保持低分辨估计光场的相位信息, 利用与之相应的实验采集到的低分辨光强图  $I_{lm}$  更新振幅信息, 得到新的低分辨估计光场  $\sqrt{I_{lm}} \exp(i\varphi_l)$ 。

3) 更新样品复振幅透过率, 表达式为

$$O(k_x, k_y) = \mathcal{F}\left\{\sqrt{I_{lm}} \exp(i\varphi_l)\right\}P(k_x, k_y) + \mathcal{F}\left\{\sqrt{I_l} \exp(i\varphi_l)\right\}\left\{1 - P(k_x, k_y)\right\}, \quad (2)$$

$$O(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\left\{O(k_x, k_y)\right\}. \quad (3)$$

4) 重复步骤 2)、3) 的更新过程, 直至更新全部低分辨强度图  $I_{lm}$ , 完成一轮迭代, 重复步骤 2)~4), 直至重建算法收敛。

傅里叶叠层显微成像技术一经提出就得到了广泛的关注。作为一种快速发展的新一代定量相位成像技术, 它能够有效地兼顾成像视场和空间分辨率之间的关系, 在实现较大的成像视场的同时获得更高的空间分辨率。传统的傅里叶叠层显微成像技术通过逐步点亮 LED 的方法采集上百幅低分辨的图像, 因此需要花费大量的时间进行数据采集, 而且对单组数据的采集时间较长, 要进行活体细胞实时成像需要将单次成像时间缩短至秒量级,



很显然这种成像方式不适合对活体细胞进行长时程、快速成像。提高成像速度主要通过减少图片的数量或单张图像的曝光时间来实现。针对减少图片的数量, Tian 等<sup>[31-32]</sup>先后提出了随机照明角度复用、差分相衬随机照明角度复用的成像方式, 将单组数据采集量降到 21 张, 单组数据采集时间降至 0.8 s, 实现了对活体细胞的长时程成像。2016 年 Sun 等<sup>[33]</sup>独辟蹊径, 采用了对照明角度进行降采样的方法减少数据的冗余, 通过增大 LED 光源的间距、减少 LED 光源数量的方法也成功实现了对较少数量图像的恢复。He 等<sup>[34]</sup>、Lee 等<sup>[35]</sup>及 2019 年 Pan 等<sup>[36]</sup>分别提出了基于衍射光束分光、彩色编码 LED 及微离焦环形照明的单次曝光傅里叶叠层显微成像, 极大降低了傅里叶叠层重构对图像数量的要求。实际拍摄的图像频谱都集中在低频区域, 暗场图像包含较少的信息, 根据这种频谱的稀疏特性并结合压缩感知的方法, 2014 年 Bian 等<sup>[37]</sup>提出一种自适应的数据采集方法, 该方法将数据采集效率提高 1 倍。2015 年 Zhang 等<sup>[38]</sup>提出了自学习的傅里叶叠层成像技术, 进一步降低了 70% 的数据采集量。另一种能够减少拍摄图片数量的方法是利用深度学习<sup>[39-41]</sup>, 预先通过大量的数据训练卷积神经网络, 能够有效降低重构所需的数据要求。

传统的傅里叶叠层显微成像技术得到的结果是二维的复振幅分布, 丢失了轴向信息, 无法对成像样品进行三维成像。利用正向传播模型, 能够将傅里叶叠层显微成像进一步推广到三维成像<sup>[42-43]</sup>, 通过对空间成像物体进行三维离散化, 逐层进行传播, 以多角度照明的二维强度图作为先验信息, 通过正向传播和逆向纠正的迭代算法实现三维成像。但这种正向模型会带来沉重的计算负担, 对单组数据的三维重构需要花费数小时, 很难应用在长时程的成像中。另一种将傅里叶叠层显微成像技术推

广到三维成像的方法就是与光学衍射层析成像结合, 利用弱散射近似下衍射层析模型进行三维频谱迭代重建<sup>[44]</sup>。但对于厚样品, 多次散射的过程愈加明显, 显然这种衍射层析模型不再适用, 发展适合厚样品的三维傅里叶叠层显微成像技术还值得进一步研究。

### 2.3 光学相干断层扫描成像技术

另一种无标记成像的方法是光学相干断层扫描成像技术(OCT)。OCT 是一种结合相位和强度测量的无标记成像技术, 采用外差探测的原理, 利用低相干宽带光源有效地抑制杂散光, 适用于对高散射生物组织细胞进行成像<sup>[45]</sup>。OCT 采集的是物体的背向散射光信息, 不需要进行生理切片等损伤性操作, 具有非侵入、高分辨和高灵敏度等优点, 在眼科疾病诊断、肿瘤检测、血管造影等诸多与人们健康相关的领域中得到了广泛的应用。OCT 技术分为时域和频域两类, 主要原理如图 3 所示。时域 OCT 采用迈克耳孙干涉仪, 光源发出的光被分束器分成两部分, 一部分进入参考臂, 被具有扫描功能的平面镜反射; 另一部分进入测量臂, 通过物镜聚焦在样品处。样品表面背向散射的光返回到样品臂, 通过耦合器或合束器与经参考臂的光相遇形成干涉信号, 被探测器接收, 对光学干涉信号包络进行处理后得到反射信号光的分布。时域 OCT 需要参考臂的轴向扫描来获得整个断层的三维信号, 这一点也限制了其三维成像的速度。频域 OCT 使用光谱仪或者扫频光谱, 利用参考臂和测量臂的干涉光谱与不同深度的背向散射恰好满足傅里叶变换的关系, 收集不同深度信息的背向散射光, 通过傅里叶逆变换来得到样品的轴向深度信息, 结合横向扫描来实现对样品的三维成像, 这种成像方法能够实现几十 kHz 甚至 MHz<sup>[46-48]</sup>的成像速度。

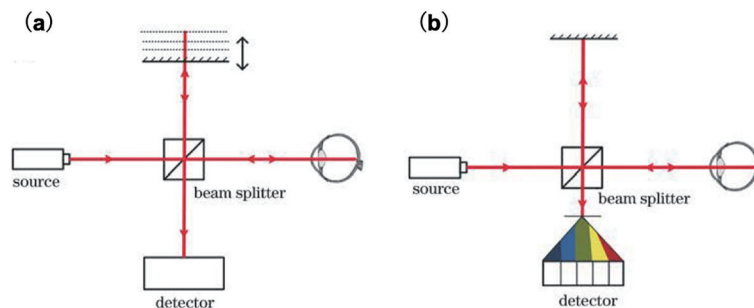


图 3 OCT 结构图<sup>[49]</sup>。(a)时域 OCT; (b)频域 OCT

Fig. 3 OCT structures<sup>[49]</sup>. (a) Time-domain OCT; (b) frequency-domain OCT

多普勒效应 OCT 将多普勒技术和 OCT 技术结合,在不改变 OCT 的成像架构上能够对组织结构和血液动力学同时成像,采用的成像对比机制是检测血液中的流动物质使回光信号相位、振幅产生随时间的变化<sup>[49]</sup>。多普勒 OCT 通过测量流动物体的多普勒频移来获取样品内的流速信息,但只能探测与入射光平行方向的速度分量<sup>[50]</sup>,对于流动方向未知物体,不能够完全确定流速的大小。针对多普勒 OCT 这一问题,近些年先后提出了针对矢量速度探测的 OCT 技术,如基于多普勒展宽的 OCT<sup>[51]</sup>、基于四象限探测的多普勒 OCT<sup>[52]</sup>、基于三层分束器的多普勒 OCT<sup>[53]</sup>等技术,这些技术将多普勒 OCT 技术应用领域扩展到对大范围立体流动场的三维矢量速度测量。借助于这些优点,多普勒 OCT 能够对人体血液流动进行定量分析,用于检测视网膜相关的疾病,能很好区分新生的血管瘤和小动脉瘤,在糖尿病视网膜膜的病变、视网膜动脉阻塞、脉络膜增生<sup>[54-55]</sup>的预防和诊断方面提供了技术支持。

随着生物医学的深入和发展,对组织细胞的成像分辨率有了更高的要求。光学相干显微成像技术(OCM)孕育而生。OCM 结合了 OCT 和共聚焦显微镜,运用高数值孔径物镜,继承了 OCT 技术三维快速、高轴向分辨率等特点的同时提高了横向分辨率,分辨率达到了亚微米量级<sup>[56-58]</sup>。OCT 成像技术都会面临成像深度的问题,由于采集的是样品背向散射光,当成像深度较深时,多次散射产生的杂散光影响了深层成像的分辨率和信噪比。在这方面,OCM 采用基于相干门的干涉探测方法,有效地抑制了多次散射光<sup>[59-60]</sup>,同时高数值孔径物镜的使用也增加了单次散射光的效率,显著地提高了成像的信噪比和成像的深度。然而高数值孔径物镜会导致焦深的减小,限制了成像的深度,有关突破焦深限制的 OCM 技术不断涌现。2002 年 Ding 等<sup>[61]</sup>首次利用贝塞尔光作照明增大了 OCM 系统的焦深,并在后续一段时间提出了一系列改进贝塞尔光照明的技术实现了更高信噪比的突破焦深的 OCM<sup>[62-63]</sup>。除此之外,基于物镜变焦的 OCM 也可以实现焦深的扩展<sup>[64]</sup>,利用液体变焦透镜在外加电压作用下改变焦距,实现毫米量级深度的成像变焦。尽管 OCM 牺牲了一定的成像深度,但是具有比 OCT 更高的横向分辨率,能够对组织结构进行更精准的诊断,可用于对人眼角膜基质细胞等进行高分辨成像,为眼角膜病变相关的疾病提供重要的

参考信息。

OCT 成像技术发展至今已经成功在临床诊断领域得到了广泛的应用。但对一些如消化道、肠胃等人体内部器官的组织,传统的台式 OCT 不再适用,发展适合人体诊断多功能内窥式 OCT 成像是现阶段研究的一个重要方向,通过内窥技术将 OCT 探针送入人体内部实现对病变组织的快速观测诊断。不仅如此,OCT 成像技术还可以与其他技术结合,例如可以与荧光成像结合来进一步揭示细胞的结构;与光声成像结合来弥补 OCT 成像深度的限制<sup>[65]</sup>。

## 2.4 光学衍射层析显微成像

数字全息相位成像、FPM、OCT 等技术利用光场的相位或强度作为成像观测信息,使用的对比度信息来源于成像样品对入射光场振幅或者相位的调制,而这一本质的原因是物体不均匀的折射率分布对入射光场的影响,散射光场的振幅和相位包含了样品结构的信息。折射率作为细胞内部固有的对比源,可以用来表征细胞内部的分子浓度,但是传统的显微成像技术很难对物体的折射率分布进行定量描述。光学衍射层析显微成像技术(ODT)就是通过测量散射光场的振幅和相位信息来重构物体的三维折射率分布的。1969 年 Wolf<sup>[66]</sup>最先提出衍射层析模型,建立了散射光场和物体三维散射势之间的关系,但受限于当时的计算能力和光电探测能力,这种技术并没有得到广泛的发展。直到 2002 年,Lauer<sup>[67]</sup>借助数字全息技术首次实现了光学衍射层析成像技术。

