

# 受激拉曼散射显微技术及其应用

敖建鹏<sup>1,2\*</sup>, 黄静<sup>1,2</sup>, 季敏标<sup>1,2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup>复旦大学物理学系应用表面物理国家重点实验室, 上海 200433;

<sup>2</sup>复旦大学人类表型组研究院, 上海 200433;

<sup>3</sup>复旦大学义乌研究院, 浙江 义乌 322000

**摘要** 随着光学显微技术的发展,人们得以在亚微米级的尺度观察微观世界,对破译生命活动密码起到了关键性推动作用。其中,相干拉曼散射(CRS)显微术作为一类基于分子特定振动提供成像衬度的技术,通过非线性光学过程大大增强了拉曼散射的信号,提高了成像速率和检测的灵敏度。根据非线性光学过程的不同,可将相干拉曼散射分为相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)。相较于CARS,SRS具有无非共振背景干扰、定量分析等优点,使之备受关注。将介绍相干拉曼散射的基本原理,并着重介绍受激拉曼散射的发展与应用。

**关键词** 非线性光学; 光学显微术; 相干拉曼散射; 超快激光非线性成像; 受激拉曼散射

中图分类号 O437.3;Q-336

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0400001

## Stimulated Raman Scattering Microscopy and Its Applications

Ao Jianpeng<sup>1,2\*</sup>, Huang Jing<sup>1,2</sup>, Ji Minbiao<sup>1,2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Surface Physics, Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China;

<sup>2</sup>Human Phenome Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China;

<sup>3</sup>Yiwu Research Institute, Fudan University, Yiwu, Zhejiang 322000, China

**Abstract** With the development of optical microscopy, people have been able to observe the microcosm on sub-micron scale, which has played a key role in deciphering the code of life activities. Among them, coherent Raman scattering (CRS) microscopy provides imaging contrast based on molecular specific vibration and enhances the spontaneous Raman scattering signal by several orders through a nonlinear optical process, improving the imaging rate and detection sensitivity. According to different nonlinear optical processes, coherent Raman scattering can be divided into coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman scattering (SRS). Compared with CARS, SRS has the advantages of no non-resonant background interference, quantitative analysis, etc. This article will introduce the basic principles of coherent Raman scattering, and focus on the development and application of stimulated Raman scattering.

**Key words** nonlinear optics; optical microscopy; coherent Raman scattering; ultrafast laser nonlinear imaging; stimulated Raman scattering

## 1 引言

1665年,罗伯特·胡克用自制的光学显微镜观

察了软木薄片,把看到的木栓组织中的规则小室命名为“cell”,并将各种镜下图像绘制下来,通过著作《显微图谱》揭开了微观世界的秘密面纱。

收稿日期: 2021-06-22; 修回日期: 2021-08-22; 录用日期: 2021-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(61975033)、上海市科学技术重大专项(2017SHZDZX01,2018SHZDZX01)、上海市卫生和计划生育委员会智能医学专业研究项目(2018ZHYL0204)

通信作者: \*20110190072@fudan.edu.cn; \*\*minbiaoj@fudan.edu.cn

日渐深入的科学研究对体系中不同生化组分的特异成像提出了更高的要求。人们不再满足于普通白光显微镜依靠光吸收获取的对比度,进而开发了相衬、微分干涉、荧光等一系列显微技术。其中,荧光显微术利用荧光基团来特异性地标记化学物质,通过荧光发色团提供化学衬度,进而获得目标化学物质的分布。凭借着高特异性与灵敏度,荧光显微技术成为了现代生命科学研究中的宠儿。但每种技术都有难以避免的局限性,荧光显微技术的关键在于荧光标记:标记分子的引入对细胞的正常生理过程可能不利,甚至要求杀死细胞;其次,由于荧光的产生要通过电子能级间的跃迁,样本容易受到激发光影响而发生损伤,另外荧光基团还存在光漂白的问题,这些都限制了样本的长时间观察;最后,许多重要的物质如细胞内的小分子和脂类等很难或者无法被荧光标记,局限了应用能力。

基于以上问题,人们迫切地想要寻求无需标记同时兼备良好特异性与灵敏度的显微技术。得益于激光技术的发展,显微成像的光源不再拘泥于普通的卤素灯、LED灯。高亮度、强相干性及方向性使得光与物质的非线性相互作用得以高效的发生,进而催生出一系列非线性光学成像技术。不同于线性光学成像,非线性光学的激发效率与激发光光强的高次方呈线性关系,意味着成像过程中仅在焦点附近才能产生有效信号,这种局域性抑制了非焦点处的背景干扰,不仅提高了图像的分辨率与信噪比,而且使得成像具有本征的三维层析能力。同时,非线性光学过程通常要求多个人射光子参与,因此激发光多处于近红外波段,具有更小的光损伤与更低的组织吸收/散射损耗,提高了成像穿透深度。此外,非线性光学成像的另一优点在于可以基于样品内源分子/结构的特征实现快速免标记显微成像。而在诸多非线性光学成像技术中,以探测目标物的特定分子振动模式为成像衬度的相干拉曼散射(CRS)显微技术以优良的化学特异性及视频级成像速度等优点脱颖而出。

相干拉曼散射显微技术主要包括相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)成像技术与受激拉曼散射(SRS)显微技术。其中,CARS成像技术诞生于1982年的美国海军研究实验室<sup>[1]</sup>。但当时成像装置采用的是非共线式布局,即两束激发光在空间光路上并不重合,为了保证非线性效应的高效率转换,需要调整聚焦透镜上光束分离以满足相位匹配要

求。最终,由于聚焦不紧(焦点区域直径大约为 $10\ \mu\text{m}$ ,轴向深度为 $30\ \mu\text{m}$ ),焦点图象与离焦图象相互重叠,分辨率不佳,所以没有引起广泛关注。直到1999年,美国太平洋西北国家实验室的谢晓亮课题组应用新型的激光控制技术,将非共线布局转变为共线,利用高数值孔径的透镜对激光束进行紧聚焦<sup>[2]</sup>。该方法不仅很容易满足相位匹配条件,而且紧聚焦带来的小焦斑体积与CARS的强度依赖特征,可以有效地排除背景光的干扰,并且获得三维层析能力。其次,近红外激光光源情况下的非共振背景比用可见光作为光源的情况要弱。这些进步最终导致了高质量的三维CARS显微技术的诞生,使之逐步走向了实用阶段。经过数十年的发展,CARS在脂质与蛋白质的生物学免标记追踪、液晶分子的化学键取向等领域取得了丰硕的成果<sup>[3-6]</sup>。但由于CARS过程中能量局限于电磁场/光子中,电子跃迁可绕过分子振动直接通过虚能级产生,导致其具有非共振背景信号的干扰,并产生光谱畸变。在不断摸索近10年后,哈佛大学谢晓亮课题组在2008年推出了SRS技术,完美地解决了上述问题<sup>[7]</sup>。与此同时,斯图加特大学Nandakumar等<sup>[8]</sup>与大阪大学Ozeki等<sup>[9]</sup>分别于2009年独立提出分子振动成像的想法。SRS的发生依赖于光子能量与分子振动之间的交换,具有严格的共振吸收特征,因此SRS在光谱上与自发拉曼一致,在图像上也不再受非共振背景的困扰;此外,SRS信号与分子浓度呈线性关系,更方便于定量解析复杂混合物体系中的各种化学成分。也因为这些特性,SRS不断获得研究者的青睐。在过去12年间,SRS显微技术高速发展,免标记成像在组织病理诊断、生物代谢定量等方面取得重要成果<sup>[10-18]</sup>。此外,拉曼探针成像也已出现,通过在目标分子中引入炔基、氰基、氘代同位素作为信源,可以实现类似荧光成像的特异标记<sup>[19-28]</sup>。由于拉曼探针的直接信源是化学键而非整个分子,因此对标记目标的干扰微弱且不存在明显的淬灭问题,信号更为稳定。而相比荧光电子弛豫跃迁带来的宽发射光谱( $\sim 1500\ \text{cm}^{-1}$ ),拉曼光谱的窄峰宽( $\sim 10\ \text{cm}^{-1}$ )有助实现超多色复用成像,直接可视化细胞内大量不同分子物种,对理解复杂的系统和过程极有价值<sup>[29-30]</sup>。

本文结合本课题组在SRS显微成像方面的研究进展,介绍该技术的原理、发展及其应用。

## 2 技术原理

### 2.1 光的散射

光通过物质被减弱的原因有两种,一种是物质对光的吸收,另一种是物质对光的散射。光的散射可描述为当光通过非均匀介质时,偏离原来的传播路径向四周散开的现象。根据入射光频率( $\nu$ )的改变与否,可把散射分为弹性散射( $\nu_{\text{scattering}} = \nu_{\text{incidence}}$ )和非弹性散射( $\nu_{\text{scattering}} \neq \nu_{\text{incidence}}$ )。弹性散射包括瑞利散射、米氏散射等;非弹性散射包括拉曼散射、布里渊散射、康普顿散射等。由光与物质相互作用的经典理论(即经典电偶极子模型)可知,当光通过介质时,在入射光波的作用下,介质中的电子、离子或分子中的电荷会做受迫振动,从而发出次级电磁波。对于均匀介质,其内部的电偶极子各向同频率且有一定的相位关系,相干次波与入射波叠加的结果使得沿折射光方向的合成波发生干涉加强,其他方向上的合成波发生干涉相消。对于非均匀介质,其内部的悬浮微粒或密度涨落会导致次波不相干,从而破坏了合成波沿折射方向的干涉加强,且在其他方向上也有光的传播,即产生了散射光。

### 2.2 自发拉曼散射

对于生物样品而言,拉曼散射技术是一种常见的研究手段<sup>[31]</sup>。自发拉曼现象首次在 1928 年被印度科学家 Raman 发现,具体表现为散射光中会观察到与入射光频率不一致的成分。分子在入射光电场  $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$  的作用下会发生极化率的变化,进而引起样品折射率的起伏,从而破坏样品的光学均匀性。在入射光电场  $\mathbf{E}$  的作用下,分子的感应电偶极矩  $\boldsymbol{\mu}$  正比于场强  $\mathbf{E}$ :

$$\boldsymbol{\mu} = \alpha \mathbf{E} = \alpha \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t), \quad (1)$$

式中: $\nu_0$ 是入射光频率; $\alpha$ 是分子极化率,代表分子中的电子在外电场作用下变形(即引起电偶极矩 $\boldsymbol{\mu}$ )的难易程度。若 $\alpha$ 是与时间无关的常数,则 $\boldsymbol{\mu}$ 以 $\nu_0$ 做周期性变化,即瑞利散射。但是,由于分子中的各个原子核在其平衡位置附近振动,分子的极化率也随之改变,并可以按分子振动坐标 $q$ 展开为泰勒级数形式:

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad (2)$$

将核运动假设为简谐振动,有

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (3)$$

忽略极化率中的二阶及以上修正,最后可得

$$\boldsymbol{\mu} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \cos[2\pi(\nu_0 - \nu) t] + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \cos[2\pi(\nu_0 + \nu) t] \quad (4)$$

(4)式表明,随时间变化的感应电偶极矩 $\boldsymbol{\mu}$ 作为分子散射的二级辐射源,会产生三种频率:弹性瑞利散射的频率 $\nu_0$ (或入射光频率)、非弹性拉曼散射的频率 $\nu_0 \pm \nu$ (或拉曼散射光频率)。拉曼散射对称地分布在瑞利散射的两侧,但强度却比瑞利光的强度弱得多。其中, $\nu_0 - \nu$ 代表斯托克斯散射, $\nu_0 + \nu$ 是反斯托克斯散射。拉曼光谱图常表示为拉曼散射光强度相对拉曼位移(Raman shift)的函数图。Raman shift就是瑞利频率和拉曼频率之间的差值,单位为 $\text{cm}^{-1}$ ,对应分子的振动频率,因此拉曼光谱只与散射物质分子的结构有关,而与入射光波长无关,被视为分子的“特征光学指纹”。