在光学衍射层析理论中,通常会使用散射势  $f(\mathbf{r})$  来描述物体对入射光的散射能力,可表示为

$$f(\mathbf{r}) = \frac{k_m^2}{4\pi} \left\{ \left[ \frac{n(\mathbf{r})}{n_m} \right]^2 - 1 \right\}, \quad (4)$$

式中:  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  为三维空间坐标;  $n(\mathbf{r})$  是物体的三维折射率分布;  $n_m$  表示物体所处的环境折射率; 使用波长  $\lambda$  的光进行照明时环境中的波数  $k_m = n_m \cdot 2\pi/\lambda$ 。对于散射过程,可以通过标量亥姆霍兹方程进行描述:

$$(\nabla^2 + k_m^2)u_s(\mathbf{r}) = -4\pi f(\mathbf{r})u(\mathbf{r}), \quad (5)$$

式中:  $\nabla$  为梯度算符;  $u(\mathbf{r})$  为经过物体后的总光场分布,可以进一步看作入射光场  $u_0(\mathbf{r})$  和散射光场  $u_s(\mathbf{r})$  的叠加。

$$u(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) + u_s(\mathbf{r}). \quad (6)$$

为了求解上述散射问题,通常会利用 Born 近似和 Rytov 近似进行求解<sup>[68]</sup>。其中 Born 近似要求散射光场远小于入射光场,适用于散射相对较弱的薄样品,对于一些散射相对较强的样品如细胞等,Rytov 近似更加合适。Rytov 近似通过引入散射复相位  $\varphi_R(\mathbf{r})$  来描述物体对入射光的散射情况。经物体散射后的总光场可以写为

$$u(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) \exp[\varphi_R(\mathbf{r})] \quad (7)$$

将式(6)、(7)代入到式(5)中,通过格林函数法<sup>[66]</sup>或者波矢空域变换法<sup>[69-70]</sup>能够得到 Rytov 近似下的衍射层析定理:

$$F(K_x, K_y, K_z) = \frac{k_z}{2\pi i} \Phi_{z=z_0}(k_x - k_0^x, k_y - k_0^y) \times \exp[i(k_0^z - k_z)z_0], \quad (8)$$

式中:

$K_x = k_x - k_0^x$ ,  $K_y = k_y - k_0^y$ ,  $K_z = k_z - k_0^z$ ,  $k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_m^2$ ,  $(k_0^x)^2 + (k_0^y)^2 + (k_0^z)^2 = k_m^2$ ;  $F(K_x, K_y, K_z)$  为物体散射势的三维频谱;  $\Phi_{z=z_0}(k_x, k_y)$  为 Rytov 复相位场的二维傅里叶频谱;  $\mathbf{k}_0 = (k_0^x, k_0^y, k_0^z)$  为入射光场的空间波矢。式(8)给出了二维散射光场频谱和三维散射势频谱之间的对应关系,等式右侧的 Rytov 复相位场二维频谱在给定的坐标关系下映射到一个球面上,即 Ewald 球盖。对于不同照明角度  $\mathbf{k}_0 = (k_0^x, k_0^y, k_0^z)$ , Rytov 复相位场频谱都要沿入射方向进行频谱平移,并填补到与之对应的 Ewald 球盖处。通过记录不同  $\mathbf{k}_0$  下的散射光场,不同方向上

的 Ewald 球盖的频谱拼接可实现对物体散射势最大截止频率为  $2k_m$  的连续频谱采样,这样的采样范围称为 Ewald 极限球。但在具有透射形式的衍射层析显微成像中,由于只采集透射光场,同时物镜数值孔径也限制散射光场的接收,恢复得到的散射势在横向和纵向上分辨率会降低,频谱重建过程如图 4(a)~(d)所示。图 4(e)是一个典型的高分辨光学衍射层析显微成像系统<sup>[71]</sup>,通过两个单轴振镜来实现对不同角度的快速照明。对于散射光场的测量,采用数字离轴全息记录的方法并使用高数值孔径物镜进行散射光场的采集,在 561 nm 相干光源照明下实现横向分辨率高达 200 nm,纵向分辨率达 690 nm 的高分辨成像,能够对生物样品进行长达数小时的无损三维高分辨成像。

光学衍射层析成像技术从 2002 首次实现至今,相关的领域研究成果不断涌出,在成像方法上得到了很大的改进和扩展,主要包括照明扫描方式的创新、散射光场采集方式的创新、新型衍射层析模型的提出。依据照明方式,光学衍射层析显微成像技术主要可以分成两类:一类是样品固定,改变照明的方向实现不同角度的照明;另一类是照明方向不改变,旋转样品。两者各有利弊,改变照明角度的方式对样品放置没有特殊要求,但由于只能从一侧照明,空间轴向分辨率受限。旋转样品的成像方式沿各个方向的分辨率均一,但横向分辨率相对较差,除此之外,样品要求具有一定的可旋转特性。为了避免旋转对生物样品生理活动的干扰,同时减

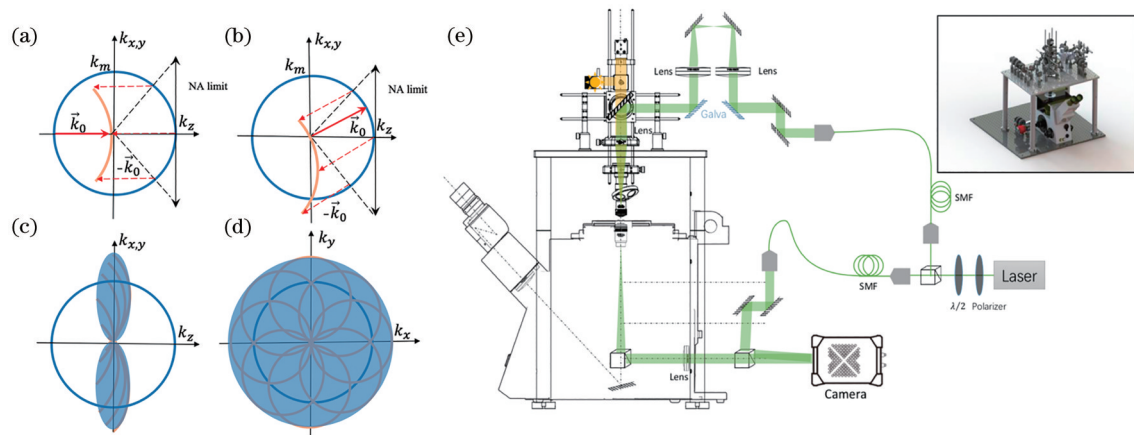


图 4 ODT 原理和结构示意图。(a) 正入射的散射势重构过程; (b) 倾斜照明的散射势重构过程; (c)(d) 重构得到的散射势纵向和轴向剖面图; (e) 装置光路示意图<sup>[71]</sup>

Fig. 4 Schematic of ODT principle and structure. (a) Normal incidence of scattering potential reconstruction process; (b) oblique incidence of scattering potential reconstruction process; (c)(d) reconstructed longitudinal and transverse views of scattering potential; (e) schematic of optical setup<sup>[71]</sup>



小实验操作上的困难,在进行生物衍射层析成像时大多数都会使用改变照明角度的方法。多种器件能够实现照明角度的改变,常用的方法包括使用旋转楔形棱镜<sup>[72]</sup>、机械臂扫描<sup>[73]</sup>、空间光调制器<sup>[74-75]</sup>、数字微镜阵列<sup>[76]</sup>和振镜扫描<sup>[19,71]</sup>,其中利用振镜扫描的方式能够实现高速稳定的扫描,是目前相干照明衍射层析的主流方式。

在散射光场的采集方式上,2013年Cotte等<sup>[72]</sup>利用高数值孔径的油浸物镜实现了 $2\pi$ 立体角的散射光场的接收,通过解卷积的方式进一步将横向分辨率提高到90 nm,纵向分辨率提高到150 nm,如图5(a)

所示。这种高数值孔径物镜接收的方式虽然能够提高成像分辨率,但面临成像视野较小的问题。为了能够扩大成像视野,2016年Momey等<sup>[73]</sup>提出了无透镜衍射层析成像技术,如图5(b)所示,将样品紧贴感光芯片,将成像视野扩展到毫米量级,并对前列腺RWPE1组织进行大视野无透镜层析成像。提高散射光场的采集速度和准确度对光学衍射层析成像至关重要。近些年先后提出相移法光学衍射层析<sup>[67]</sup>、数字离轴全息法光学衍射层析<sup>[71,77]</sup>、外差法光学衍射层析<sup>[78]</sup>、共光路离轴全息法光学衍射层析<sup>[19-20]</sup>等成像方式,进一步提高了成像速度和信噪比。

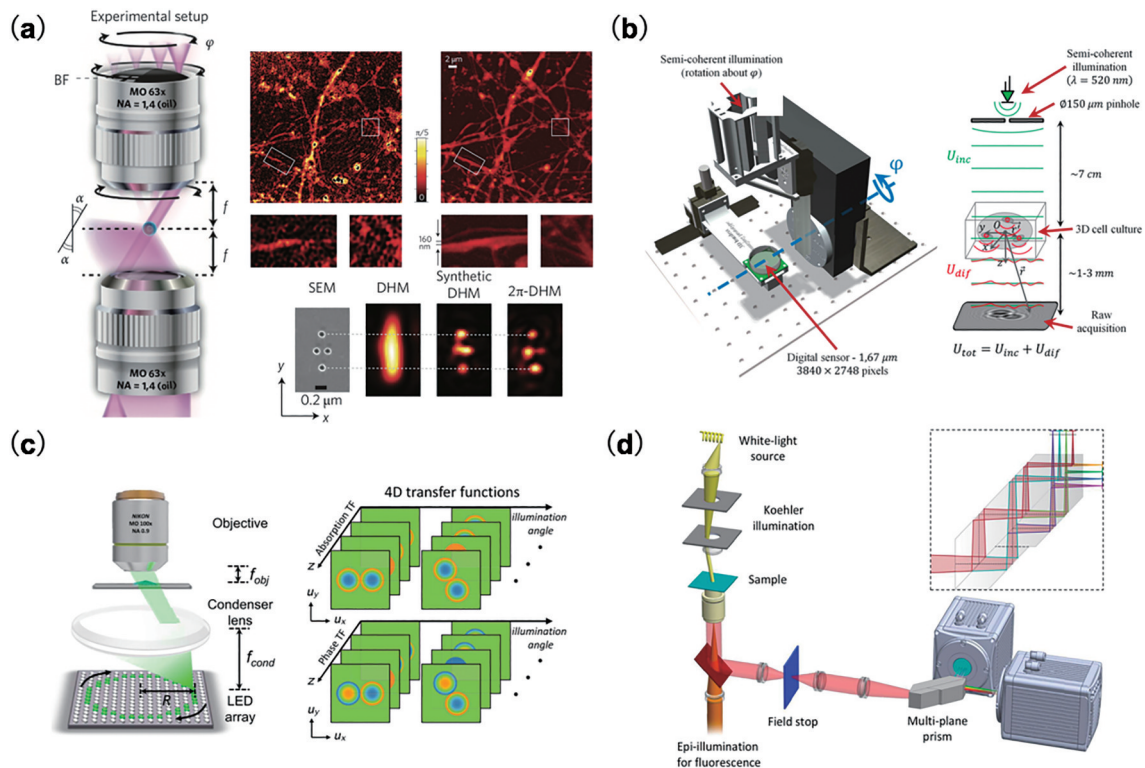


图5 光学衍射层析成像技术。(a)  $2\pi$ 数字全息显微成像技术<sup>[72]</sup>; (b)无透镜衍射层析显微成像技术<sup>[73]</sup>; (c)部分相干光学衍射层析成像技术<sup>[84]</sup>; (d)白光衍射层析显微成像技术<sup>[85]</sup>