上面的经典理论有缺陷,例如不能很好地解释为什么斯托克斯光会比反斯托克斯光更强,而量子力学的知识能帮助我们理解这一问题。从量子力学的角度看,处在不同能级上的分子能量可表示为

$$E_j = \left( j + \frac{1}{2} \right) \hbar \nu, \quad (5)$$

式中: $j = 0, 1, 2, 3, \dots$ 是简正模式 $q$ 的振动量子数; $\hbar$ 是普朗克常数。

在外来光子 $\hbar\nu_0$ 的作用下,分子能从某一振动态跃迁到一个瞬时虚态,再从瞬时虚态弛豫回原来的振动态(瑞利散射)或别的振动态(拉曼散射)。如果分子弛豫回比原始态更高能级的振动态,则入射光子会损失能量,得到的散射光频率会比入射光频率低,即发生了波长红移,这一过程被称为斯托克斯散射。如果分子回到比原始态更低的振动能级,那么入射光子的能量会增大,从而得到的散射光会发生波长蓝移,即发生了反斯托克斯散射。根据 Boltzmann 分布,室温下分子会倾向于处在低能级(振动基态)而非高能级态(振动激发态),这就是为什么斯托克斯光会比反斯托克斯光强的原因。因此,拉曼散射可理解为在量子化振动能级上的双光子非弹性跃迁,如图 1 所示。需要注意,只要入射光子和分子之间交换的能量等于分子散射系统的旋转、振动或电子能级,都可能会发生拉曼散射。目前拉曼效应的研究对象主要涉及分子振动能级。

正常情况下,自发拉曼信号很微弱, $10^7$ 个光子与分子的相互作用中大约会发生一次自发拉曼散

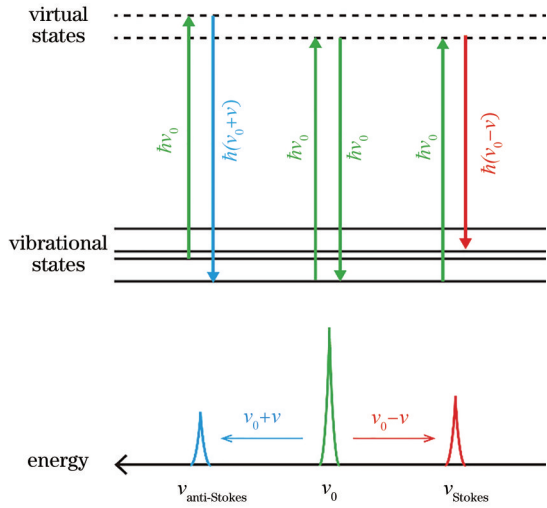


图1 拉曼散射能级示意图

Fig. 1 Schematic of Raman scattering energy level

射。因此,多年来提出并发展了多种基于不同原理的增强自发拉曼信号的技术,包括共振拉曼散射(RRS)和表面增强拉曼散射(SERS)<sup>[32-33]</sup>,前者利用接近电子吸收能级的选择性共振增强了极化率并把拉曼信号提高6个数量级,后者通过表面等离子共振的激发局部增强了电磁场,从而把金属表面上的拉曼散射提高15个数量级。

### 2.3 相干拉曼散射(CRS)

此外,还可以借助基于相干分子振动激发的非线性相干拉曼效应来提高拉曼信号,例如相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)。与自发拉曼散射中入射光诱导样本各点产生的偶极辐射相位相比,相干拉曼散射(CRS)在样本不同点之间的散射光存在相位关联,能够相干叠加进而改变信号的分布。为此,在CRS中,不仅需要提供原本自发拉曼散射中的激发光(泵浦光),还需提供一束斯托克斯激光同时与分子振动相互作用。当泵浦光与斯托克斯光之间的拍频与分子振动频率匹配时,可以发生共振效应,使得被激发分子发生相干振动。分子振动的相干运动将进一步散射泵浦光子或斯托克斯光子,导致CARS或SRS。CARS和SRS都是同时产生的三阶非线性光学过程,构成CRS,但它们的方法不同,应用场合也不同。

#### 2.3.1 相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)

CARS是一个四波混频(FWM)过程,以频率为 $\omega_p$ 的泵浦光和频率为 $\omega_s$ 的斯托克斯光激发样本,当两者频率差 $\omega_p - \omega_s$ 恰好等于样本分子的某个化学键振动频率 $\Omega$ ,并且满足相位匹配条件 $k_{as} = 2k_p -$

$k_s$ 时,将产生频率为 $\omega_{as}$ 的反斯托克斯光。该过程中,入射光子和发射光子满足光学参量关系,即所有的光子之间满足能量守恒,分子最终返回到基态,而不需要与电磁场进行净能量交换。这给CARS带来了一个致命的问题——非共振背景(NRB)。如图2(a)所示,即使泵浦光子和斯托克斯光子从振动共振中失谐,纯电子跃迁也会对FWM信号有贡献。原则上,大多数材料都含有丰富的电子云,并将产生非共振背景,包括玻片和溶液。

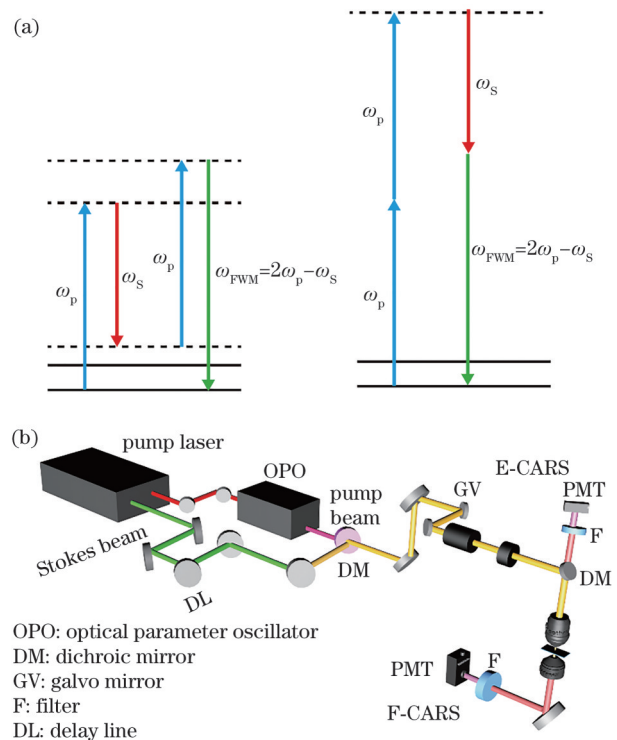


图2 CARS显微技术示意图。(a)造成非共振背景的FWM跃迁方式;(b)CARS系统示意图

Fig. 2 Schematic of CARS microscopy. (a) Diagram of the FWM processes that contributes to the non-resonant background; (b) setup of the CARS system

从非线性光学理论上分析,CARS的信号生成可以描述为

$$\mathbf{E}_{\text{CARS}}(\omega_{as}) = iN\chi^{(3)}\mathbf{E}_p^2(\omega_p)\mathbf{E}_s^*(\omega_s), \quad (6)$$

式中: $\mathbf{E}_p$ 和 $\mathbf{E}_s$ 为入射泵浦光与斯托克斯光的电场; $\mathbf{E}_{\text{CARS}}$ 为信号的电场; $N$ 是分子浓度; $\chi^{(3)}$ 为三阶电极化张量,包含非共振和共振两部分的贡献。

$$\chi^{(3)} = \chi_{\text{NR}}^{(3)} + \frac{\chi_{\text{R}}^{(3)}}{\Delta - i\Gamma}, \quad (7)$$

式中: $\chi_{\text{NR}}^{(3)}$ 表示来自分子内部电子对激发光的非共振背景,由实部构成; $\chi_{\text{R}}^{(3)}$ 是源自分子内部特定化学键振动的共振贡献,既有实部又有虚部;分子振动

的失谐量  $\Delta = \Omega - \omega_p - \omega_s$ ;  $\Gamma$  是拉曼谱的线宽。

通常是直接通过光电倍增管 (PMT) 检测 CARS 信号光强, 称为零差检测。因此, 信号强度  $I_{\text{CARS}}$  可以写成

$$I_{\text{CARS}} = |\mathbf{E}_{\text{CARS}}|^2 = N^2 |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_s. \quad (8)$$

带入三阶电极化张量, 关系式为

$$I_{\text{CARS}}(\Delta) \propto |\chi_{\text{NR}}^{(3)}|^2 + |\chi_{\text{R}}^{(3)}(\Delta)|^2 + 2\chi_{\text{NR}}^{(3)} \text{Re} \chi_{\text{R}}^{(3)}(\Delta), \quad (9)$$

式中: 右边第一项为非共振项, 是一个与失谐量无关的常数, 对应信号中的恒定背景; 第二项为想要探测的共振项; 第三项则是共振项与非共振项的耦合项, 使 CARS 光谱相对自发拉曼光谱的洛伦兹线型发生畸变。由上可知, CARS 信号产生一个新的蓝移波长, 因此可以大大减弱荧光背景; 然而另一方面, 由于耦合项的存在, CARS 信号具有非共振背景的干扰, 且其信号强度与被检测物浓度之间的关系不明确, 导致 CARS 在定量研究上面对诸多困难。

在谢晓亮课题组<sup>[2]</sup>的优化下, 目前 CARS 显微技术主要采用两束激光共线激发的形式。如图 2(b) 所示, 一台脉冲激光器同时提供斯托克斯光和光学参量振荡器 (OPO) 的泵浦光, 借由 OPO 可以获得与泵浦光脉冲时序一致且波长可调谐的信号光 (Signal) 与闲置光 (Idler), 通常经二向色镜对信号光与斯托克斯光进行空间合束, 时间延迟线精确控制两束光的时间同步。如此, 得到的时间、空间均重合的两束激光在扫描单元与物镜的帮助下对样本进行逐点扫描, PMT 采集各点的 CARS 信号进而映射出样本中分子振动的分布, 形成图像。通过改变泵浦光的波长/频率, 可以满足不同分子化学键振动的探测需求。

此外, 由于拉曼光谱中大部分分子振动特征峰都比较精细 ( $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ ), 所以若使用飞秒激光激发, 虽然峰值功率高, 非线性光学信号强, 但光谱范围宽, 限制了成像的化学特异性。因此, 飞秒激光激发的 CARS 一般只用于探测高波数区域 ( $2800 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) 的碳氢键以及氧氢键这些谱线较宽、不需要精细划分化学种类的官能团振动; 而  $1 \sim 10 \text{ ps}$  脉宽的皮秒激光激发的 CARS 则平衡了信号强度与光谱分辨率, 在实际运用中更为常见。

### 2.3.2 受激拉曼散射 (SRS)

2008 年, 谢晓亮课题组与其他几个课题组分别独立研制出了 SRS 显微成像技术。该技术在很大

程度上解决了 CARS 显微术面临的一些困难, 成为相干拉曼散射显微术新的突破口。

由图 3(a) 能级图可以看出, 与受激发射原理类似, 当泵浦光子和 Stokes 光子与分子相互作用并达到相同的共振条件时, 自发散射过程变为受激过程。与 CARS 不同的是, 光子能量在 SRS 中不再守恒。光子向分子有净能量流动: 某些泵浦光子湮灭, 而同样数量的斯托克斯光子产生, 损失的光子能量被转移为分子的激发态能量, 如图 3(b) 所示。结果, 泵浦光束强度降低 (受激拉曼损失, SRL), 斯托克斯光强度增大 (受激拉曼增益, SRG), 表示为  $\Delta I_p$  和  $\Delta I_s$ 。当光子从振动共振中失谐时, 这种能量转移被阻断, 没有 SRL/SRG 发生, 即在 SRS 中非共振背景被消除。从受激发射的角度来看, 强度变化可以表示为

$$\Delta I_p \propto -N\sigma_{\text{Raman}} I_p I_s, \quad (10)$$

$$\Delta I_s \propto N\sigma_{\text{Raman}} I_p I_s, \quad (11)$$

式中:  $\sigma_{\text{Raman}}$  代表拉曼散射截面。

从非线性光学角度出发, SRL 可以写成

$$\mathbf{E}_{\text{SRL}}(\omega_p) = iN\chi^{(3)} \mathbf{E}_p(\omega_p) \mathbf{E}_s^*(\omega_s) \mathbf{E}_s(\omega_s). \quad (12)$$

产生的信号场与泵浦光的频率相同, 二者发生相干干涉。最后的 SRS 信号是以泵浦光为本征振荡器 (local oscillator) 进行外差检测得到的。SRL 信号可以表示为

$$S_{\text{SRL}} = \text{Re} [\mathbf{E}_{\text{SRL}} \mathbf{E}_p^*] = N \text{Im} [\chi^{(3)}] I_p I_s. \quad (13)$$

因此, SRS 信号与三阶电极化张量的虚部成比例, 并且由于非共振  $\chi_{\text{NR}}^{(3)}$  几乎是实数, 所以 SRS 本质上是没有非共振背景的。此外, 三阶电极化张量的虚部保留了拉曼光谱的线形, 因此 SRS 产生了类似自发拉曼光谱的光谱, 这与 CARS 相比有很大的优势, 如图 3(c) 所示。

实际上, SRS 从 SRL 或 SRG 获得信号, 由于该信号叠加在原本入射光的基础上, 与入射光的强度相比, SRS 诱导的  $\Delta I$  依旧很微弱 ( $\Delta I/I \sim 10^{-5}$ ), 所以需要结合调制解调技术以检测 SRS 信号, 如图 3(d) 所示。在这种方法中, 一束激发光束通过电光调制器 (EOM) 或声光调制器 (AOM) 在射频 (RF) 下进行强度调制。调制频率一般为 MHz, 以避免激光器低频热和机械波动导致的  $1/f$  噪声, 此外如果频率接近扫描仪的像素停留时间, 那么扫描一个混浊的样本时会导致寄生调制信号的泄漏 (通过浑浊样本时, 扫描激光束也会有强度变化)。因此, 为保证成像速度 (像素停留时间小于  $2 \mu\text{s}$ ), 实验中多用 10

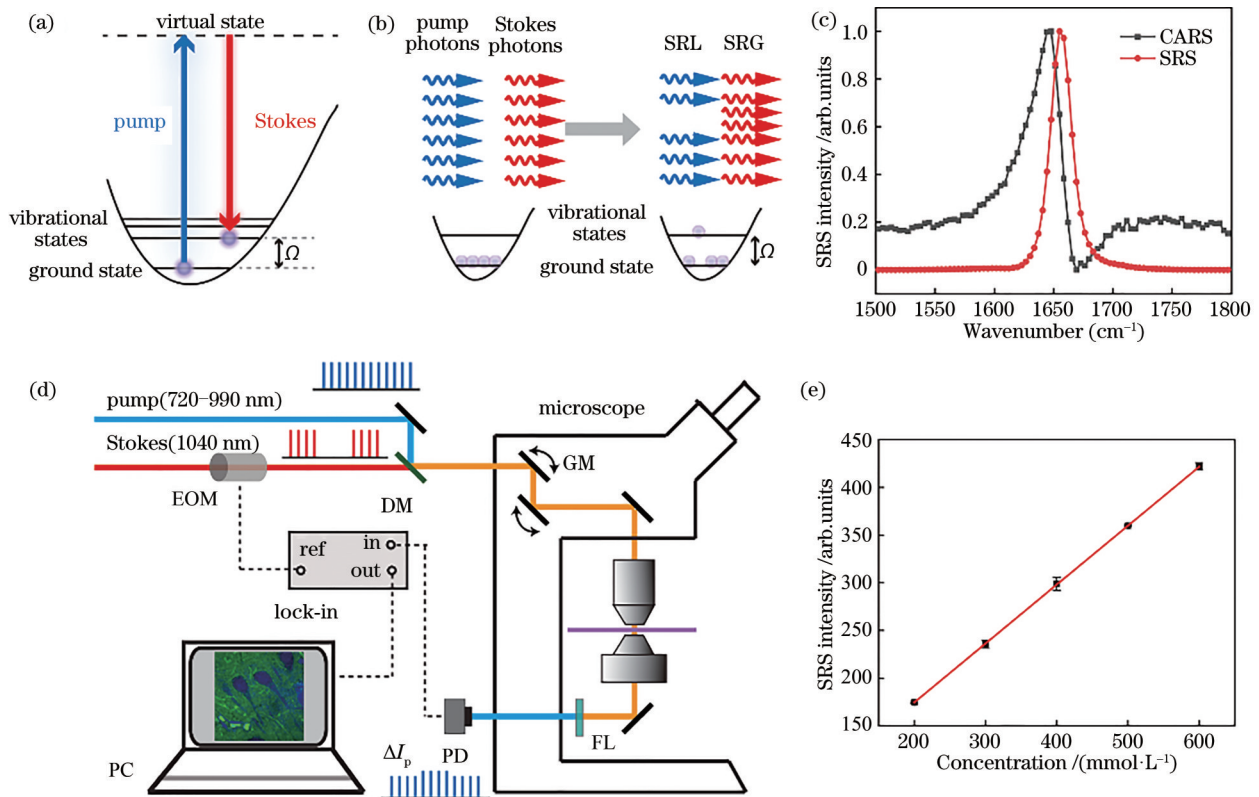


图3 SRS显微镜的原理、组成和特点。(a) SRS的能量图；(b) SRS的能量转移过程；(c) SRS和CARS的典型光谱；(d) SRS系统示意图及调制转移原理；(e) 硫酸根离子SRS信号与浓度的关系

Fig. 3 Principle, composition, and characteristics of SRS microscopy. (a) Energy diagram of SRS; (b) energy transfer process of SRS; (c) typical spectrum of SRS and CARS; (d) setup of SRS system and modulation transfer scheme; (e) relationship between the SRS signal of sulfate ion and the concentration

MHz调制频率。当SRL/SRG发生时,另一波束的强度将在相同频率下发生反相/同相变化,从而在大的直流背景上产生了 $\Delta I$ 弱信号,可以将EOM/AOM的调制频率作为参考源,进而被锁相放大器解调出来。此外,由(13)式可知,SRS信号强度与被测物的浓度呈线性关系,如图3(e)所示,使得定量分析成为可能。

### 3 技术发展

由于研究对象体系的多变性、异质性,对成像技术不断提出更高的要求:更快的成像速度、更高的探测灵敏度、更精细的空间分辨率。为此,SRS显微技术在众多研究团队的努力下逐渐完善,实现了最高视频级的成像速率以及最小单分子层面的检出灵敏度,并且有望进一步突破分辨率衍射极限。

#### 3.1 成像速度

作为相干技术的一种,SRS类比受激辐射的概念将微弱的拉曼散射信号提高了3~5个量级,使得

快速显微成为可能。研究人员根据不同的应用场合分别对SRS显微技术做出了一系列改良。

在活体成像中,对于不透明的厚块组织,无法收集有效的透射光信号,这时便只能依赖于背向散射光。而传统的显微物镜由于孔径尺寸的限制,只能收集~10%的背向散射光子,极大地限制了成像效率。为此,Saar等<sup>[34]</sup>于2010年通过射线追踪模拟优化了背向散射信号的采集方式,在物镜前端放置一个中央开孔的光电二极管作为探测器。激发光通过中央小孔照射样品,而二极管的面积足以覆盖模拟结果给出的主要背向散射光区域(~5 mm),保证了散射光被探测器高效率收集。此外,他们还制作了一台全模拟形式的锁相放大器,配合共振式扫描振镜系统,成功地在活体小鼠上实现了视频级动态成像,为在体生命活动的微观观测提供强有力的技术方法,如图4(a)所示。

在病理成像中,脂质、蛋白质双通道SRS图像能很好地体现传统病理金标准H&E的染色结果(作为SRS的主要应用之一,将在应用部分详细介绍

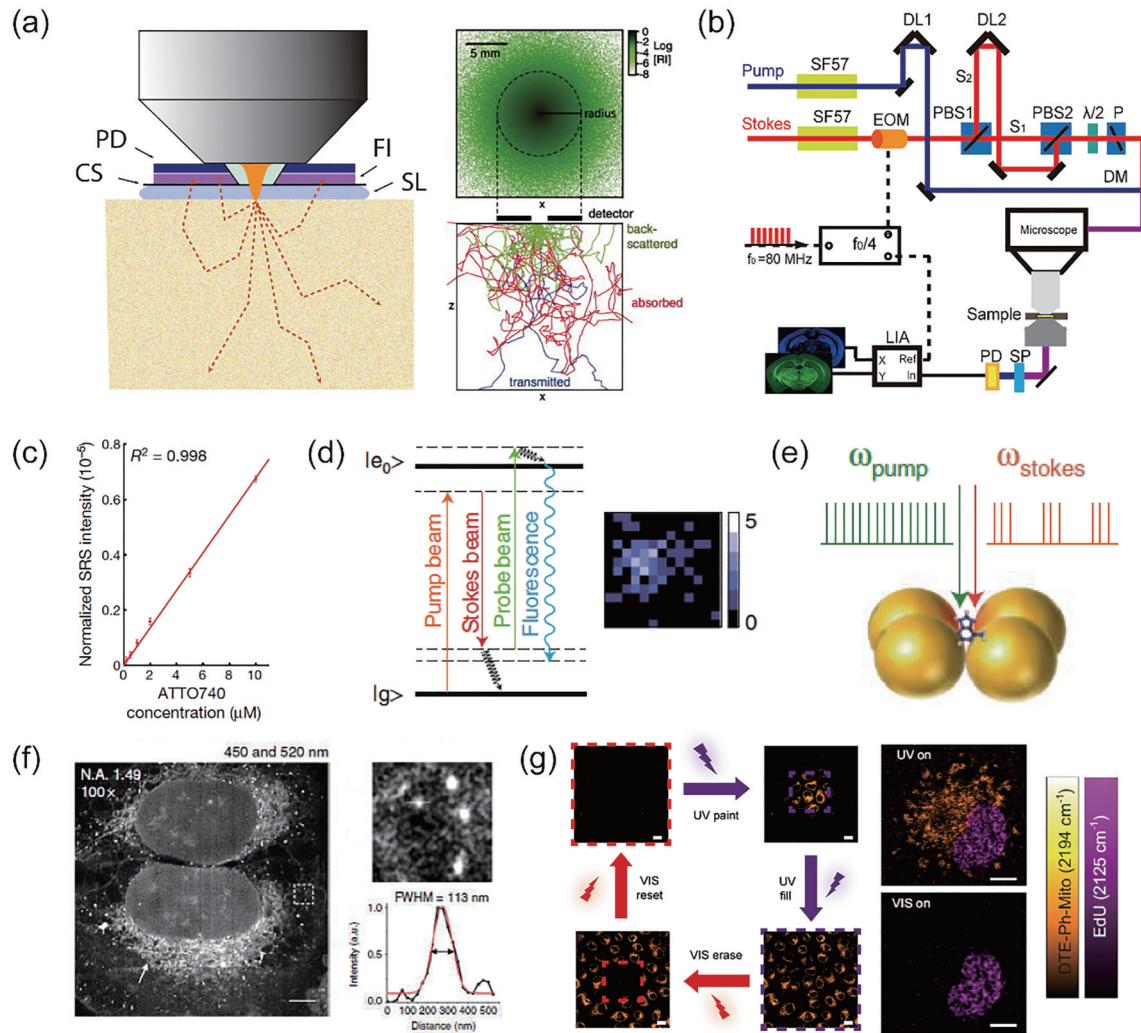


图4 SRS在成像速度、探测灵敏度和分辨率方面的技术发展。(a)改进的背向探测方式<sup>[34]</sup>;(b)双相SRS同步探测脂质和蛋白质通道<sup>[42]</sup>;(c)预共振受激拉曼散射的探测灵敏度<sup>[30]</sup>;(d)SREF的能级示意图和以罗丹明800为样本的单分子图像<sup>[49]</sup>;(e)等离子体增强SRS(PESRS)达到单分子灵敏度,腺嘌呤在金纳米结构上的等离子体增强示意图<sup>[50]</sup>;(f)HeLa细胞的高分辨成像<sup>[51]</sup>;(g)可逆光开关SRS成像,通过紫外光/可见光照射选择性点亮/擦除HeLa细胞<sup>[60]</sup>,标尺为20 μm

Fig. 4 Development of SRS in imaging speed, detection sensitivity, and resolution. (a) Improved back detection method<sup>[34]</sup>; (b) dual-phase SRS detecting lipid and protein channels simultaneously<sup>[42]</sup>; (c) detection sensitivity of pre-resonance stimulated Raman scattering<sup>[30]</sup>; (d) energy level diagram of the SREF and the single-molecule image of Rhodamine 800<sup>[49]</sup>; (e) plasma-enhanced SRS (PESRS) achieving single-molecule sensitivity, schematic of plasma enhancement of adenine on gold nanostructures<sup>[50]</sup>; (f) high-resolution imaging of HeLa cells<sup>[51]</sup>; (g) reversible switchable SRS imaging, selectively light/erase HeLa cells by irradiating UV/visible light<sup>[60]</sup>, scale bar is 20 μm