Fig. 5 Optical diffraction tomography. (a)  $2\pi$  digital holographic microscopy<sup>[72]</sup>; (b) lensfree diffractive tomography<sup>[73]</sup>; (c) partially coherent optical diffractive tomography<sup>[84]</sup>; (d) white field optical diffractive tomography<sup>[85]</sup>

发展新型衍射层析模型也成为研究的热点。传统的光学衍射层析成像采用相干光源全息记录的方式,很容易受到环境扰动或者机械抖动的影响,从而带来一定的相位噪声,影响折射率测量的精确度。基于部分相干光照明的衍射层析成像能有效地改进上述成像的问题,利用部分相干光源的低时间、空间相干特性有效地抑制了相干噪声,实现了更高分辨率和光学层析能力。这种非相干光源照明的成像方法采用轴向扫描的方法采集一系列轴向强度图,通

过对强度图进行空间相位传递函数解卷积,得到物体三维折射率分布,能够对样品进行快速层析成像,大幅度缩短了数据处理时间。2016年Chen等<sup>[79]</sup>利用差分相衬成像结合解卷积的方法恢复样品的三维折射率分布。2016年Bao等<sup>[80]</sup>对相位传递函数进行修正,提出了适用于非近轴向照明的相位传递函数。Soto等<sup>[81-82]</sup>成功地将非近轴近似下的相位传递函数模型运用到衍射层析成像中。Li等<sup>[83]</sup>从三维相位传递函数的角度出发,提出了环形照明的方式,该方式

将横向分辨率提高到 Ewald 极限,同时能够保持较好的成像对比度。2020 年 Li 等<sup>[84]</sup>扩展了光学传递函数解卷积的方法,该方法能够同时对样品折射率和样品吸收率分别进行高分辨三维成像,如图 5(c) 所示。基于宽谱光源的光学衍射层析也相应被提出,2016 年 Momey 等<sup>[73]</sup>利用空间光干涉显微成像方法测量白光照明下的散射光的振幅和相位,通过对样品进行逐层扫描和扩展白光解卷积,实现了横向分辨率为 350 nm 和纵向分辨率为 900 nm 的成像结果。2018 年 Decloux 等<sup>[85]</sup>提出了一种基于白光照明的衍射层析显微成像技术,并提出了多波长、多角度白光照明的衍射模型,实现了对活体细胞 200 Hz 的超快成像速度,成像装置如图 5(d) 所示。

除了在成像方法上的创新,对光学衍射层析重构算法也提出了改进。在相干照明和非相干照明的光学衍射层析技术中,照明角度和散射光场收集孔径有限,求解逆散射问题成为病态问题。同时,多角度或者多层图像的采集也带来数据处理上的负担。发展新型衍射层析成像算法,在保证重构精度和分辨率的同时减少重构所需的数据量成为近些年研究的热点。利用正向传播模型并结合正则化约束能有效解决上述存在的问题。首先对样品折射率分布施加约束如非负约束<sup>[86-87]</sup>、边界约束<sup>[88-89]</sup>和全变分约束<sup>[90-91]</sup>等约束条件,利用各种正向传播模型模拟散射过程,通过残差逆向传播纠正,重构结果能够收敛到既满足先验测量条件又符合正向传播模型的最优值。基于这种思想,先后提出了光束传播理论<sup>[92-93]</sup>、多层 Born 近似<sup>[94]</sup>、共轭梯度偶极子<sup>[95]</sup>、迭代 Born 近似<sup>[96]</sup>等正则化迭代算法。

光学衍射层析显微成像技术目前所要解决的一个关键问题是如何对厚样品进行高分辨三维成像。基于 Born 或者 Rytov 近似下的衍射模型只适用于弱散射细胞样品,但对于生物组织样品,光在经过这些强散射样品中会面临多次散射的问题<sup>[68]</sup>,携带物体结构信息的单次散射光子将会更少,成像分辨率和质量受到很大的影响,这个问题也限制了光学衍射层析成像用于病理诊断。未来可以将计算成像中深度学习的概念用于光学衍射层析成像中,提出并发展更适合光学衍射层析成像的神经网络。除此之外,采用透射成像的光学衍射层析显微成像系统不适合进行在体生物成像,发展反射式光学衍射层析显微成像技术也是至关重要的。

### 3 特异性无标记成像

非特异性无标记成像技术虽然能够对样品进行无损伤、高分辨的观测,但其成像结果缺少化学选择性,只能对一些结构明显的细胞器或组织分布进行形态上鉴别,缺少对样品化学分子组成的表征。特异性无标记成像技术恰好能够弥补这些问题,利用成像样品分子的吸收光谱、结构特征、共振能级等一系列特征参数实现化学选择性成像。光声成像、二次谐波成像、三次谐波成像、相干反斯托克斯成像、受激拉曼散射成像等是最常见的特异性成像方法。

#### 3.1 光声成像技术

光声成像(PAI)技术以光声效应为理论基础。当短脉冲激光照射到生物组织时,生物组织将会吸收入射光子,引起局部温度的升高,这种瞬间的温度变化将会通过热弹机制转换为热膨胀从而产生超声波,不同的生物组织对入射光的吸收不同,产生的超声波的强度也不同。光声成像通过超声换能器接收这些超声信号,经过算法重建得到组织对光吸收的三维图像。生物组织对超声波具有较弱的散射和吸收能力,光声成像技术能够实现厘米量级的成像深度<sup>[97-98]</sup>,这种成像深度是其他光学成像技术所无法比拟的。由于超声信号来自对入射光的吸收,人体内的血红蛋白、脂类、水分等具有不同的吸收光谱,借助于不同波长的光源<sup>[99]</sup>,光声成像能够实现非常丰富的内源性对比度成像,不仅能对血管、组织结构进行成像,还可以对人体血管和黑色素中的含氧血红蛋白和脱氧血红蛋白等重要的人体健康指标进行监测<sup>[97,99]</sup>。

光声成像技术发展至今,衍生出两种主要的光声成像技术:光声计算层析成像(PACT)和光声显微成像(PAM)。光声计算层析成像利用扩展后的光束进行照明,采用超声换能器阵列或者可旋转式超声探头接收信号,从多角度接收生物组织内产生的超声信号,采用类似 CT 的重建算法,成像深度高达厘米量级,横向分辨率在几十或几百微米。借助于这种成像优势,光声计算层析成像技术能够对生物组织内部的结构和功能成像,如图 6 所示,利用光声计算层析成像技术对怀孕小鼠内的胚胎进行成像<sup>[100]</sup>。2014 年 Dima 等<sup>[101]</sup>使用 256 阵元,到 2019 年 Merčep 等<sup>[102]</sup>提出的基于 512 阵元的 360° 全视角阵列,阵元的增加降低了有限角度采样带来的图像伪



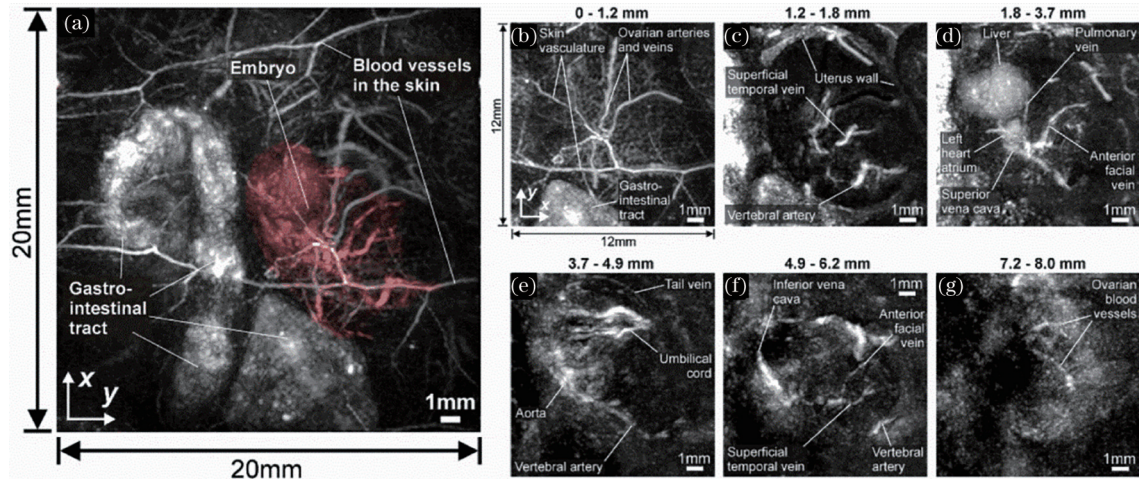


图6 光声计算层析成像在体观测孕期15.5天的小鼠胚胎<sup>[100]</sup>。(a)光声计算层析成像结果的轴向极值投影;(b)~(g)不同深度的层析成像结果

Fig. 6 *In vivo* PACT imaging of the embryo in the pregnant mouse at embryonic day of 15.5<sup>[100]</sup>. (a) Maximum intensity projection of the 3D PACT imaging; (b)-(g) tomography results at different depths

影噪声,成像分辨率、成像深度和成像对比度显著提升。光声显微成像技术是将光聚焦在某一点进行扫描成像的技术,这种成像方式能够实现更高的成像分辨率但成像深度却受到了限制。美国加州理工学院的Wang课题组<sup>[103]</sup>最早提出利用单阵元超声探头进行逐点扫描的方法,该方法实现了成像深度和成像分辨率之比高达100的突破。2008年该课题组利用声学聚焦透镜搭建了光学分辨率光声显微成像系统<sup>[104]</sup>,显著提高了检测灵敏度和成像对比度。2011年Song等<sup>[105]</sup>提出了多焦点光声显微成像系统,获得成像深度高达1 mm、横向分辨率为10  $\mu\text{m}$ 、纵向分辨率为25  $\mu\text{m}$ 的成像结果。

光声成像技术发展至今实现了成像深度从微米量级到厘米量级的跨越,这在生物医学和临床疾病诊断中具有巨大的应用价值。多模态优势互补的成像方式也将是未来显微成像发展的一个重要方向,将光学显微成像技术和光声成像技术结合,在获得较高分辨率的同时能够实现较大的成像深度,能够扩展OCT、ODT等技术的适用范围,为生物医学和临床提供更有用的工具。

### 3.2 二次、三次谐波显微成像

20世纪90年代以来,以超快激光为代表的光源在荧光显微成像中大展身手的同时也被运用到无标记光学成像中,发展出了基于非线性效应的无标记光学成像。其中二次、三次谐波成像是最常见的非线性成像技术之一,利用飞秒激光与成像物质之间的相互作用产生谐波信号光,产生的谐波信号光

不仅与入射光场的强度有关,还与成像物质的极化率等结构信息有关。通过不同化学分子组成、结构特征对高强度激光的不同非线性响应进行无标记成像,避免了切片和荧光染色等操作。

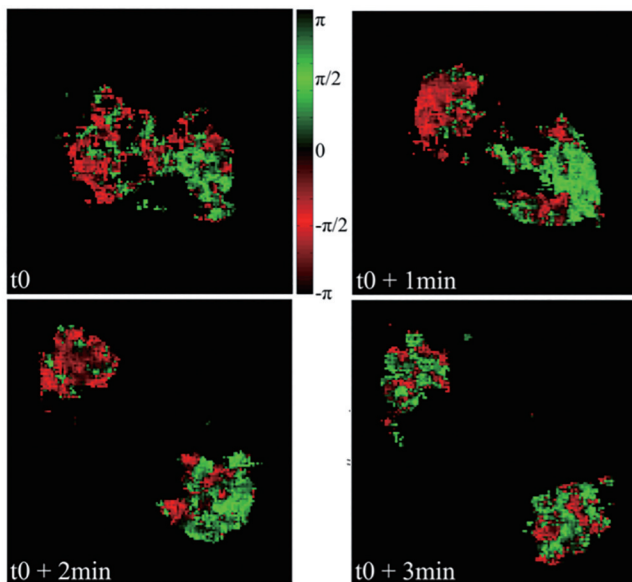
二次谐波显微成像(SHG)中产生的信号光波长是激发光波长的一半,在进行成像时使用近红外区域的飞秒光源对样品进行激发,长波长光源在生物组织中具有更高的穿透深度。SHG在进行非线性转换过程时要求两个光子在飞秒时间内到达成像样品,非线性激发发生在焦点附近较小的区域内,具有较高的成像信噪比和较好的空间分辨率,并且SHG属于相干散射过程,样品不吸收能量,避免了光损伤带来的影响。但SHG对非线性介质有一定要求:1)非线性介质要具备非中心对称性才能产生二次谐波;2)需要满足相位匹配,只有这样基频波才能有效转换成二次谐波,从而保证较高的SHG产生效率;3)二次谐波的信号与介质二阶极化率平方成正比,只有具有较大的二阶极化率,才能观测到二次谐波现象。某些组织成分如微管蛋白、肌动蛋白、胶原蛋白等<sup>[106-108]</sup>能够满足上述的要求,从而产生很强的二次谐波信号,在胚胎发育过程中可作为重要的参数指标。2008年Lin等<sup>[109]</sup>首次利用二次谐波成像技术对果蝇胚胎肌肉结构和呼吸道进行了观测。SHG另一个特点是具有偏振敏感性,一些结构蛋白产生的二次谐波信号的强度与入射光的偏振方向有关。2017年Bancelin等<sup>[110]</sup>利用SHG的偏振依赖性研究了斑马鱼胚胎有丝分裂中



纺锤体的极性,如图 7(a)所示。

三次谐波显微成像(THG)通过三阶非线性效应同时吸收三个光子,产生一个三倍频光子,三次谐波产生的强度与激光强度的三次方成正比,相对于 SHG,其空间分辨率更高,使用的波长更长,成像深度更高,而且不要求样品具有非中心对称性。THG 在深层组织和高分辨成像领域具有很重要的

(a)



(b)

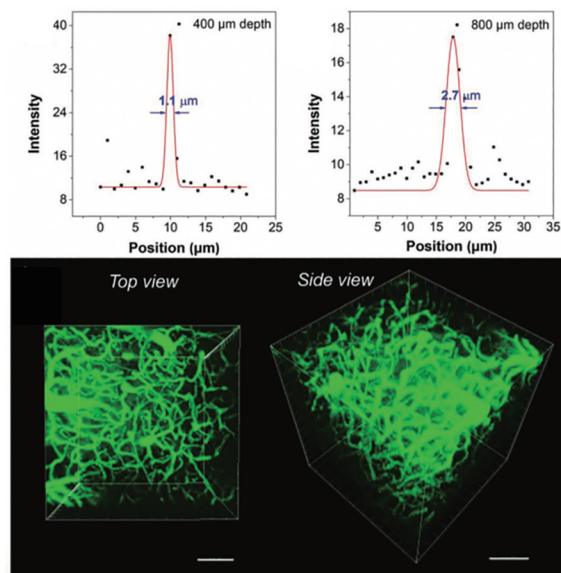


图 7 二次、三次谐波显微成像技术在生物学中的应用。(a) 有丝分裂期纺锤体产生的二次谐波信号相位分布图像<sup>[110]</sup>;  
(b) 800  $\mu\text{m}$  厚度在体表层血管三次谐波图<sup>[111]</sup>

Fig. 7 Applications of second and third harmonic microscopic imaging in biology. (a) Phase image of the SHG signal generated in the spindles during mitosis<sup>[110]</sup>; (b) *in vivo* THG microscopic imaging of the cortical vasculature with 800  $\mu\text{m}$  depth<sup>[111]</sup>

### 3.3 相干反斯托克斯拉曼散射成像技术

相干反斯托克斯拉曼散射成像技术(CARS)利用分子的共振能级特性来实现化学选择性的激发。CARS是一个四光子相关的非线性过程,目标分子在泵浦光和斯托克斯光的作用下产生拉曼相干态,第三束激光在满足相位匹配的方向上入射,产生一个比原来激光频率更高的信号。由于CARS是一个相干的非线性过程,需要满足一定的相位匹配,信号光的方向性好,具有很高的收集因子。在CARS的产生过程中,只有满足泵浦光和斯托克斯光拍频率共振的分子才能产生CARS信号,可以通过调谐斯托克斯光的波长来选择性激发不同的分子,具有化学选择性成像的能力。不仅如此,CARS信号的强度正比于样品的三阶非线性极化率的平方,而三阶非线性极化率正比于样品分子数,所以CARS信号的强度比自发拉曼大得多,而且可以通

过CARS信号的分布来定量分析化学分子的浓度。

CARS的一个主要应用是在显微成像领域。CARS是以分子振动为内源对比度的,能够实现对无标记物损伤的特异性成像。1982年,Duncan等<sup>[114]</sup>利用染料激光器产生皮秒激光,在满足非共线的相位匹配下实现了对洋葱表皮细胞的CARS成像<sup>[115]</sup>,这也是关于CARS显微成像技术的首次报道。但是这种非共线的成像方式限制了成像的分辨率,同时由于激光处于可见光波段,大量的荧光信号也干扰CARS成像的质量。1999年Zumbusch等<sup>[116]</sup>采用两束近红外光在共线相位匹配的方式下产生了CARS信号,采用红外光源,成功避开了双光子荧光的干扰,并且证实了CARS显微成像技术在紧聚焦下可实现三维成像。从那以后,CARS显微成像技术得到许多研究人员的关注<sup>[117-118]</sup>,相关领域的研究主要围绕在抑制CARS信号的非共振背

景、提高 CARS 显微成像分辨率和成像速度。

CARS 过程中产生了新的参量,采集到的信号往往还混有四波混频的信号,这种信号与分子的振动频率无关,属于非共振信号,这种非共振信号既可以从样品分子中产生,也可以从环境的其他分子中产生,会对信号光产生一定的干扰。2001 年 Cheng 等<sup>[119]</sup>利用两个同步皮秒光源提高了 CARS 光谱的分辨率,抑制了背景信号。同一时期,Xie 等研究了 CARS 成像中非共振背景噪声问题,先后提出了偏振 CARS 显微成像技术<sup>[120]</sup>、时间分辨 CARS 显微成像技术<sup>[121]</sup>、差分 CARS 显微成像技术<sup>[122]</sup>,成功抑制了 CARS 背景噪声。在提高成像分辨率方面,2009 年 Lu 等<sup>[123]</sup>利用径向偏振光,在紧聚焦情况下能够将分辨率提高 10%;2010 年 Hajek 等<sup>[124]</sup>将结构光照明和宽场 CARS 显微成像技术相结合,实现了横向分辨率高达 120 nm 的成像结果;2015 年 Heuke 等<sup>[125]</sup>提出了贝塞尔 CARS 显微成像技术,该技术利用贝塞尔光作为激发光,将横向分辨率提高

到原来的 1.33 倍。

在成像速度方面,点扫描 CARS 成像技术的成像速度受限,Heinrich 等利用暗场聚光镜完成相位匹配,实现了宽场 CARS 成像技术<sup>[124]</sup>,但对于三维 CARS 成像,该技术仍无法避免对样品进行扫描激发。因此,北京大学研究小组将 CARS 显微成像与数字全息成像技术相结合<sup>[126-127]</sup>,首次提出了 CARS 全息的概念,CARS 全息成像装置图如图 8(a)所示<sup>[126]</sup>,利用光学参量产生器(OPG)引入与 CARS 信号频率一致的相干激光作为参考光,通过干涉全息方法记录 CARS 信号的振幅和相位信息。图 8(b)为在全息 CARS 基础上提出的偏振抑制非共振背景的 CARS 全息成像装置图<sup>[127]</sup>。图 8(c)是对聚苯乙烯小球进行偏振抑制的 CARS 全息成像,利用全息解算得到的 CARS 的振幅和相位分布,通过光束传播方法得到在不同深度上 CARS 信号的分布,从而实现 CARS 三维成像。