绍),但双通道意味着要对同一区域采集两种化学组分的信息。对于单频共振的SRS技术,若采用串行探测模式,则每个成像区域中需要调节窄带激光波长,或光谱聚焦时间零点重复扫描两次,以得到两种组分的图像,耗费时间<sup>[35-37]</sup>。因此,为了提高采集效率,出现了皮秒-飞秒联合宽带激发的并行探测模式。在这种探测模式下,同时检测宽带信号时需要多通道阵列检测和锁相放大器解调<sup>[38-40]</sup>,亦或者利用声光可调滤光器(AOTF)将宽带脉冲的激发波

长调制在不同射频,通过快速傅里叶变换,使用带锁相放大器的单个检测器提取多路SRS信号<sup>[41]</sup>,但系统的复杂性与成本也会随之增加。2016年,复旦大学季敏标课题组<sup>[42]</sup>基于飞秒光谱聚焦的受激拉曼散射显微系统,采用双延迟线控制偏振分束棱镜(PBS)分束的两路Stokes光程相位相差 $\pi/2$ ,然后将两束Stokes光与泵浦光的共振频率锁定在脂质和蛋白质两个通道,借助相敏锁相放大器的同相(X)和正交(Y)输出实现同时双通道成像,在保证

原本系统简洁性的同时利用单次扫描即可获取高质量的伪 H&E 图像,如图 4(b)所示。此外,针对病理成像中的大面积拼接需求,该课题组发展了 line-scan 方法,控制振镜进行一维运动,不断在正交方向移动载物台来完成图像扫描,巧妙地避开了传统 frame tiling 中帧与帧扫描之间的时间间隔,大幅提升了组织大面积成像的效率<sup>[43]</sup>。

### 3.2 探测灵敏度

对于大部分化学键,SRS 的浓度探测灵敏度在  $\mu\text{mol/L}$ ~ $\text{mmol/L}$  之间,并且由于 SRS 采用了高频调制转移与锁相探测技术,理论上不受激光低频波动噪声的影响而接近散粒噪声极限,检测灵敏度与采集时间的平方根呈线性关系<sup>[44]</sup>。以 C=C 双键为例,在 100  $\mu\text{s}$  的积分时间下,锁相探测的  $\Delta I/I$  的检测灵敏度  $\sim 10^{-7}$ ,SRS 的检出线为  $\text{mmol/L}$  量级,相当于聚焦体积( $\sim 0.1 \text{ fL}$ )中有  $\sim 10^5$  个分子。

正如前文所提到的共振拉曼效应:当激发频率接近或重合于分子的一个电子吸收峰时,某一个或几个特定的拉曼峰会急剧增强,甚至达到普通拉曼强度的百万倍<sup>[45]</sup>。而在生物内源分子(脂质,核酸,蛋白质等)的 SRS 成像中,由于 SRS 的激光泵浦激光波长与探测分子的吸收峰相差较大,属于非共振拉曼模式,所以闵玮课题组<sup>[46-47]</sup>尝试使用共振拉曼效应以提高 SRS 的灵敏度。在实验中,他们发现泵浦光和吸收峰的严格共振确实会增强受激拉曼信号,但拉曼窄带振动信号却几乎被并发的宽背景淹没,他们推测这可能是电子共振四波混频和竞争瞬态过程导致的。最后,他们通过仔细调整分子吸收峰,使之接近但不等于 SRS 泵浦激发波长(泵浦激光波长与分子的峰值吸收波长相差  $1400\sim 4200 \text{ cm}^{-1}$ ),在 1 ms 的采集时间内将检测极限提高到亚  $\mu\text{mol/L}$  量级(在焦体积内包含  $\sim 50$  个分子),同时保持具有高化学选择性的振动特征,如图 4(c)所示。这种基于荧光染料开发的预共振受激拉曼散射(epr-SRS)技术极大地推进了 SRS 的探测极限<sup>[46]</sup>。此后两年,闵玮课题组<sup>[48-49]</sup>还在此基础上进一步通过受激拉曼激发荧光(SREF)显微镜获得了单分子量级的探测灵敏度,成功实现了全远场模式下的单分子拉曼成像,如图 4(d)所示。在该技术中,受激拉曼负责将分子泵浦到中间振动本征态,然后分子向上转换到电子荧光态,从而将振动共振编码到荧光发射的激发光谱中,展示出荧光单分子灵敏度和拉曼超多色复用的优点。

此外,程继新课题组<sup>[50]</sup>利用金纳米颗粒的等离子体增强效应,结合系列降噪提取算法,开发出高离激元增强受激拉曼散射(PESRS)显微镜并展示了其单分子量级的检测灵敏度,如图 4(e)所示。

### 3.3 空间分辨率

在精细的亚细胞显微中,空间分辨率对成像质量与图像分析至关重要。SRS 作为一种非线性成像技术,由于其对强度的高阶依赖关系,具有本质上的光学层析能力,并达到了与双光子激发荧光显微镜相同的衍射极限分辨率。利用近红外光激发(波长为  $\sim 800, 1040 \text{ nm}$ ),SRS 显微镜的典型横向分辨率为  $\sim 350 \text{ nm}$ ,轴向分辨率为  $1.1 \mu\text{m}$ 。根据阿贝成像理论,受衍射艾里斑的限制,空间分辨率的提高可以通过减小激发光波长,使用高数值孔径(NA)的物镜来实现。华中科技大学王平课题组<sup>[51]</sup>使用 BBO 晶体将原本近红外光波长倍频至  $\sim 450 \text{ nm}$  蓝光波长,配合使用 1.49 高数值孔径的物镜,在聚苯乙烯(PS)小球以及生物样本中客观验证了 SRS  $\sim 130 \text{ nm}$  的横向分辨率,如图 4(f)所示,但这种方法依然受空间衍射的束缚。

为了实现拉曼成像的超分辨显微,目前已经有几种超分辨 SRS 技术被提出<sup>[52]</sup>。受到受激发射耗尽(STED)荧光显微镜的启发,在原本泵浦激发光和 Stokes 激发光的基础上增加第三束激光,通过饱和/耗尽或竞争等过程抑制 SRS 信号,来打破衍射极限,利用环形退相干光束可以获得  $\sim 2$  倍的横向分辨率提升<sup>[53-56]</sup>。另一种,通过使用虚拟正弦调制来提取 SRS 信号的二次谐波阶的方法的亚衍射分辨率在没有额外激光束的情况下达到  $\sim 250 \text{ nm}$ <sup>[57]</sup>。但这些方法大都依赖于强的激发光功率,容易对样本产生损伤。Xiong 等<sup>[58-59]</sup>基于之前开发的 SREF 技术,通过波谱调制抑制背景信号的干扰,并引入损耗光实现了超分辨拉曼显微。近来,季敏标课题组<sup>[60]</sup>报道了一类具有拉曼光活性的分子,这类分子将拉曼信源探针——炔基连接至二芳基乙烯母体分子上,通过二芳基乙烯母体在紫外/可见光照射下闭/开环导致的电子云变化诱导炔基拉曼峰位的偏移,成功实现了 SRS 的可逆光开关成像,如图 4(g)所示。借鉴 RESOLFT 荧光超分辨技术,该类分子的引入有望实现低功率环形抑制光的拉曼超分辨成像。几乎同期,Wei 课题组<sup>[61]</sup>与 Ozeki 课题组<sup>[62]</sup>也分别同样报道了相似的工作进展。



## 4 应 用

CARS 与 SRS 都是基于生物体中核酸、脂质和蛋白等物质自身的 Amide I、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub> 化学键进行特异性成像的。由于 SRS 是受激过程,只有在严格满足共振条件  $\Omega_R = \omega_p - \omega_s$  的情况下才能发生,因此本质上不存在类似 CARS 的非共振背景干扰。目前, SRS 以化学特异性、高分辨率、快速成像以及三维扫描的优点,在病理检测、生物代谢、药物运输等诸多方面均得到了广泛应用。

### 4.1 细胞生物学

细胞是机体结构和生理功能的基本单位,是生长、发育的基础。人体大约由 40 万亿~60 万亿个形态大小各异的细胞构成,而每一个细胞都时刻经历着生命活动。SRS 近衍射极限的分辨率允许亚细

胞结构成像且不需引入外源荧光标记物,超高的成像速度也使得动态观测成为可能。

#### 4.1.1 细胞分裂与遗传

在细胞的生命周期中,通过分裂增殖并将遗传物质传递给子代的过程占据了极为重要的地位。其中, DNA 是真核生物的主要遗传信息载体,以往只能通过荧光标记的方式定位追踪,但标记意味着外源干扰,有可能对细胞正常活动造成影响。而 SRS 免标记成像方法允许在活生物体中以非侵入性的方式可视化 DNA,具有明确的实际意义。Lu 等<sup>[63]</sup>通过线性解谱在高波数拉曼区域得到细胞中 DNA 的分布,相较于以指纹区磷酸拉曼峰成像<sup>[64]</sup>,高波数成像具有更高的灵敏度。之后,他们以延时摄影的方式记录下细胞分裂的动态过程,如图 5(a)所示。

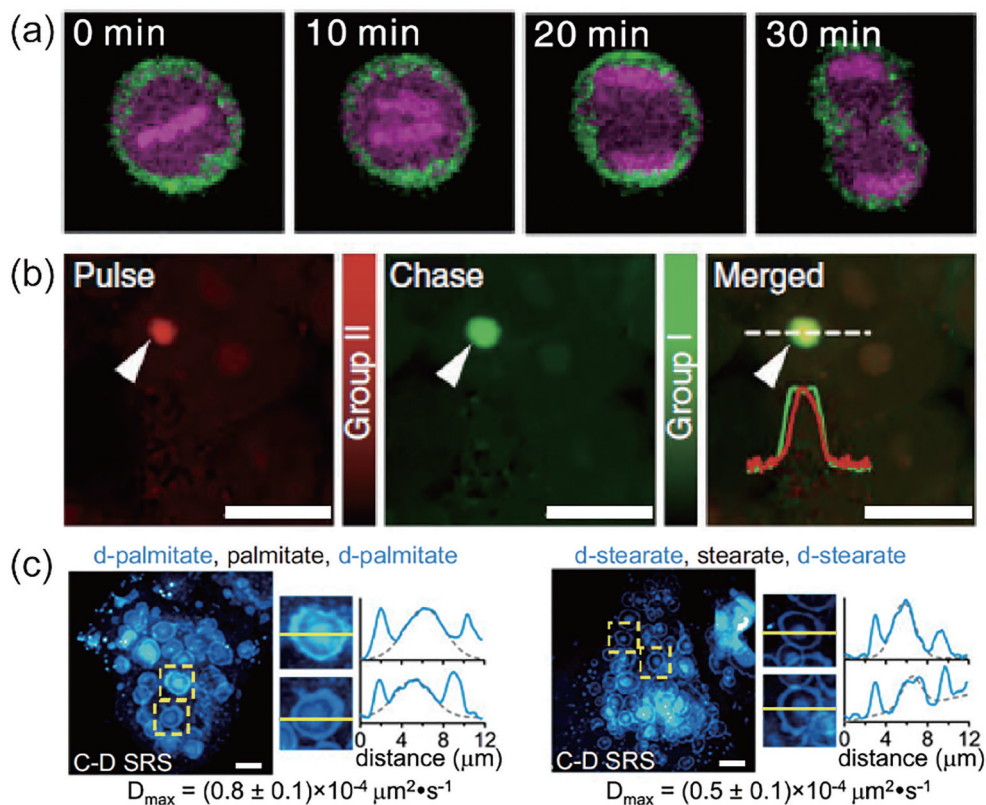


图5 SRS在细胞生物学上的代表工作。(a)用SRS对正在进行细胞分裂的HeLa细胞中的DNA进行延时无标记成像<sup>[63]</sup>; (b)通过序列标记II组和I组d-氨基酸,对新合成的蛋白进行双色pulse-chase成像<sup>[65]</sup>,标尺为10 μm; (c)氘化脂肪酸的SRS成像<sup>[28]</sup>,标尺为10 μm

Fig. 5 Representative works of SRS in cell biology. (a) Time-lapse label-free imaging of DNA in a HeLa cell undergoing cell division by using SRS<sup>[63]</sup>; (b) two-color pulse-chase imaging of newly synthesized proteins achieved by sequential labeling of group II and group I d-amino acids<sup>[65]</sup>, scale bar is 10 μm; (c) SRS imaging of deuterated fatty acids<sup>[28]</sup>, scale bar is 10 μm

#### 4.1.2 细胞代谢

与遗传相同,代谢也是生命的重要特征。理解新陈代谢对阐明许多生物过程的机制基础不可或

缺,如发育、内环境平衡和对刺激的反应。生物体通过代谢更新蛋白质、脂质等生物分子,这种新陈更替的过程测定在免标记SRS技术中难以实现。

为此,闵玮课题组<sup>[20]</sup>与黄岩谊课题组<sup>[27]</sup>采用小分子拉曼标记的方式,区分新合成的生物分子与原本的分子,进而完成代谢追踪。目前,他们已经利用氘代、氧基或者炔基等标记的生物分子近似物研究了脂质<sup>[28]</sup>、蛋白质<sup>[65-67]</sup>、糖类<sup>[68-70]</sup>代谢问题,揭示了活细胞中杭丁顿蛋白的聚集形成动力学,如图 5(b)所示,饱和脂肪酸(包括棕榈酸)在内质网膜上诱导相分离,形成固态相,进而造成细胞毒性等众多机制问题,如图 5(c)所示。在此,需要明确的是,拉曼探针的引入已经不属于免标记范畴,但与荧光标记相比,拉曼探针具有高稳定性(无光漂白)、标记物小对目标干扰轻微(信源为化学键)、光谱出峰窄可做超多色复用(荧光光谱重叠)等优势。

## 4.2 组织生物学

组织由细胞群和细胞外基质构成,根据所处的生理环境与执行功能,通常作为病理学的基础。SRS 基于生物组织内源分子振动差异提供衬度,可以直接对新鲜组织快速成像,而且使用脂质、蛋白质双通道成像,得到的双色 SRS 图像与病理金标准 H&E 图片具有高度一致性<sup>[71-72]</sup>。

### 4.2.1 肿瘤切缘

令人闻风丧胆的肿瘤至今是医学界的一大痛点,如今根源的治疗方法还是通过手术切除的形式去除癌变组织。肿瘤手术的关键在于最大限度切除肿瘤的同时,保留邻近的健康组织。若肿瘤部位切除不干净,残留的肿瘤细胞极易引起癌症复发、治疗失败等一系列不良结果。另外,若将正常组织误认为肿瘤而一同切除,则有可能导致发病率增加。因此,精准对肿瘤切缘进行定位,指示手术最大限度安全地切除肿瘤组织至关重要<sup>[73]</sup>。

传统病理检测往往需要活检(或手术)取样、固定、切片、染色等一系列繁杂过程,往往耗时几天,无法实现术中实时诊断。术中冰冻往往也至少需要半个小时,而且由于冰冻切片的伪影,诊断准确率不高。2013年,季敏标等<sup>[17]</sup>在谢晓亮课题组学习期间与合作者利用 SRS 显微镜观察到脑瘤组织的蛋白质与脂质含量具有明显差异,通过蛋白质/脂质的比值参数,可以在 SRS 图像中清晰地鉴别明场显微中毫无特征的肿瘤组织和正常组织分界线,如图 6(a)所示。研究人员在脑胶质瘤小鼠模型活体中原位实时地探测肿瘤边界,展示了 SRS 在术中肿瘤切缘定位的应用,之后在离体人脑肿瘤手术标本中实现了无标记病理诊断<sup>[74]</sup>。此外,季敏标课题

组<sup>[10, 75]</sup>近年来与复旦大学中山医院、复旦大学华山医院等多个医疗单位密切合作,在多个部位肿瘤切缘的探测上做出了卓越的进展,如图 6(b)所示。而他在脑瘤工作时期的合作者 Orringer 等<sup>[76-77]</sup>依旧致力于 SRS 与脑瘤术中诊断的结合,基于光纤激光与平衡探测器将 SRS 显微技术小型化,并成功将其引入手术室中,通过与深度学习神经网络结合,实现了接近术中实时诊断的智能化系统,如图 6(c)所示。国内岳蜀华课题组<sup>[78]</sup>,王平课题组<sup>[15]</sup>充分发挥高光谱 SRS 技术既有图像信息又有光谱信息的优势,对前列腺组织与肝组织中的脂质进行定量统计分析,有望促进前列腺癌、肝癌的诊疗及新型药物靶点的研发,如图 6(d)所示。

### 4.2.2 痛风结晶

痛风是一种由尿酸干扰引起的晶体沉积性疾病,因其发病率和疾病负担的增加而引起临床医生和研究人员越来越多的兴趣。临床上治疗痛风的手段是通过药物或手术去除痛风结晶石(单钠尿酸盐,MSU),所以术中快速准确地检测 MSU 对治疗效果十分重要。而目前的组织学检测与偏光显微镜都缺乏有效的化学特异性。为此,季敏标课题组<sup>[79]</sup>利用 SRS 与二次谐波产生(SHG)双模态成像,评估了两种大鼠模型中各种 MSU 沉积还有人类手术样本,结果表明基于 MSU 和假性痛风(焦磷酸钙, CPPD)在指纹区不同的拉曼峰位,可以实现痛风的早期诊断和鉴别,如图 6(e)所示。

### 4.2.3 乳腺钙化

乳腺钙化被认为是乳腺癌发病的重要指标之一,这些钙质沉积物含有丰富的化学混合物成分(如磷酸盐、草酸盐和碳酸盐)及各种形态(大小、形状和分布),与肿瘤发生、恶性程度密切相关。乳房钼靶 X 射线对钙化的诊断只提供形态学信息,在癌变评估中有所局限。2020年, Fu 课题组<sup>[80]</sup>利用 SRS 对乳腺钙化与肿瘤过程进行定量化学成像,发现钙化中碳酸盐含量与肿瘤恶性程度成负相关。无独有偶,季敏标课题组<sup>[81]</sup>同样使用高光谱 SRS 技术来评估肿瘤恶性程度与多维度信息(形态,光谱)的相关性,通过图像处理与光谱拟合可以分别提取出钙化区域几何形状和纹理等形态学特征及其构成的化学成分,结合支持向量机(SVM)对乳腺病变进行准确分类,如图 6(f)所示。

## 4.3 神经生物学

神经系统在学习、记忆、运动和行为中都起着

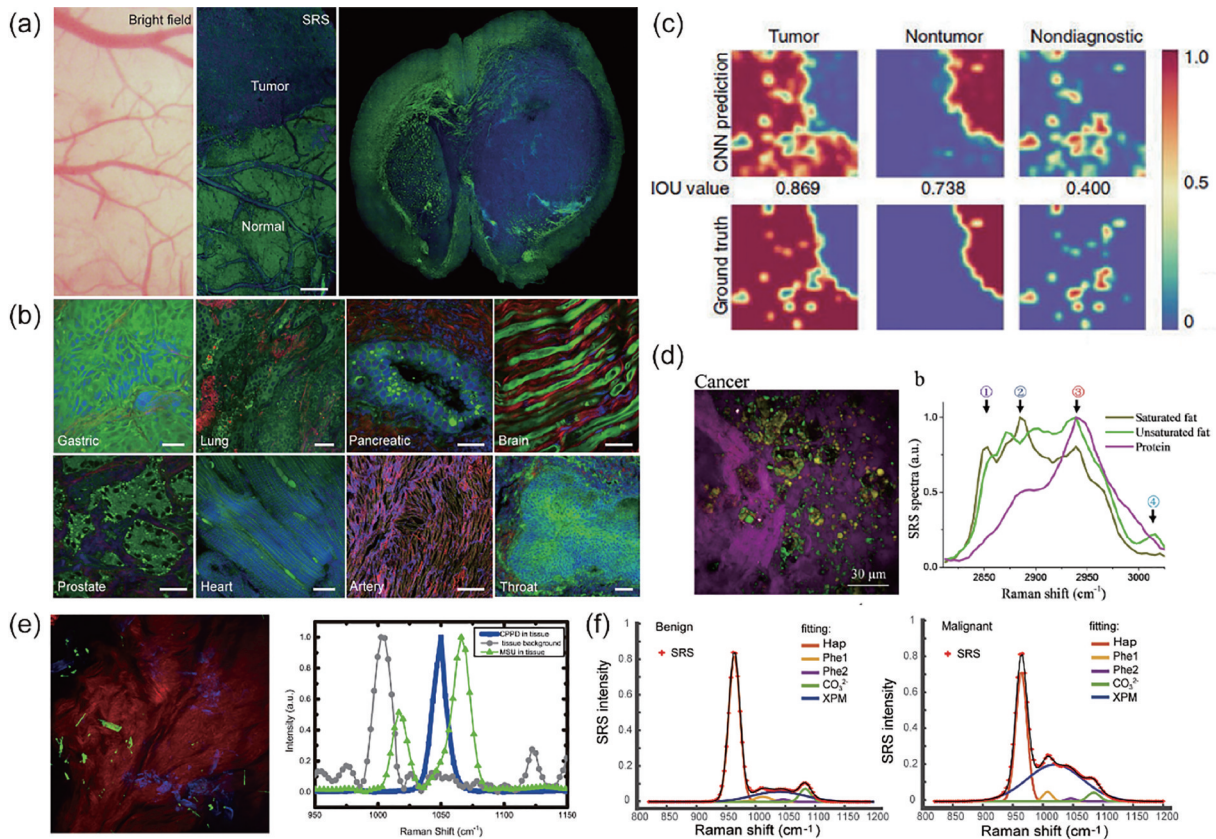


图6 SRS在组织生物学上的代表工作。(a)裸眼以及SRS对同一肿瘤浸润区的观测图片和完整小鼠脑切片的SRS成像<sup>[17]</sup>,标尺为500  $\mu\text{m}$ ; (b)各部位组织的SRS图片,标尺为50  $\mu\text{m}$ ; (c)卷积神经网络(CNN)语义分割技术描绘的脑肿瘤界面<sup>[76]</sup>; (d)高光谱SRS结合光谱信息及图像信息对肝组织中不同化学组分的分析<sup>[15]</sup>,标尺为30  $\mu\text{m}$ ; (e)滑膜组织中MSU(绿色)、DCCP(蓝色)、组织自身(灰色)的SRS图像与光谱<sup>[79]</sup>,标尺为20  $\mu\text{m}$ ; (f)良性钙化与恶性钙化的SRS光谱及其五组分分解谱拟合<sup>[81]</sup>

Fig. 6 Representative works of SRS in tissue biology. (a) Naked eye and SRS observation pictures of the same tumor infiltration area and SRS imaging of intact mouse brain slices<sup>[17]</sup>, scale bar is 500  $\mu\text{m}$ ; (b) SRS pictures of various parts of tissue, scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ; (c) brain-tumor interface delineated by using CNN semantic segmentation<sup>[76]</sup>; (d) hyperspectral SRS combining spectrum information and image information to analysis different chemical components in liver tissue<sup>[15]</sup>, scale bar is 30  $\mu\text{m}$ ; (e) SRS images and spectra of MSU (green), DCCP (blue), and tissue (gray) in synovial tissue<sup>[79]</sup>, scale bar is 20  $\mu\text{m}$ ; (f) SRS spectra of benign calcification and malignant calcification and fitting of its five-group decomposition spectra<sup>[81]</sup>

重要作用。对生理状态和病变退化状态下的神经系统进行研究将有助于形成神经功能的整体图景,并推动揭示神经疾病的产生机制。SRS能够提供内在的化学和空间分辨率,原则上适合于检测与神经系统相关的特征。

#### 4.3.1 生理神经功能

生理状态下,神经系统内聚集着大量神经细胞,有机地构成网络或回路,通过传递、储存和加工信息,产生各种心理活动并控制机体行为。

2017年,Fu等<sup>[14]</sup>报道了基于频率调制的SRS,对乙酰胆碱进行无标记成像,并且直接定量测定了蛙皮胸肌神经肌肉连接处乙酰胆碱的局部浓度,如图7(a)所示,随着SRS灵敏度的进一步提高,有望

为突触活性的体内研究开辟新的途径。在细胞膜电位问题上,程继新课题组<sup>[82-83]</sup>做出了一系列工作,通过费米共振峰的SRS成像,证明了整个神经元的膜电位无标记映射,表明SRS可用于评估神经元兴奋性,进一步实现了多神经元、多位点和长期测量的膜电位无标记评估,如图7(b)所示。