尽管 CARS 全息成像技术可用于实现三维成

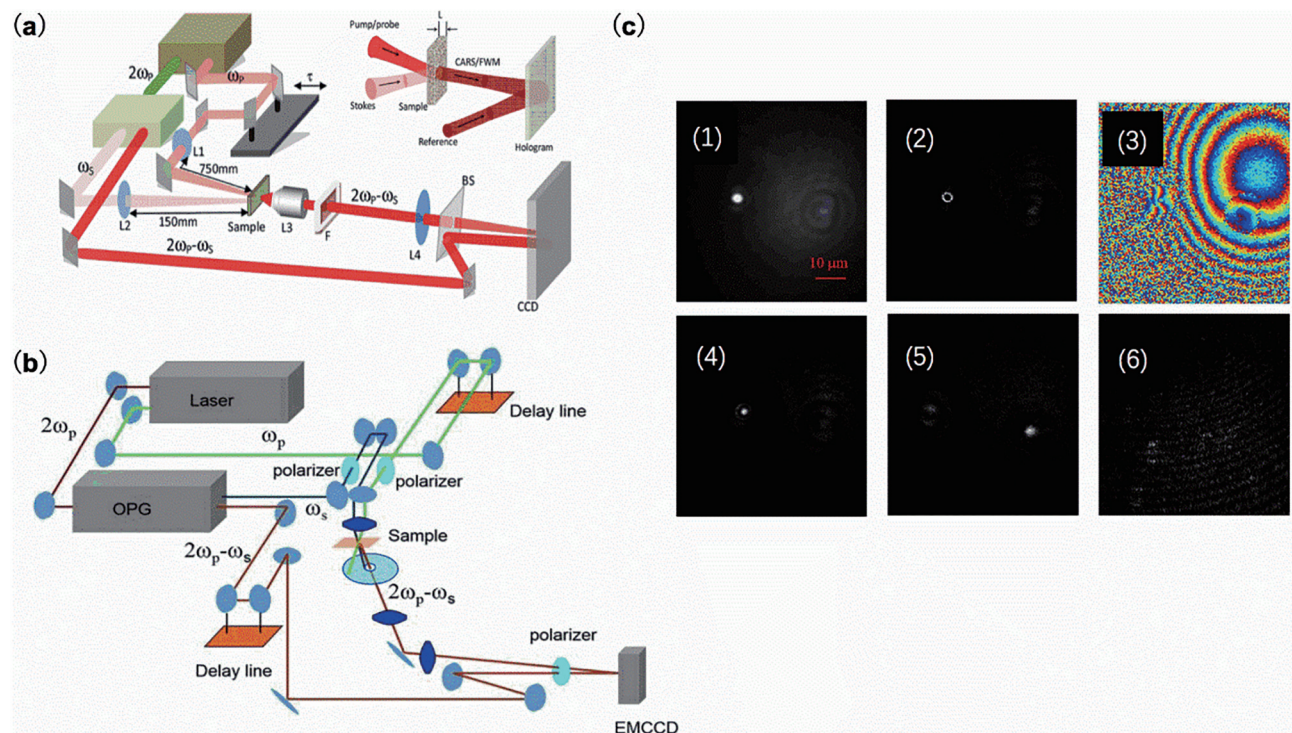


图 8 CARS 全息显微成像技术。(a) CARS 全息显微成像技术<sup>[126]</sup>; (b) 偏振 CARS 全息显微成像技术<sup>[127]</sup>; (c) 聚苯乙烯小球的 CARS 全息成像,其中(1)为 CARS 全息,(2)(3)为全息恢复得到的 CARS 振幅和相位信息,(4)(5)为利用光束传播理论得到的不同深度的 CARS 信号分布,(6)调谐斯托克斯光波长,使之远离聚苯乙烯小球共振峰,恢复得到的 CARS 信号分布

Fig. 8 CARS holographic microscopy. (a) CARS holographic microscopic imaging technology<sup>[126]</sup>; (b) polarized CARS holographic microscopic imaging technology<sup>[127]</sup>; (c) holographic CARS imaging of the polystyrene microspheres, Fig. (1) is holographic CARS imaging, Fig. (2) and Fig. (3) are the retrieved amplitude intensity and phase image, Fig. (4) and Fig. (5) are CARS signal distribution at different depths obtained by using the beam propagation theory, Fig. (6) is the reconstructed CARS intensity distribution of the polystyrene microspheres when the Stokes wavelength is apart from the polystyrene resonance



像,但其得到的结果是样品产生的 CARS 光场的分布,是对非样品三阶非线性系数的直接成像。因此,可以结合 CARS 全息成像技术和衍射层析技术,建立基于 CARS 的衍射层析模型,实现三阶非线性系数的三维高分辨成像。

### 3.4 受激拉曼散射成像技术

受激拉曼散射技术(SRS)是一种与 CARS 不同的相干拉曼过程,其原理主要是受激拉曼损耗和受激拉曼增益。当入射的泵浦光和斯托克斯光的频率差满足样品分子共振条件时,将会导致泵浦光强度的急剧减弱和斯托克斯光强度的迅速增加。SRS 过程是单纯能量转移的一个过程,不会产生新的波长,因此不会存在 CARS 成像中的非共振背景信号,并且 SRS 信号强度是和样品浓度成正比的,可以直接根据 SRS 信号强度对样品进行快速定量分析。2008 年 Freudiger 等<sup>[128]</sup>利用高重复频率的皮秒激光和光学参量振荡器取代了高脉冲飞秒激光,实现了低损伤、快速的 SRS 成像,发展了适用于生物学成像的受激拉曼散射显微成像技术。传统的 SRS 显微成像技术需要预先得到待测样品的拉曼谱,调节泵浦光和斯托克斯光对特定的波数差进行成像,对于一些未知的样品难以进行选择性的成像,SRS 光谱成像技术可以解决这个困扰。SRS 光谱成像技术通过记录图像中每个像素的一段光谱,通过比对不同像素的光谱与标准拉曼

光谱,判断成像物质的分子组成。2015 年 Liao 等<sup>[129]</sup>结合光栅分光 and 调协放大器实现了 16 路的光谱分光效果,每个像素点光谱采集的时间在  $32 \mu\text{s}$  范围内,并且具有较高的灵敏度。同年,Liao 等<sup>[130]</sup>提出了空间频率复用的 SRS 光谱成像技术,该技术通过光刻掩模将空间上色散不同的泵浦光调制在 16 个不同的频率,充分利用了泵浦光的带宽,使用单个光电二极管大幅度提高了信号的搜集效率,如图 9 所示。关于 SRS 光谱成像技术的相关研究层出不穷,也是近些年研究的一个热点,为了进一步提高光谱的分辨能力,提出了高光谱成像的 SRS 成像技术。与前面介绍的探测多个 SRS 光谱带的技术不同,高光谱成像 SRS 通过扫描拉曼频移来实现光谱成像,虽然成像速度较慢,但光谱曲线采集度更高,提供的化学信息更丰富。高光谱成像 SRS 实现拉曼频移的方法主要可以分为激光输出波长调谐<sup>[131]</sup>、光谱聚焦<sup>[132]</sup>、时间编码<sup>[133]</sup>。2013 年 Zhang 等<sup>[134]</sup>利用脉冲内部光谱扫描的方法,实现了输入脉冲谱线可调,这种方法光谱分辨率高,扫描速度快。同年,Wang 等<sup>[135]</sup>利用时间透镜技术从连续光源中产生 1064 nm 的斯托克斯脉冲,通过与脉冲内部光谱扫描产生的泵浦光共同激发,对前列腺癌细胞中的  $\text{CH}_2$  和  $\text{CH}_3$  化学键进行了高灵敏探测。

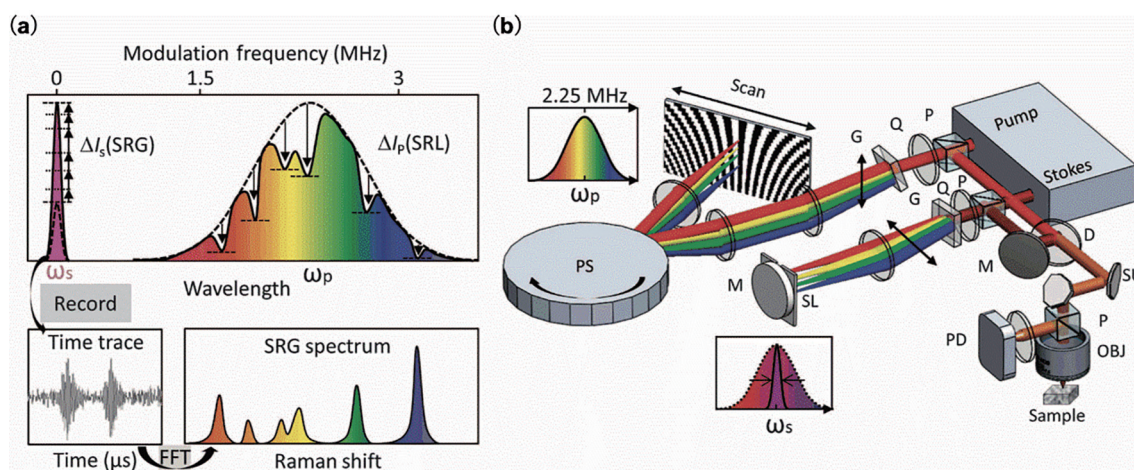


图 9 基于空间频率复用的单光电探测器受激拉曼光谱成像<sup>[130]</sup>。(a)空间频率复用原理;(b)实验装置

Fig. 9 Stimulated Raman spectroscopic imaging by single photodiode detector based on spatial frequency multiplexing<sup>[130]</sup>.