#### 4.3.2 神经退行性疾病

神经退行性疾病包括肌萎缩性侧索硬化(ALS)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、亨廷顿病(HD)等,常伴有分子水平和组织水平的病理改变。

2016年,Tian等<sup>[18]</sup>在症状前ALS小鼠模型的周围神经中发现了聚集的脂类卵形物,并推测这些

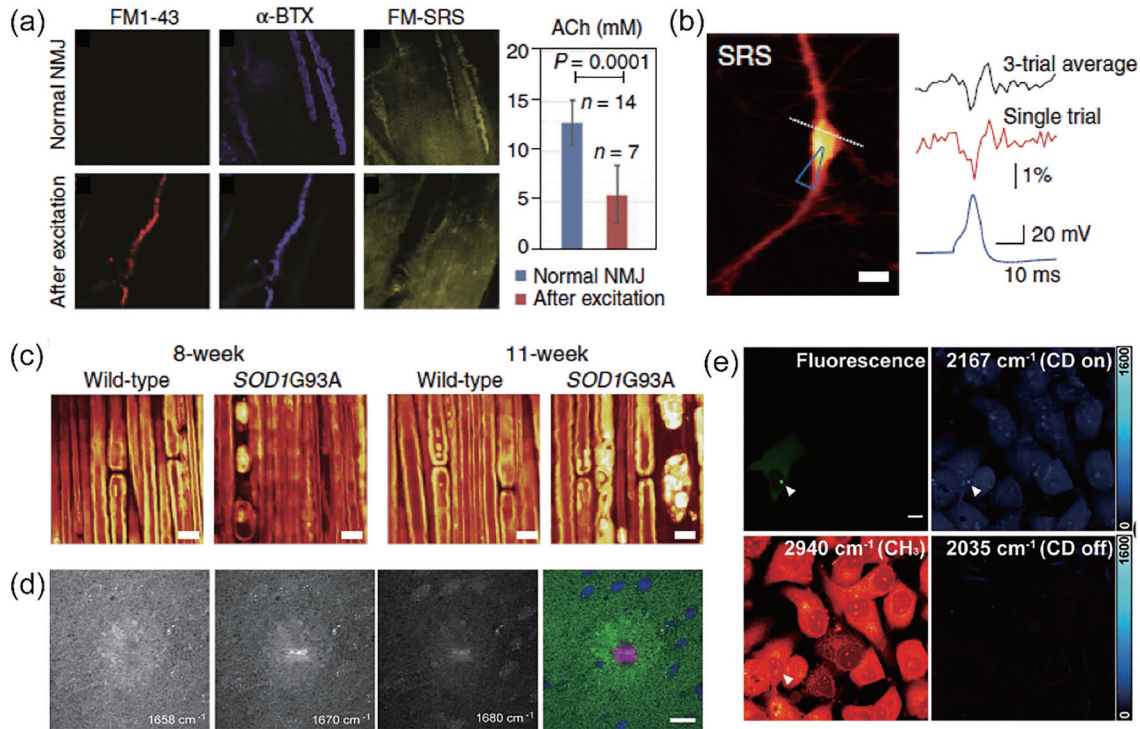


图 7 SRS 在神经生物学上的代表工作。(a) 青蛙皮肤胸肌的神经肌肉连接处进行电刺激后的 SRS 成像显示<sup>[14]</sup>; (b) 通过无标记 SRS 成像, 可以在一个神经元上捕获单个动作电位<sup>[83]</sup>, 标尺为 20  $\mu\text{m}$ ; (c) SRS 模型对 ALS 小鼠周围神经变性的长期活体成像<sup>[18]</sup>, 标尺为 10  $\mu\text{m}$ ; (d)  $\text{A}\beta$  错折叠蛋白的 SRS 探测, 阿尔茨海默小鼠模型的脑切片 SRS 成像<sup>[11]</sup>, 标尺为 30  $\mu\text{m}$ ; (e) 100 nmol/L 格尔德霉素处理 20 h 后, 活细胞中 mHtt-97Q-GFP 聚集物 (白色箭头) 在 2167  $\text{cm}^{-1}$ 、2035  $\text{cm}^{-1}$  和 2940  $\text{cm}^{-1}$  处的荧光 (绿色) 和 SRS 图像<sup>[84]</sup>, 标尺为 10  $\mu\text{m}$

Fig. 7 Representative works of SRS in neurobiology. (a) SRS imaging of neuromuscular junction of frog skin and pectoral muscle after electrical stimulation<sup>[14]</sup>; (b) single action potential can be captured by label-free SRS imaging on a patched neuron<sup>[83]</sup>, scale bar is 20  $\mu\text{m}$ ; (c) long-term *in vivo* imaging of peripheral nerve degeneration in ALS mouse models by SRS model<sup>[18]</sup>, scale bar is 10  $\mu\text{m}$ ; (d) SRS detection of  $\text{A}\beta$  misfolded protein, SRS imaging of brain slices in Alzheimer's mouse model<sup>[11]</sup>, scale is 30  $\mu\text{m}$ ; (e) fluorescence (green) and correlative SRS images of mHtt-97Q-GFP aggregates (white arrow) at 2167  $\text{cm}^{-1}$ , 2035  $\text{cm}^{-1}$ , and 2940  $\text{cm}^{-1}$  in live cells after 100 nmol/L geldanamycin treatment for 20 h<sup>[84]</sup>, scale bar is 10  $\mu\text{m}$

脂类卵形物很可能来自变性的髓鞘细胞, 表明 ALS 症状出现之前小鼠就已经出现了明显的周围神经退行性病变, 如图 7(c) 所示。这与最早的肌肉失神经体征相吻合, 并先于生理上可测量的运动功能衰退, 对疾病的早期筛检具有重要意义。而对于阿尔茨海默病这类出现淀粉样斑块的神疾病而言, 由于斑块中的蛋白质错折叠是二级结构变化所致的, 即从  $\alpha$ -螺旋转变到  $\beta$ -折叠, 多肽主链的酰胺 I 振动带在拉曼光谱上发生蓝移, 因此, 通过在 1658  $\text{cm}^{-1}$  和 1670  $\text{cm}^{-1}$  两个频率处进行 SRS 成像, 解谱之后可以得到正常蛋白质以及  $\text{A}\beta$  淀粉样蛋白两种成分。此外, SRS 成像结果还表明每个斑块似乎都被富含脂质的光晕结构所包围, 如图 7(d) 所示, 这在特定标记的方法中难以发现, 展示了 SRS 在组织层面具有发现新型形态学结构的能力<sup>[11]</sup>。Miao 等<sup>[84]</sup>

还借助氘标记谷氨酰胺 (Gln-d5), 通过 SRS 对亨廷顿病中的 polyQ 聚合体进行活细胞成像、定量分析和光谱分析, 有助揭示 polyQ 聚合体的新特性和机制, 如图 7(e) 所示。

#### 4.4 微生物学

微生物具有种类多、体积小、易变异等多种特点, 越来越多的实验表明微生物在人体肠道菌群、抗生素耐药性和生物材料方面发挥着重要作用并受到越来越多的关注。

2016 年, Ozeki 课题组<sup>[85]</sup> 利用免标记视频速率 SRS 成像技术绘制了不同培养条件下的细胞内代谢物分布, 发现缺氮环境下的活微藻代谢存在明显的异质性, 叶绿素含量降低, 裸藻淀粉和脂质的积累增加, 展示了 SRS 技术对进一步了解微藻巨大的尚未探索的异质性、微藻突变体的筛选和表征以及

高效生物材料工程具有突出的重要性,如图 8(a)所示。此外,SRS 成像也被应用于快速抗菌素敏感性测试(AST)。由于细菌可以利用环境中的重水参与代谢,从而将本源生物分子中的 C—H 键更替为 C—D 键,因此,根据细菌对重水的摄入速率可以表征生命活性。程继新课题组<sup>[86]</sup>表示,利用这种重水标记的方式,在飞秒高速 SRS 助力下在 D<sub>2</sub>O 培养基中培养 10 min 后就可以观察到代谢反应,如图 8(b)所示<sup>[87]</sup>。从样品到药敏试验的总时间约为 2 h,从菌落到获取单细胞代谢失活浓度结果的时间小于

2.5 h。他们还在尿液或全血环境下测定了细菌的代谢活性和敏感性,为临床快速实现单细胞表型 AST 提供了机会。

#### 4.5 药理学

可视化药物并追踪其在生理活动中的进程,对理解它们的结构-分布-功能关系与作用机制很有帮助。使用无标记的方法或使用振动探针标记药物分子,SRS 可以对药物进行成像,进而有利于推动药物的开发与测试<sup>[88]</sup>。基于药物分子自身内在强烈的特异拉曼振动峰,SRS 已经实现药片和植入物

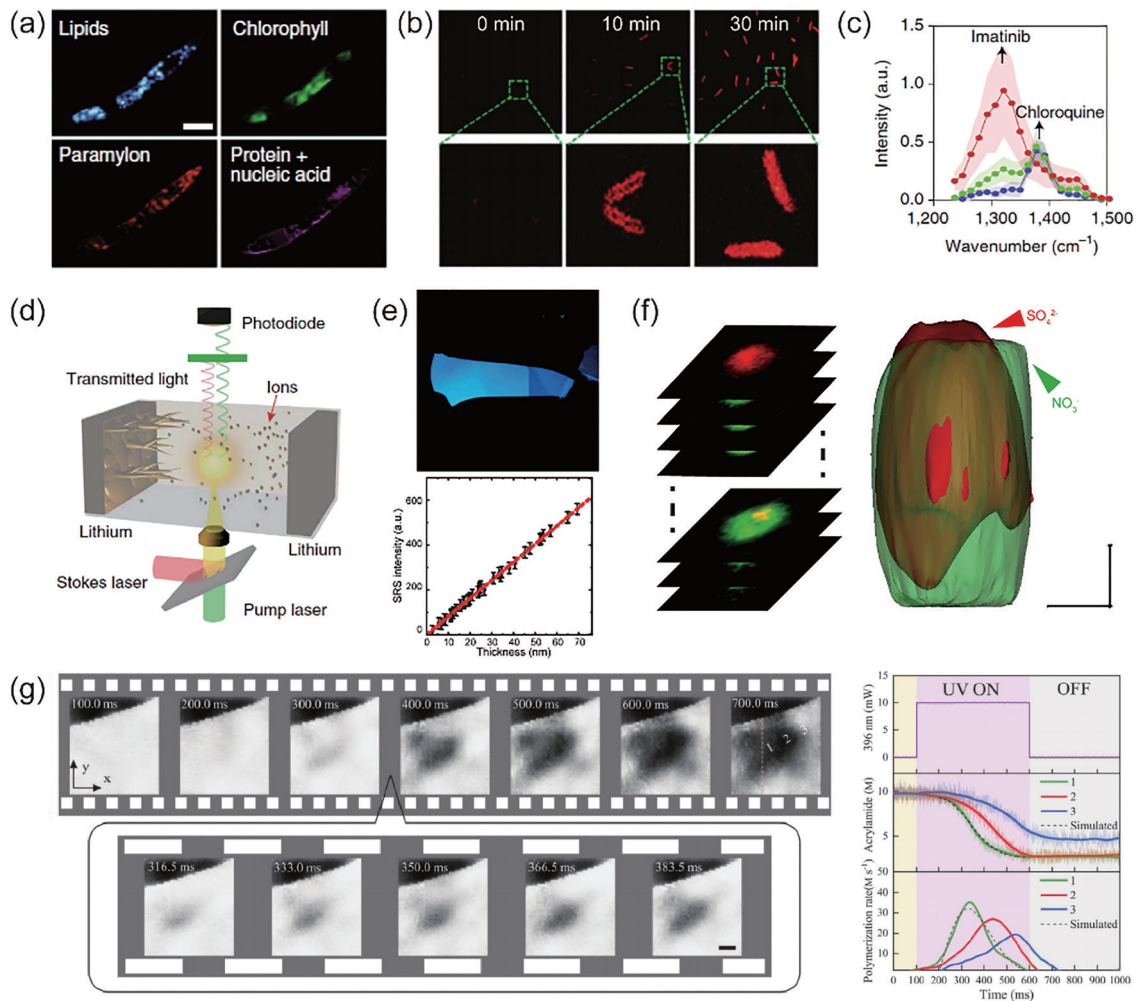


图 8 SRS 在微生物学、药理学、材料科学上的代表工作。(a) 免标记视频速率 SRS 成像显示微藻代谢物的非均匀分布<sup>[85]</sup>, 标尺为 10  $\mu\text{m}$ ; (b) 铜绿假单胞菌在含重水的培养基中培养后的延时 SRS 成像<sup>[87]</sup>; (c) 酪氨酸激酶抑制剂的 SRS 成像<sup>[91]</sup>; (d) SRS 对锂电池的研究示意图<sup>[95]</sup>; (e) SRS 对 h-BN 的成像结果<sup>[96]</sup>; (f) 大气气溶胶的 SRS 三维分析,  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$  两种无机盐的空间构成形态迥异<sup>[97]</sup>, 标尺为 1  $\mu\text{m}$ ; (g) SRS 对丙烯酰胺聚合过程的可视化追踪及聚合速率的动力学曲线<sup>[98]</sup>, 标尺为 5  $\mu\text{m}$

Fig. 8 Representative works of SRS in microbiology, pharmacology, and materials science. (a) Label-free video-rate SRS imaging of heterogeneous distribution of metabolites<sup>[85]</sup>, scale bar is 10  $\mu\text{m}$ ; (b) time-lapse SRS imaging of *P. aeruginosa* after culture in D<sub>2</sub>O containing medium<sup>[87]</sup>; (c) SRS imaging of tyrosine kinase inhibitors<sup>[91]</sup>; (d) schematic illustration of a Li-Li symmetric cell under SRS imaging<sup>[95]</sup>; (e) SRS imaging of h-BN<sup>[96]</sup>; (f) 3D profiling of atmospheric aerosols shows that the spatial composition of  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  inorganic salts is very different<sup>[97]</sup>, scale bar is 1  $\mu\text{m}$ ; (g) visual tracking of acrylamide polymerization process by SRS and kinetic curve of polymerization rate<sup>[98]</sup>, scale bar is 5  $\mu\text{m}$

中药物制剂的成像、农用化学品抗真菌植物的化合物和真皮给药、小分子药物的亚细胞分布成像等应用<sup>[89-90]</sup>。

2014年,闵玮课题组将疔霉舒乳膏涂抹于小鼠耳朵部位,通过对药膏中盐酸特比萘芬分子的焐基进行特异性成像,结合脂质和蛋白通道的共定位,发现了该药物是通过皮肤中脂质进行渗透的。同年,哈佛大学谢晓亮课题组<sup>[91]</sup>利用高光谱受激拉曼散射(hsSRS)成像技术对两种酪氨酸激酶抑制剂(TKI)药物(伊马替尼和尼洛替尼)进行活细胞内的免标记成像和定量分析。他们发现,由于这两种药物具有溶酶体的亲溶性,它们在溶酶体中的浓度都增加了1000倍以上。当同时使用氯喹时,伊马替尼的溶酶体捕获率大为降低,这表明氯喹除了常见的自噬抑制机制外,还可能通过溶酶体介导的药物相互作用提高TKIs的疗效,如图8(c)所示。对于没有特征拉曼振动的药物,可以采用拉曼标记进行SRS成像,提高了灵敏度和特异性,例如闵玮课题组以及Hulme课题组用氘标记的方式分别观察布洛芬和几种药物相关溶剂在皮肤和指甲中的渗透情况<sup>[92-94]</sup>。

#### 4.6 材料科学

20世纪以来,在物理、化学、生物等学科的推动下,人们对物质结构、材料理化性质的认识不断深入。研究材料本质及其演化规律成为现代材料科学发展的重要一环。近来的一些报告体现出,SRS独特的微观显像能力在其中同样能够发挥出重要作用。

2018年,闵玮课题组与Yang课题组<sup>[95]</sup>合作,利用SRS显微镜可视化了电池电解质中离子的传输过程,揭示了锂电沉积存在三个阶段,表明SRS成像在定量捕捉锂表面离子浓度的快速演化、浓度与锂枝晶生长关系上具有应用,如图8(d)所示。以 $E_{2g}$ 波段为基础,季敏标课题组<sup>[96]</sup>利用SRS技术对六方氮化硼(h-BN)进行成像,表明SRS可为70 nm以下的h-BN薄片厚度的定量提供一种快速可靠的方法,有助于对二维材料进行光学表征,如图8(e)所示。之后,他们还单个气溶胶中主要的两种无机盐 $SO_4^{2-}$ 、 $NO_3^-$ 进行分析。通过轴向连续扫描以及三维建模,展示了大气气溶胶中不同颗粒具有不同的组分异质性,两种无机盐的空间构成形态迥异,反映出颗粒在生成过程中具有不同的机制,如图8(f)所示<sup>[97]</sup>。对于普遍使用的聚合物材料,王平

课题组<sup>[98]</sup>利用声光偏转器(acousto-optic deflector)与无锁相电路阵列(lock-in free circuits array),开发了一种基于共线多束的受激拉曼散射显微镜(COMB-SRS),高达每秒2000帧的速率使得它们能够对聚合反应过程进行实时追踪,如图8(g)所示。此外,SRS还为矿物、微塑料的检测提供了有效的技术手段<sup>[99-100]</sup>。

## 5 小 结

SRS显微成像技术自2008年诞生以来,在生命科学领域得到了极大的发展,并逐渐向其他领域拓展<sup>[95-96, 99, 101]</sup>,引起了越来越多的关注。结合微流控技术的高通量、高特异性单细胞筛选也在如火如荼的发展<sup>[102-104]</sup>,向实用化转换的术中可推入式以及手持式SRS系统也在被大力开发<sup>[76-77, 105]</sup>。值得注意的是,由于愈渐严苛的灵敏度和特异性以及其他需求,SRS技术已经不仅局限于免标记的范畴,越来越多的拉曼振动探针被开发并有很大的进展<sup>[47, 106-113]</sup>,探针本身也逐渐从原本惰性向更多样的功能化、活性化发展<sup>[60-62, 113-114]</sup>。但目前探针大多以化学合成分子出现,可遗传编码的拉曼探针可以实现活细胞中对具有遗传特异性的蛋白质和核酸的原位成像<sup>[115]</sup>,将是一大研究方向。可以预见,光谱学和显微技术的不断发展将使SRS成为更强大的平台。大量的拉曼数据也要求发展先进的统计分析工具,如降维和相关性,机器学习领域的火热发展将为此提供可靠的帮扶<sup>[10, 50, 76, 116-117]</sup>。

## 参考文献

- [1] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. Optics Letters, 1982, 7(8): 350-352.
- [2] 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.
- [3] Evans C L, Xie X S. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008, 1(1): 883-909.
- [4] Volkmer A. Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2005, 38(5): R59-R81.
- [5] Evans C L, Potma E O, Puoris'haag M, et al.

- Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(46): 16807-16812.
- [6] Saar B G, Park H S, Xie X S, et al. Three-dimensional imaging of chemical bond orientation in liquid crystals by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. Optics Express, 2007, 15(21): 13585-13596.
- [7] 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): 1857-1861.
- [8] Nandakumar P, Kovalev A, Volkmer A. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy[J]. New Journal of Physics, 2009, 11(3): 033026.
- [9] Ozeki Y, Dake F, Kajiyama S, et al. Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy[J]. Optics Express, 2009, 17(5): 3651-3658.
- [10] Zhang L, Wu Y, Zheng B, et al. Rapid histology of laryngeal squamous cell carcinoma with deep-learning based stimulated Raman scattering microscopy[J]. Theranostics, 2019, 9(9): 2541-2554.
- [11] Ji M, Arbel M, Zhang 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.
- [12] Wang M C, Min W, Freudiger C W, et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy [J]. Nature Methods, 2011, 8(2): 135-138.
- [13] Fu D, Yu Y, Folick A, et al. *In vivo* metabolic fingerprinting of neutral lipids with hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(24): 8820-8828.
- [14] Fu D, Yang W L, Xie X S. Label-free imaging of neurotransmitter acetylcholine at neuromuscular junctions with stimulated Raman scattering[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(2): 583-586.
- [15] Yan S, Cui S, Ke K, et al. Hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy unravels aberrant accumulation of saturated fat in human liver cancer [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(11): 6362-6366.
- [16] Wang P, Liu B, Zhang D, et al. Imaging lipid metabolism in live caenorhabditis elegans using fingerprint vibrations[J]. Angewandte Chemie, 2014, 53(44): 11787-11792.
- [17] Ji M B, Orringer D A, Freudiger C W, et al. Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(201): 201ra119.
- [18] Tian F, Yang W, Mordes D A, et al. Monitoring peripheral nerve degeneration in ALS by label-free stimulated Raman scattering imaging[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13283.
- [19] Chen Z, Paley D W, Wei L, et al. Multicolor live-cell chemical imaging by isotopically edited alkyne vibrational palette[J]. Journal of American Chemical Society, 2014, 136(22): 8027-8033.
- [20] Hong S L, Chen T, Zhu Y T, et al. Live-cell stimulated Raman scattering imaging of alkyne-tagged biomolecules[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(23): 5827-5831.
- [21] Zhang L Y, Min W. Bioorthogonal chemical imaging of metabolic changes during epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by stimulated Raman scattering microscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2017, 22(10): 106010.
- [22] Hu F, Wei L, Zheng C, et al. Live-cell vibrational imaging of choline metabolites by stimulated Raman scattering coupled with isotope-based metabolic labeling[J]. Analyst, 2014, 139(10): 2312-2317.
- [23] Li S, Chen T, Wang Y, et al. Conjugated polymer with intrinsic alkyne units for synergistically enhanced Raman imaging in living cells[J]. Angewandte Chemie, 2017, 56(43): 13455-13458.
- [24] Tian S, Li H, Li Z, et al. Polydiacetylene-based ultrastrong bioorthogonal Raman probes for targeted live-cell Raman imaging[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 81.
- [25] Yamakoshi H, Dodo K, Okada M, et al. Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(16): 6102-6105.
- [26] Yamakoshi H, Dodo K, Palonpon A, et al. Alkyne-tag Raman imaging for visualization of mobile small molecules in live cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(51): 20681-20689.
- [27] Wei L, Hu F, Shen Y, et al. Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering[J]. Nature Methods, 2014, 11(4): 410-412.
- [28] Shen Y, Zhao Z, Zhang L, et al. Metabolic activity

- induces membrane phase separation in endoplasmic reticulum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(51): 13394-13399.
- [29] Hu F, Zeng C, Long R, et al. Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes[J]. Nature Methods, 2018, 15(3): 194-200.
- [30] Wei L, Chen Z, Shi L, et al. Super-multiplex vibrational imaging[J]. Nature, 2017, 544(7651): 465-470.
- [31] Qi Y F, Liu Y H, Liu D M. Research progress on application of Raman spectroscopy in tumor diagnosis [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(22): 220001.  
祁亚峰, 刘宇宏, 刘大猛. 拉曼光谱技术在肿瘤诊断上的应用研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(22): 220001.
- [32] Tuschel D. Exploring resonance Raman spectroscopy [J]. Spectroscopy, 2018, 33(12): 9-12.
- [33] Stiles P L, Dieringer J A, Shah N C, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008, 1(1): 601-626.
- [34] Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering[J]. Science, 2010, 330(6009): 1368-1370.
- [35] Fu D, Holtom G, Freudiger C, et al. Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering by chirped femtosecond lasers[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2013, 117(16): 4634-4640.
- [36] Kong L J, Ji M B, Holtom G R, et al. Multicolor stimulated Raman scattering microscopy with a rapidly tunable optical parametric oscillator[J]. Optics Letters, 2013, 38(2): 145-147.
- [37] Ozeki Y, Umemura W, Otsuka Y, et al. High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering[J]. Nature Photonics, 2012, 6(12): 845-851.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Seto K, Okuda Y, Tokunaga E, et al. Development of a multiplex stimulated Raman microscope for spectral imaging through multi-channel lock-in detection[J]. The Review of Scientific Instruments, 2013, 84(8): 083705.
- [41] Fu D, Lu F K, Zhang X, et al. Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(8): 3623-3626.
- [42] He R Y, Xu Y K, Zhang L L, et al. Dual-phase stimulated Raman scattering microscopy for real-time two-color imaging[J]. Optica, 2016, 4(1): 44-47.
- [43] Zhang B, Sun M, Yang Y, et al. Rapid, large-scale stimulated Raman histology with strip mosaicing and dual-phase detection[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(6): 2604-2613.
- [44] Min W, Freudiger C W, Lu S J, et al. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy[J]. Annual Review of Physical Chemistry, 2011, 62: 507-530.
- [45] Asher S A. UV resonance Raman studies of molecular structure and dynamics: applications in physical and biophysical chemistry[J]. Annual Review of Physical Chemistry, 1988, 39: 537-588.
- [46] Wei L, Min W. Electronic preresonance stimulated Raman scattering microscopy[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2018, 9(15): 4294-4301.
- [47] Shen Y, Hu F, Min W. Raman Imaging of small biomolecules [J]. Annual Review of Biophysics, 2019, 48(1): 347-369.
- [48] Xiong H, Qian N, Miao Y, et al. Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy of visible dyes[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2019, 10(13): 3563-3570.
- [49] Xiong H, Shi L, Wei L, et al. Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy and imaging[J]. Nature Photonics, 2019, 13(6): 412-417.
- [50] Zong C, Premasiri R, Lin H, et al. Plasmon-enhanced stimulated Raman scattering microscopy with single-molecule detection sensitivity[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5318.
- [51] Bi Y, Yang C, Chen Y, et al. Near-resonance enhanced label-free stimulated Raman scattering microscopy with spatial resolution near 130 nm[J]. Light, Science & Applications, 2018, 7: 81.
- [52] Prince R C, Frontiera R R, Potma E O. Stimulated Raman scattering: from bulk to nano[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(7): 5070-5094.
- [53] Kim D, Choi D S, Kwon J, et al. Selective suppression of stimulated Raman scattering with