(a) Principle of spatial frequency multiplexing; (b) the experimental setup

SRS 成像技术除了上述提到的进展之外,在生物学领域得到广泛的应用。Zhang 等<sup>[136-137]</sup>探究了细胞摄取不同脂肪酸分子的动力学过程,并对脂质

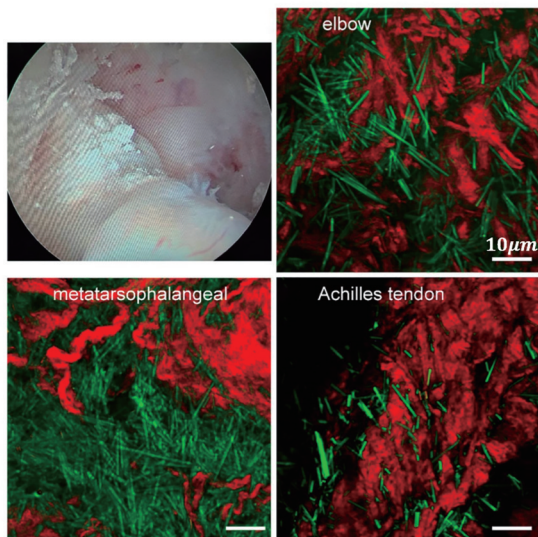
的产生进行了研究。Min 等也借助 SRS 成像技术对蛋白质的合成<sup>[138]</sup>和降解<sup>[139]</sup>过程进行了研究。除了在单细胞成像上的应用,SRS 为病例诊断提供了



强有力的工具。2018年 Ji 等<sup>[140]</sup>将 SRS 显微成像技术用于阿尔茨海默病的诊断中,对富含错折叠蛋白的淀粉斑块进行无标观测。2021年 Ji 等报道了 SRS 显微成像技术在人体痛风结晶<sup>[141]</sup>、乳房癌细

胞<sup>[142]</sup>的诊断,如图 10(a)、(b)所示。SRS 成像技术仍处于发展的上升阶段,进一步提高 SRS 的成像速度,发展新型光谱和图像分析算法,实现对人体健康的快速诊断是未来研究的重点。

(a)



(b)

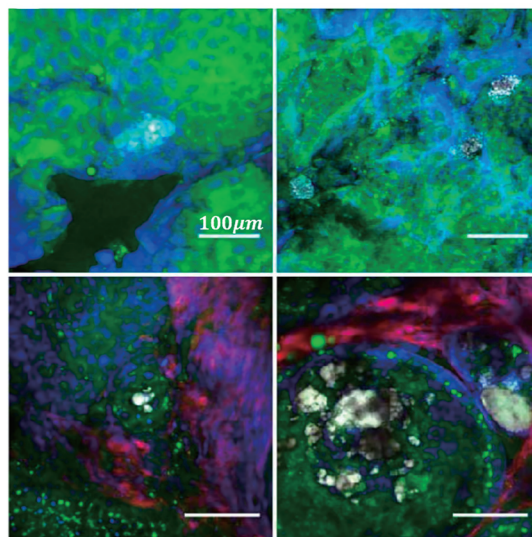


图 10 受激拉曼散射成像技术在临床医学中的应用。(a)痛风病人 SRS 快速诊断<sup>[141]</sup>,绿色为尿酸钠结晶 SRS 成像结果;(b)乳腺组织 SRS 诊断<sup>[142]</sup>,绿色为脂肪 SRS 分布,蓝色为蛋白质 SRS 分布,红色为胶原纤维 SRS 分布,白色为羟基磷灰石 SRS 分布

Fig. 10 Applications of SRS in clinical medicine. (a) SRS rapid diagnosis on gout human<sup>[141]</sup>, green presents the SRS signal of monosodium urate; (b) typical SRS images of breast tissues<sup>[142]</sup>, green presents lipids, blue presents proteins, red presents collagen fibers, white presents hap

## 4 总结与展望

主要概述了现有的无标记光学成像技术,包括数字全息显微成像技术、叠层投影显微成像技术、光学相干断层显微成像技术、光学衍射层析成像技术、光声成像技术、二次谐波显微成像技术、三次谐波显微成像技术、相干反斯托克斯拉曼成像技术、受激拉曼散射成像技术。对各自成像的原理以及优缺点进行分析,并对相关领域近期研究进展和未来的发展方向进行了详细的讨论。除了本文主要介绍的几种无标光学成像技术,一些基于光场偏振探测的无标记成像技术也是近些年研究的热点,通过与光谱测量技术相结合,实现对成像物体的空间、光谱和偏振信息的全方位探测<sup>[143]</sup>,提高对成像物体信息量的获取和测量的准确度。先后发展了利用傅里叶变换成像光谱仪的红外波段斯托克斯高光谱偏振成像技术<sup>[144]</sup>、基于偏振光栅的光谱偏振成像技术<sup>[145]</sup>、结合通道型偏振的快照式层析光谱偏振成像技术<sup>[146]</sup>等诸多成像方法,这些成像方法的创

新极大扩展了无标记光学成像的种类,并成为不可或缺的一部分。

无标记光学成像作为现代光学成像的重要组成部分,在生物学、材料科学以及精密制造领域都取得广泛的关注和应用。现有的光谱测量方法还无法像荧光成像一样做到单分子量级的成像<sup>[147-148]</sup>,分辨率仍然难以突破衍射极限的限制,发展超分辨的特异性成像技术是无标记光学成像需要攻克的难题之一。多模态显微成像技术是未来发展的重要方向,现有的光学成像手段都有各自独特的优点,同时面临各自的缺点,传统的光学成像技术不可避免地面临成像深度的问题,光声成像技术能够弥补这个问题。2016年 Chen 等<sup>[65]</sup>结合光声成像技术和 OCT 技术实现多模态观测,对光吸收和光散射实现了同时观测。此外,非特异性无标记成像技术成像不具备化学选择性,得到的结果缺少说服力,在生物医学研究中仍有很大的限制,针对这个问题,可以与荧光成像相结合,借助荧光分子的特异性标定非特异性成像结果。2020年北京大

学提出的荧光辅助衍射层析成像技术(SR-FACT)<sup>[71]</sup>就是结合了光学衍射层析技术和海森结构光显微技术两种模态,利用SR-FACT对活体细胞内的线

粒体、脂滴、核膜、染色体、内质网及溶酶体等多种细胞器进行双模态共定位成像,并且在多种细胞中鉴别出一种新型的亚细胞结构,如图11所示。

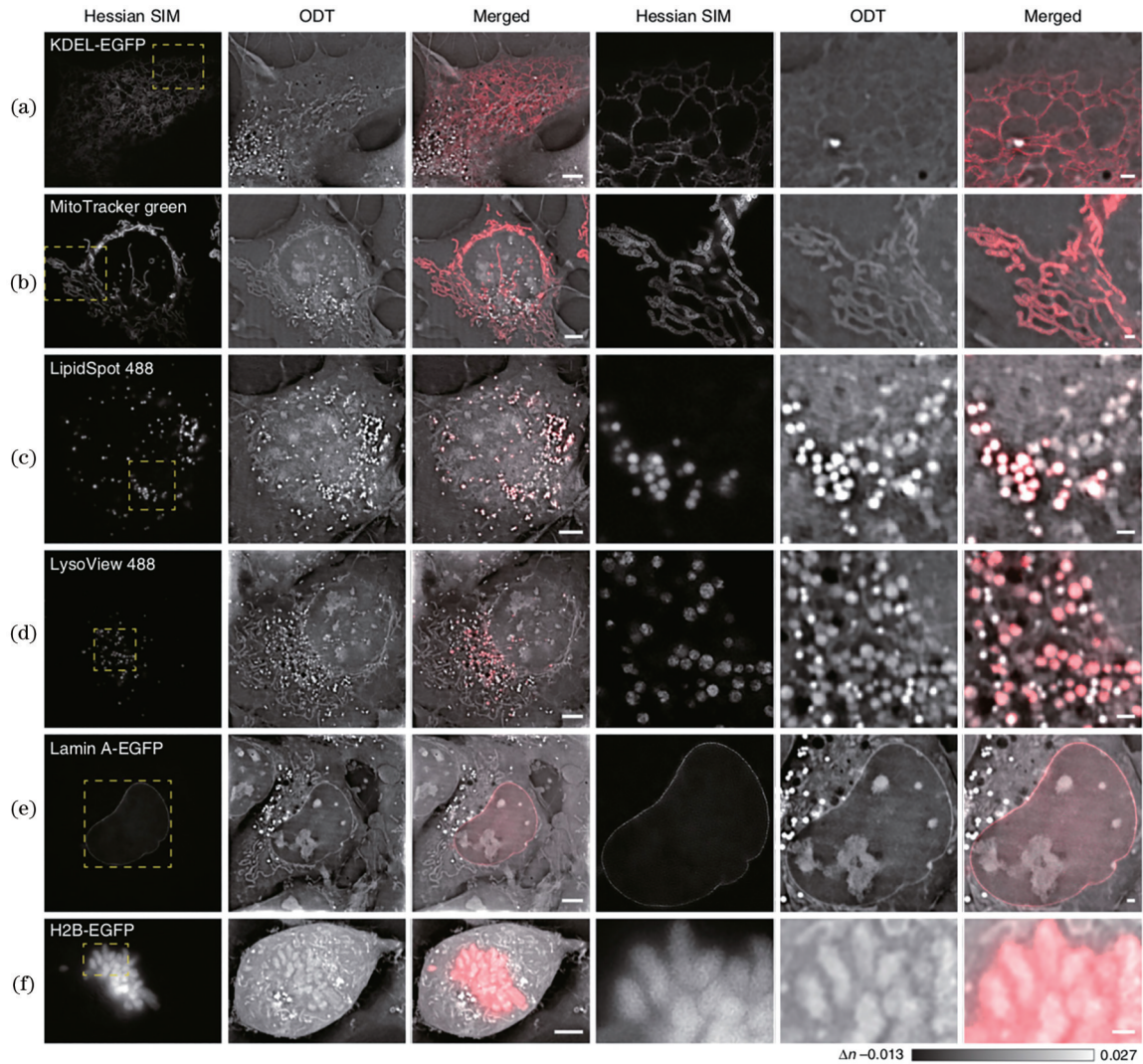


图 11 六种细胞器在SR-FACT下的共定位成像结果<sup>[71]</sup>

Fig. 11 Co-localization imaging results of six organelles under SR-FACT<sup>[71]</sup>

另一个发展方向是与计算机技术结合,将深度学习运用到显微成像领域。现有的成像方法都面临数据处理速度慢的问题,对于长时程的成像会带来繁重的处理过程,通过将成像结果带入到深度学习训练网络中,可以对成像数据进行快速反馈。不仅如此,深度学习也可以用于成像结果相关信息的快速标定和提取,如识别细胞结构、跟踪细胞器运动过程、统计细胞数量,极大地节省了人力物力。相信在不久的将来,无标记成像技术定会得到广泛的关注和快速的发展,成为引导科技革命的重要利器。