- another competing stimulated Raman scattering[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2017, 8(24): 6118-6123.
- [54] Silva W R, Graefe C T, Frontiera R R. Toward label-free super-resolution microscopy[J]. ACS Photonics, 2016, 3(1): 79-86.
- [55] Gong L, Wang H F. Suppression of stimulated Raman scattering by an electromagnetically-induced-transparency-like scheme and its application for super-resolution microscopy[J]. Physical Review A, 2015, 92(2): 023828.
- [56] Gong L, Wang H F. Breaking the diffraction limit by saturation in stimulated-Raman-scattering microscopy: a theoretical study[J]. Physical Review A, 2014, 90: 013818.
- [57] Gong L, Zheng W, Ma Y, et al. Saturated stimulated-Raman-scattering microscopy for far-field superresolution vibrational imaging[J]. Physical Review Applied, 2019, 11(3): 034041.
- [58] Xiong H Q, Qian N, Zhao Z, et al. Background-free imaging of chemical bonds by a simple and robust frequency-modulated stimulated Raman scattering microscopy[J]. Optics Express, 2020, 28(10): 15663-15677.
- [59] Xiong H Q, Qian N, Miao Y, et al. Super-resolution vibrational microscopy by stimulated Raman excited fluorescence[J]. Light, Science & Applications, 2021, 10(1): 87.
- [60] Ao J, Fang X, Miao X, et al. Switchable stimulated Raman scattering microscopy with photochromic vibrational probes[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 3089.
- [61] Lee D, Qian C, Wang H, et al. Toward photoswitchable electronic pre-resonance stimulated Raman probes[J]. The Journal of Chemical Physics, 2021, 154(13): 135102.
- [62] Shou J W, Ozeki Y. Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy[J]. Optics Letters, 2021, 46(9): 2176-2179.
- [63] Lu F K, Basu S, Igras V, et al. Label-free DNA imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering microscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(37): 11624-11629.
- [64] Zhang X, Roeffaers M B, Basu S, et al. Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy[J]. Chemphyschem, 2012, 13(4): 1054-1059.
- [65] Wei L, Shen Y, 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.
- [66] Wei L, Yu Y, Shen Y, 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.
- [67] Shen Y H, Xu F, Wei L, et al. Live-cell quantitative imaging of proteome degradation by stimulated Raman scattering[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(22): 5596-5599.
- [68] Hu F, Chen Z, Zhang L, et al. Vibrational imaging of glucose uptake activity in live cells and tissues by stimulated Raman scattering[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2015, 54(34): 9821-9825.
- [69] Long R, Zhang L, Shi L, et al. Two-color vibrational imaging of glucose metabolism using stimulated Raman scattering[J]. Chemical Communications, 2018, 54(2): 152-155.
- [70] Zhang L, Shi L, Shen Y, et al. Spectral tracing of deuterium for imaging glucose metabolism[J]. Nature Biomedical Engineering, 2019, 3(5): 402-413.
- [71] Li Z L, Li S W, Zhang S L, et al. Coherent Raman scattering microscopy technique and its biomedical applications[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207005.
- 李姿霖, 李少伟, 张思鹭, 等. 相干拉曼散射显微技术及其在生物医学领域的应用[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207005.
- [72] Zhang B H, Guo L, Yao L, et al. Rapid histological imaging using stimulated Raman scattering microscopy[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207018.
- 张博涵, 郭莉, 姚冽, 等. 受激拉曼散射显微技术用于快速无标记病理成像[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207018.
- [73] Bentley J N, Ji M B, Xie X S, et al. Real-time image guidance for brain tumor surgery through stimulated Raman scattering microscopy[J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2014, 14(4): 359-361.
- [74] Ji M, Lewis S, Camelo-Piragua S, et al. Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy[J]. Science Translational Medicine, 2015, 7(309): aab0195.
- [75] Yang Y F, Chen L C, Ji M B. Stimulated Raman scattering microscopy for rapid brain tumor histology[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences,

- 2017, 10(5): 1730010.
- [76] Hollon T C, Pandian B, Adapa A R, et al. Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks [J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(1): 52-58.
- [77] Orringer D A, Pandian B, Niknafs Y S, et al. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 0027.
- [78] Yue S H, Li J J, Lee S Y, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness [J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(3): 393-406.
- [79] Zhang B, Xu H, 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.
- [80] Shin K S, Laohajaratsang M, Men S Q, et al. Quantitative chemical imaging of breast calcifications in association with neoplastic processes[J]. *Theranostics*, 2020, 10(13): 5865-5878.
- [81] Yang Y, Yang Y, Liu Z, et al. Microcalcification-based tumor malignancy evaluation in fresh breast biopsies with hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(15): 6223-6231.
- [82] Lee H J, Jiang Y, Cheng J X. Label-free optical imaging of membrane potential[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2019, 12: 118-125.
- [83] Lee H J, Zhang D L, Jiang Y, et al. Label-free vibrational spectroscopic imaging of neuronal membrane potential[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2017, 8(9): 1932-1936.
- [84] Miao K, Wei L. Live-cell imaging and quantification of PolyQ aggregates by stimulated Raman scattering of selective deuterium labeling[J]. *ACS Central Science*, 2020, 6(4): 478-486.
- [85] Wakisaka Y, Suzuki Y, Iwata O, et al. Probing the metabolic heterogeneity of live *Euglena gracilis* with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(10): 16124.
- [86] Hong W L, Karanja C W, Abutaleb N S, et al. Antibiotic susceptibility determination within one cell cycle at single-bacterium level by stimulated Raman metabolic imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(6): 3737-3743.
- [87] Zhang M, Hong W, Abutaleb N S, et al. Rapid determination of antimicrobial susceptibility by stimulated Raman scattering imaging of D<sub>2</sub>O metabolic incorporation in a single bacterium[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(19): 2001452.
- [88] Tipping W J, Lee M, Serrels A, et al. Stimulated Raman scattering microscopy: an emerging tool for drug discovery[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(8): 2075-2089.
- [89] Slipchenko M N, Chen H T, Ely D R, et al. Vibrational imaging of tablets by epi-detected stimulated Raman scattering microscopy[J]. *The Analyst*, 2010, 135(10): 2613-2619.
- [90] Francis A, Nguyen T T, Lamm M S, et al. *In situ* stimulated Raman scattering (SRS) microscopy study of the dissolution of sustained-release implant formulation[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15(12): 5793-5801.
- [91] Fu D, Zhou J, Zhu W S, et al. Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(7): 614-622.
- [92] Tipping W J, Lee M, Serrels A, et al. Imaging drug uptake by bioorthogonal stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(8): 5606-5615.
- [93] Seidel J, Miao Y P, Porterfield W, et al. Structure-activity-distribution relationship study of anti-cancer antimycin-type depsipeptides[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(63): 9379-9382.
- [94] Gaschler M M, Hu F, Feng H, et al. Determination of the subcellular localization and mechanism of action of ferrostatins in suppressing ferroptosis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(4): 1013-1020.
- [95] Cheng Q, Wei L, Liu Z, et al. Operando and three-dimensional visualization of anion depletion and lithium growth by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2942.
- [96] Ling J, Miao X, Sun Y, et al. Vibrational imaging and quantification of two-dimensional hexagonal boron nitride with stimulated Raman scattering[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(12): 14033-14040.
- [97] Ao J P, Feng Y Q, Wu S M, et al. Rapid, 3D chemical profiling of individual atmospheric aerosols with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Small Methods*, 2020, 4(2): 1900600.
- [98] Li H Z, Cheng Y, Tang H J, et al. Imaging

- chemical kinetics of radical polymerization with an ultrafast coherent Raman microscope[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(10): 1903644.
- [99] Zada L, Leslie H A, Vethaak A D, et al. Fast microplastics identification with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2018, 49(7): 1136-1144.
- [100] Houle M A, Burruss R C, Ridsdale A, et al. Rapid 3D chemical-specific imaging of minerals using stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2017, 48(5): 726-735.
- [101] Qi J, Li J, Liu R H, et al. Boosting fluorescence-photoacoustic-Raman properties in one fluorophore for precise cancer surgery[J]. *Chem*, 2019, 5(10): 2657-2677.
- [102] Nitta N, Iino T, Isozaki A, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3452.
- [103] Suzuki Y, Kobayashi K, Wakisaka Y, et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(32): 15842-15848.
- [104] Hiramatsu K, Ideguchi T, Yonamine Y, et al. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry[J]. *Science Advances*, 2019, 5(1): eaau0241.
- [105] Liao C S, Wang P, Huang C Y, et al. *In vivo* and *in situ* spectroscopic imaging by a handheld stimulated Raman scattering microscope[J]. *ACS Photonics*, 2018, 5(3): 947-954.
- [106] Miao Y, Qian N, Shi L, et al. 9-cyanopyronin probe palette for super-multiplexed vibrational imaging [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4518.
- [107] Hu F H, Brucks S D, Lambert T H, et al. Stimulated Raman scattering of polymer nanoparticles for multiplexed live-cell imaging[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(46): 6187-6190.
- [108] Hu F, Shi L, Min W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 830-842.
- [109] Miao Y, Shi L, Hu F, et al. Probe design for super-multiplexed vibrational imaging[J]. *Physical Biology*, 2019, 16(4): 041003.
- [110] Zeng C, Hu F H, Long R, et al. A ratiometric Raman probe for live-cell imaging of hydrogen sulfide in mitochondria by stimulated Raman scattering[J]. *The Analyst*, 2018, 143(20): 4844-4848.
- [111] Li X, Jiang M, Lam J W Y, et al. Mitochondrial imaging with combined fluorescence and stimulated Raman scattering microscopy using a probe of the aggregation-induced emission characteristic[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(47): 17022-17030.
- [112] Wilson L T, Tipping W J, Jamieson L E, et al. A new class of ratiometric small molecule intracellular pH sensors for Raman microscopy[J]. *The Analyst*, 2020, 145(15): 5289-5298.
- [113] Fujioka H, Shou J W, Kojima R, et al. Multicolor activatable Raman probes for simultaneous detection of plural enzyme activities[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(49): 20701-20707.
- [114] Wilson L T, Tipping W J, Wetherill C, et al. Mitokyne: a ratiometric Raman probe for mitochondrial pH [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(37): 12786-12792.
- [115] Zhang J, Yan S, He Z, et al. Small unnatural amino acid carried Raman tag for molecular imaging of genetically targeted proteins[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2018, 9(16): 4679-4685.
- [116] Manifold B, Thomas E, Francis A T, et al. Denoising of stimulated Raman scattering microscopy images via deep learning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(8): 3860-3874.
- [117] Zhang J, Zhao J, Lin H N, et al. High-speed chemical imaging by dense-net learning of femtosecond stimulated Raman scattering[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11(20): 8573-8578.