## 参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [3] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-796.



- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [6] Izeddin I, Récamier V, Bosanac L, et al. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus[J]. *eLife*, 2014, 3: e02230.
- [7] Xu K, Zhong G S, Zhuang X W. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons[J]. *Science*, 2013, 339(6118): 452-456.
- [8] Zernike F. How I discovered phase contrast[J]. *Science*, 1955, 121(3141): 345-349.
- [9] Gabor D. A new microscopic principle[J]. *Nature*, 1948, 161(4098): 777-778.
- [10] Schnars U, Jüptner W P. Digital recording and reconstruction of holograms in hologram interferometry and shearography[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(20): 4373-4377.
- [11] Schnars U, Jüptner W. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(2): 179-181.
- [12] Wyant J C. Interferometric optical metrology: basic principle and new system[J]. *Laser Focus*, 1982, 18(5): 65-71.
- [13] Shaked N T, Zhu Y Z, Rinehart M T, et al. Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells[J]. *Optics Express*, 2009, 17(18): 15585-15591.
- [14] Xue L, Lai J C, Wang S Y, et al. Single-shot slightly-off-axis interferometry based Hilbert phase microscopy of red blood cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(4): 987-995.
- [15] Han J H, Gao P, Yao B L, et al. Slightly off-axis interferometry for microscopy with second wavelength assistance[J]. *Applied Optics*, 2011, 50(17): 2793-2798.
- [16] Min J W, Yao B L, Gao P, et al. Dual-wavelength slightly off-axis digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2012, 51(2): 191-196.
- [17] Guo R L, Yao B L, Min J W, et al. LED-based digital holographic microscopy with slightly off-axis interferometry[J]. *Journal of Optics*, 2014, 16(12): 125408.
- [18] Guo C S, Sha B, Xie Y Y, et al. Zero difference algorithm for phase shift extraction in blind phase-shifting holography[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(4): 813-816.
- [19] Kim Y, Shim H, Kim K, et al. Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells[J]. *Optics Express*, 2014, 22(9): 10398-10407.
- [20] Hsu W C, Su J W, Tseng T Y, et al. Tomographic diffractive microscopy of living cells based on a common-path configuration[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(7): 2210-2213.
- [21] Yaghoubi S H S, Ebrahimi S, Dashtdar M, et al. Common-path, single-shot phase-shifting digital holographic microscopy using a Ronchi ruling[J]. *Applied Physics Letters*, 2019, 114(18): 183701.
- [22] Bianco V, Mandracchia B, Marchesano V, et al. Endowing a plain fluidic chip with micro-optics: a holographic microscope slide[J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(9): e17055.
- [23] Mandracchia B, Bianco V, Wang Z, et al. Holographic microscope slide in a spatio-temporal imaging modality for reliable 3D cell counting[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(16): 2831-2838.
- [24] Zheng G A, Horstmeyer R, Yang C H. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739-745.
- [25] Thibault P, Dierolf M, Menzel A, et al. High-resolution scanning X-ray diffraction microscopy[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 379-382.
- [26] Rodenburg J M, Hurst A C, Cullis A G, et al. Hard-X-ray lensless imaging of extended objects[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 98(3): 034801.
- [27] Maiden A M, Rodenburg J M, Humphry M J. Optical ptychography: a practical implementation with useful resolution[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(15): 2585-2587.
- [28] Kim M, Choi Y, Fang-Yen C, et al. High-speed synthetic aperture microscopy for live cell imaging[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(2): 148-150.
- [29] Turpin T M, Gesell L H, Lapidus J, et al. Theory of the synthetic aperture microscope[J]. *Proceedings of SPIE*, 1995, 2566: 230-240.
- [30] Di J L, Zhao J L, Jiang H Z, et al. High resolution digital holographic microscopy with a wide field of view based on a synthetic aperture technique and use of linear CCD scanning[J]. *Applied Optics*, 2008, 47



- (30): 5654-5659.
- [31] Tian L, Li X, Ramchandran K, et al. Multiplexed coded illumination for Fourier ptychography with an LED array microscope[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(7): 2376-2389.
- [32] Tian L, Liu Z J, Yeh L H, et al. Computational illumination for high-speed *in vitro* Fourier ptychographic microscopy[J]. Optica, 2015, 2(10): 904-911.
- [33] Sun J S, Chen Q, Zhang Y Z, et al. Efficient positional misalignment correction method for Fourier ptychographic microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(4): 1336-1350.
- [34] He X L, Liu C, Zhu J Q. Single-shot Fourier ptychography based on diffractive beam splitting[J]. Optics Letters, 2018, 43(2): 214-217.
- [35] Lee W, Jung D, Ryu S, et al. Single-exposure quantitative phase imaging in color-coded LED microscopy [J]. Optics Express, 2017, 25(7): 8398-8411.
- [36] Pan A, Shen C, Yao B L, et al. Single-shot Fourier ptychographic microscopy via annular monochrome LED array[C]//Frontiers in Optics 2019, September 15-19, 2019, Washington, DC, USA. Washington, D.C.: OSA, 2019: FTh3F.4.
- [37] Bian L H, Suo J L, Situ G H, et al. Content adaptive illumination for Fourier ptychography[J]. Optics Letters, 2014, 39(23): 6648-6651.
- [38] Zhang Y B, Jiang W X, Tian L, et al. Self-learning based Fourier ptychographic microscopy[J]. Optics Express, 2015, 23(14): 18471-18486.
- [39] Jiang S W, Guo K K, Liao J, et al. Solving Fourier ptychographic imaging problems via neural network modeling and TensorFlow[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(7): 3306-3319.
- [40] Li S, Deng M, Lee J, et al. Imaging through glass diffusers using densely connected convolutional networks[J]. Optica, 2018, 5(7): 803-813.
- [41] Li Y Z, Xue Y J, Tian L. Deep speckle correlation: a deep learning approach toward scalable imaging through scattering media[J]. Optica, 2018, 5(10): 1181-1190.
- [42] Tian L, Waller L. 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope[J]. Optica, 2015, 2(2): 104-111.
- [43] Chowdhury S, Chen M, Eckert R, et al. High-resolution 3D refractive index microscopy of multiple-scattering samples from intensity images[J]. Optica, 2019, 6(9): 1211-1219.
- [44] Horstmeyer R, Chung J, Ou X Z, et al. Diffraction tomography with Fourier ptychography[J]. Optica, 2016, 3(8): 827-835.
- [45] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography[J]. Science, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [46] Chinn S R, Swanson E A, Fujimoto J G. Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source[J]. Optics Letters, 1997, 22(5): 340-342.
- [47] Wojtkowski M, Bajraszewski T, Targowski P, et al. Real-time *in vivo* imaging by high-speed spectral optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2003, 28(19): 1745-1747.
- [48] Yun S, Tearney G, Bouma B, et al. High-speed spectral-domain optical coherence tomography at 1.3  $\mu\text{m}$  wavelength[J]. Optics Express, 2003, 11(26): 3598-3604.
- [49] 刘颖, 杨亚良, 岳献. 光学相干层析血管造影术及其在眼科学中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(18): 180002.
- Liu Y, Yang Y L, Yue X. Optical coherence tomography angiography and its applications in ophthalmology[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(18): 180002.
- [50] 孟婕. 多普勒光学相干层析成像方法与应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- Meng J. Development and application of Doppler optical coherence tomography[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [51] Ren H W, Brecke K M, Ding Z H, et al. Imaging and quantifying transverse flow velocity with the Doppler bandwidth in a phase-resolved functional optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2002, 27(6): 409-411.
- [52] Røyset A, Støren T, Stabo-Eeg F, et al. Quantitative measurements of flow velocity and direction using transversal Doppler optical coherence tomography[J]. Proceedings of SPIE, 2006, 6079: 384-391.
- [53] Ahn Y C, Jung W, Chen Z P. Quantification of a three-dimensional velocity vector using spectral-domain Doppler optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2007, 32(11): 1587-1589.
- [54] Freiberg F J, Pfau M, Wons J, et al. Optical coherence tomography angiography of the foveal avascular zone in diabetic retinopathy[J]. Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2016, 254(6): 1051-1058.
- [55] 王文玲, 户秀慧. FFA 和 OCT 在诊断视网膜中央动

- 静脉阻塞中的应用价值[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(10): 1946-1948.
- Wang W L, Hu X H. Application value of FFA and OCT in diagnosis of central retinal artery and vein occlusion[J]. International Eye Science, 2016, 16(10): 1946-1948.
- [56] Choma M, Sarunic M, Yang C H, et al. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography[J]. Optics Express, 2003, 11(18): 2183-2189.
- [57] Heise B, Schausberger S E, Häuser S, et al. Full-field optical coherence microscopy with a sub-nanosecond supercontinuum light source for material research[J]. Optical Fiber Technology, 2012, 18(5): 403-410.
- [58] Grebenyuk A A, Ryabukho V P. Numerical correction of coherence gate in full-field swept-source interference microscopy[J]. Optics Letters, 2012, 37(13): 2529-2531.
- [59] Izatt J A, Swanson E A, Fujimoto J G, et al. Optical coherence microscopy in scattering media[J]. Optics Letters, 1994, 19(8): 590-592.
- [60] Fercher A F, Hitzinger C K, Kamp G, et al. Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry[J]. Optics Communications, 1995, 117(1/2): 43-48.
- [61] Ding Z H, Ren H W, Zhao Y H, et al. High-resolution optical coherence tomography over a large depth range with an axicon lens[J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 243-245.
- [62] Liu L B, Liu C, Howe W C, et al. Binary-phase spatial filter for real-time swept-source optical coherence microscopy[J]. Optics Letters, 2007, 32(16): 2375-2377.
- [63] Leitgeb R A, Villiger M, Bachmann A H, et al. Extended focus depth for Fourier domain optical coherence microscopy[J]. Optics Letters, 2006, 31(16): 2450-2452.
- [64] Rolland J P, Meemon P, Murali S, et al. Gabor-based fusion technique for Optical Coherence Microscopy[J]. Optics Express, 2010, 18(4): 3632-3642.
- [65] Chen Z J, Yang S H, Xing D. Optically integrated trimodality imaging system: combined all-optical photoacoustic microscopy, optical coherence tomography, and fluorescence imaging[J]. Optics Letters, 2016, 41(7): 1636-1639.
- [66] Wolf E. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data[J]. Optics Communications, 1969, 1(4): 153-156.
- [67] Lauer V. New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope[J]. Journal of Microscopy, 2002, 205(2): 165-176.
- [68] Jin D, Zhou R J, Yaqoob Z, et al. Tomographic phase microscopy: principles and applications in bioimaging[J]. Journal of the Optical Society of America B, 2017, 34(5): B64-B77.
- [69] Kim T, Zhou R J, Mir M, et al. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells[J]. Nature Photonics, 2014, 8(3): 256-263.
- [70] Zhou R J, Kim T, Goddard L L, et al. Inverse scattering solutions using low-coherence light[J]. Optics Letters, 2014, 39(15): 4494-4497.
- [71] Dong D S, Huang X S, Li L J, et al. Super-resolution fluorescence-assisted diffraction computational tomography reveals the three-dimensional landscape of the cellular organelle interactome[J]. Light: Science & Applications, 2020, 9: 11.
- [72] Cotte Y, Toy F, Jourdain P, et al. Marker-free phase nanoscopy[J]. Nature Photonics, 2013, 7(2): 113-117.
- [73] Momey F, Berdeu A, Bordy T, et al. Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(3): 949-962.
- [74] Kuś A, Krauze W, Kujawińska M. Active limited-angle tomographic phase microscope[J]. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20: 111216.
- [75] Chowdhury S, Eldridge W J, Wax A, et al. Refractive index tomography with structured illumination [J]. Optica, 2017, 4(5): 537-545.
- [76] Lee K, Kim K, Kim G, et al. Time-multiplexed structured illumination using a DMD for optical diffraction tomography[J]. Optics Letters, 2017, 42(5): 999-1002.
- [77] Charrière F, Marian A, Montfort F, et al. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy[J]. Optics Letters, 2006, 31(2): 178-180.
- [78] Sung Y, Choi W, Fang-Yen C, et al. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging[J]. Optics Express, 2009, 17(1): 266-277.
- [79] Chen M, Tian L, Waller L. 3D differential phase contrast microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(10): 3940-3950.
- [80] Bao Y J, Gaylord T K. Quantitative phase imaging



- method based on an analytical nonparaxial partially coherent phase optical transfer function[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2016, 33(11): 2125-2136.
- [81] Soto J M, Rodrigo J A, Alieva T. Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy[J]. *Optics Express*, 2017, 25(14): 15699-15712.
- [82] Soto J M, Rodrigo J A, Alieva T. Optical diffraction tomography with fully and partially coherent illumination in high numerical aperture label-free microscopy[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(1): A205-A214.
- [83] Li J J, Chen Q, Sun J S, et al. Three-dimensional tomographic microscopy technique with multi-frequency combination with partially coherent illuminations[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(6): 2526-2542.
- [84] Li J J, Matlock A, Li Y Z, et al. Resolution-enhanced intensity diffraction tomography in high numerical aperture label-free microscopy[J]. *Photonics Research*, 2020, 8(12): 1818-1826.
- [85] Descloux A, Grubmayer K S, Bostan E, et al. Combined multi-plane phase retrieval and super-resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(3): 165-172.
- [86] Gerchberg R W. Super-resolution through error energy reduction[J]. *Optica Acta: International Journal of Optics*, 1974, 21(9): 709-720.
- [87] Papoulis A. A new algorithm in spectral analysis and band-limited extrapolation[J]. *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, 1975, 22(9): 735-742.
- [88] Charbonnier P, Blanc-Feraud L, Aubert G, et al. Deterministic edge-preserving regularization in computed imaging[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1997, 6(2): 298-311.
- [89] Delaney A H, Bresler Y. Globally convergent edge-preserving regularized reconstruction: an application to limited-angle tomography[J]. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 1998, 7(2): 204-221.
- [90] LaRoque S J, Sidky E Y, Pan X C. Accurate image reconstruction from few-view and limited-angle data in diffraction tomography[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2008, 25(7): 1772-1782.
- [91] Lim J, Lee K, Jin K H, et al. Comparative study of iterative reconstruction algorithms for missing cone problems in optical diffraction tomography[J]. *Optics Express*, 2015, 23(13): 16933-16948.
- [92] Kamilov U S, Papadopoulos I N, Shoreh M H, et al. Optical tomographic image reconstruction based on beam propagation and sparse regularization[J]. *IEEE Transactions on Computational Imaging*, 2016, 2(1): 59-70.
- [93] Lim J, Ayoub A B, Antoine E E, et al. High-fidelity optical diffraction tomography of multiple scattering samples[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 82.
- [94] Chen M, Ren D, Liu H Y, et al. Multi-layer born multiple-scattering model for intensity-based 3D phase microscopy[J]. *Optica*, 2020, 7(5): 394-403.
- [95] Chaumet P C, Belkebir K. Three-dimensional reconstruction from real data using a conjugate gradient-coupled dipole method[J]. *Inverse Problems*, 2009, 25(2): 024003.
- [96] Kamilov U S, Liu D H, Mansour H, et al. A recursive born approach to nonlinear inverse scattering [J]. *IEEE Signal Processing Letters*, 2016, 23(8): 1052-1056.
- [97] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458-1462.
- [98] Manohar S, Razansky D. Photoacoustics: a historical review[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2016, 8(4): 586-617.
- [99] Yao J J, Wang L V. Photoacoustic tomography: fundamentals, advances and prospects[J]. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2011, 6(5): 332-345.
- [100] Laufer J, Norris F C, Cleary J O, et al. *In vivo* photoacoustic imaging of mouse embryos[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17: 061220.
- [101] Dima A, Burton N C, Ntziachristos V. Multispectral photoacoustic tomography at 64, 128, and 256 channels[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19: 036021.
- [102] Merčep E, Herraiz J L, Deán-Ben X L, et al. Transmission-reflection photoacoustic ultrasound (TROPUS) computed tomography of small animals [J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 18.
- [103] Zhang H F, Maslov K, Stoica G, et al. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(7): 848-851.
- [104] Maslov K, Zhang H F, Hu S, et al. Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo*

- imaging of single capillaries[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(9): 929-931.
- [105] Song L, Maslov K, Wang L V. Multifocal optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo*[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1236-1238.
- [106] Campagnola P J, Loew L M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1356-1360.
- [107] Nucciotti V, Stringari C, Sacconi L, et al. Probing myosin structural conformation *in vivo* by second-harmonic generation microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(17): 7763-7768.
- [108] Campagnola P J, Millard A C, Terasaki M, et al. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(1): 493-508.
- [109] Lin C Y, Hovhannisyan V A, Wu J T, et al. Label-free imaging of *Drosophila* larva by multiphoton autofluorescence and second harmonic generation microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13: 050502.
- [110] Bancelin S, Couture C A, Pinsard M, et al. Probing microtubules polarity in mitotic spindles *in situ* using interferometric second harmonic generation microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6758.
- [111] Zheng Z, Li D Y, Liu Z Y, et al. Aggregation-induced nonlinear optical effects of AIEgen nanocrystals for ultradeep *in vivo* bioimaging[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(44): e1904799.
- [112] Tserevelakis G J, Filippidis G, Fotakis C, et al. Cell tracking in live *Caenorhabditis elegans* embryos via third harmonic generation imaging microscopy measurements[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16: 046019.
- [113] Dietzel S, Pircher J, Nekolla A K, et al. Label-free determination of hemodynamic parameters in the microcirculation with third harmonic generation microscopy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99615.
- [114] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. *Optics Letters*, 1982, 7(8): 350-352.
- [115] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Imaging biological compounds using the coherent anti-Stokes Raman scattering microscope[J]. *Optical Engineering*, 1985, 24: 352-355.
- [116] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering[J]. *Physical Review Letters*, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [117] Hashimoto M, Araki T, Kawata S. Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a collinear configuration[J]. *Optics Letters*, 2000, 25(24): 1768-1770.
- [118] Potma E O, de Boeij W P, van Haastert P J M, et al. Real-time visualization of intracellular hydrodynamics in single living cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1577-1582.
- [119] Cheng J X, Volkmer A, Book L D, et al. An epidected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105(7): 1277-1280.
- [120] Cheng J X, Book L D, Xie X S. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Optics Letters*, 2001, 26(17): 1341-1343.
- [121] Volkmer A, Book L D, Xie X S. Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: imaging based on Raman free induction decay[J]. *Applied Physics Letters*, 2002, 80(9): 1505-1507.
- [122] Potma E O, Evans C L, Xie X S. Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 241-243.
- [123] Lu F K, Zheng W, Huang Z W. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using tightly focused radially polarized light[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(12): 1870-1872.
- [124] Hajek K M, Littleton B, Turk D, et al. A method for achieving super-resolved widefield CARS microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 19263-19272.
- [125] Heuke S, Legesse F B, Akimov D, et al. Bessel beam coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2015, 32(9): 1773-1779.
- [126] Shi K B, Li H F, Xu Q, et al. Coherent anti-Stokes Raman holography for chemically selective single-shot non-scanning 3D imaging[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(9): 093902.
- [127] Lü Y G, Ji Z H, Yang H, et al. Background-free 3D chemical imaging based on polarization coherent Raman holography[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(9): 2095-2098.



- [128] Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1857.
- [129] Liao C S, Slipchenko M N, Wang P, et al. Microsecond scale vibrational spectroscopic imaging by multiplex stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2015, 4(3): e265.
- [130] Liao C S, Wang P, Wang P, et al. Spectrometer-free vibrational imaging by retrieving stimulated Raman signal from highly scattered photons[J]. *Science Advances*, 2015, 1(9): e1500738.
- [131] Suhaimi J L, Chung C Y, Lilledahl M B, et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2012, 102(8): 1988-1995.
- [132] Andresen E R, Berto P, Rigneault H. Stimulated Raman scattering microscopy by spectral focusing and fiber-generated soliton as Stokes pulse[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(13): 2387-2389.
- [133] Karpf S, Eibl M, Wieser W, et al. A time-encoded technique for fibre-based hyperspectral broadband stimulated Raman microscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6784.
- [134] Zhang D L, Wang P, Slipchenko M N, et al. Quantitative vibrational imaging by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy and multivariate curve resolution analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(1): 98-106.
- [135] Wang K, Zhang D L, Charan K, et al. Time-lens based hyperspectral stimulated Raman scattering imaging and quantitative spectral analysis[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(10): 815-820.
- [136] Zhang D L, Slipchenko M N, Cheng J X. Highly sensitive vibrational imaging by femtosecond pulse stimulated Raman loss[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011, 2(11): 1248-1253.
- [137] Li J J, Cheng J X. Direct visualization of de novo lipogenesis in single living cells[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6807.
- [138] Wei L, Yu Y, Shen Y H, et al. Vibrational imaging of newly synthesized proteins in live cells by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): 11226-11231.
- [139] Wei L, Shen Y H, Xu F, et al. Imaging complex protein metabolism in live organisms by stimulated Raman scattering microscopy with isotope labeling [J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(3): 901-908.
- [140] Ji M B, Arbel M, Zhang L L, et al. Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science Advances*, 2018, 4(11): eaat7715.
- [141] Zhang B H, Xu H L, Chen J, et al. Highly specific and label-free histological identification of microcrystals in fresh human gout tissues with stimulated Raman scattering[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3074-3088.
- [142] Yang Y F, Yang Y L, Liu Z J, et al. Microcalcification-based tumor malignancy evaluation in fresh breast biopsies with hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(15): 6223-6231.
- [143] 周强国, 黄志明, 周炜. 偏振成像技术的研究进展及应用[J]. *红外技术*, 2021, 43(9): 817-828.
- Zhou Q G, Huang Z M, Zhou W. Research progress and application of polarization imaging technology[J]. *Infrared Technology*, 2021, 43(9): 817-828.
- [144] Craven-Jones J, Kudenov M W, Stapelbroek M G, et al. Preliminary results from an infrared hyperspectral imaging polarimeter[J]. *Proceedings of SPIE*, 8160: 81600T.
- [145] Kim J, Escuti M J. Snapshot imaging spectropolarimeter utilizing polarization gratings[J]. *Proceedings of SPIE*, 2008, 7086: 708603.
- [146] Miles B H, Goodson R A, Dereniak E L, et al. Computed-tomography imaging spectropolarimeter (CTISP): instrument concept, calibration, and results [J]. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3754: 235-245.
- [147] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. *Science*, 2017, 355(6325): 606-612.
- [148] Uno K, Aktalay A, Bossi M L, et al. Turn-on mode diarylethenes for bioconjugation and fluorescence microscopy of cellular structures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(14): e2100165118.