

近红外二区激发多光子荧光成像

王少伟^{1,2}, 雷铭^{1,2*}¹西安交通大学物理学院教育部物质非平衡合成与调控重点实验室, 陕西 西安 710049;²西安交通大学物理学院陕西省量子信息与光电量子器件重点实验室, 陕西 西安 710049

摘要 基于近红外光激发的多光子吸收效应的多光子荧光成像以特有的深穿透、高时空分辨、高信噪比和低毒性等优点, 在生物成像, 尤其是在活体深层组织成像中被广泛应用。相比传统单光子生物成像中使用的紫外可见光光源, 近红外光的引入极大地提高了多光子荧光成像的穿透深度。近些年来, 位于近红外二区(1000~1700 nm)的光源由于在生物组织中具有更小散射和更大的穿透能力, 在单光子和多光子荧光成像中均受到广泛关注和研究, 进一步提高了生物成像的深度。介绍了多光子荧光成像的基本原理和近红外光在生物组织中的特性, 讨论了近红外二区光源激发下的多光子荧光成像的研究进展, 最后总结分析了这一先进成像技术的未来发展和挑战。

关键词 多光子荧光; 近红外二区; 深组织成像; 双光子; 三光子

中图分类号 O437; Q631 文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617002

Near Infrared-II Excited Multiphoton Fluorescence Imaging

Wang Shaowei^{1,2}, Lei Ming^{1,2*}

¹Key Laboratory of Nonequilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Ministry of Education, School of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

²Shaanxi Province Key Laboratory of Quantum Information and Quantum Optoelectronic Devices, School of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

Abstract Multiphoton fluorescence imaging, which uses near-infrared light excited multiphoton absorption process, has been widely applied in biological imaging, especially in *in vivo* deep-tissue imaging due to its deep penetration, high spatiotemporal resolution, high signal-to-noise ratio, and low phototoxicity. Compared with UV-vis light used in traditional one-photon bioimaging, near-infrared light greatly improved the penetration depth of multiphoton fluorescence imaging. Recently, the light in near infrared-II region (1000–1700 nm) has attracted tremendous attention in one-photon and multiphoton fluorescence imaging, which further improves the imaging depth due to its lower scattering and better penetration capability in biological tissues. In this review, we introduce the mechanism of multiphoton fluorescence imaging and the properties of near-infrared light in biological tissues. Furthermore, we introduce and discuss recent advances in near infrared-II light excited multiphoton fluorescence imaging. Finally, we present challenges facing this technique and future developments.

Key words multiphoton fluorescence; near infrared-II; deep-tissue imaging; two-photon; three-photon

1 引言

荧光显微成像技术极大地推动了生物科学和

医学的发展^[1]。通过荧光染料标记, 荧光显微镜可实现对细胞和亚细胞结构的高分辨成像。受限于离焦背景噪声的影响, 通过将激光聚焦在焦平

收稿日期: 2022-01-06; 修回日期: 2022-01-17; 录用日期: 2022-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(62135003, 61905189, 62005208)、陕西省创新能力支撑计划(2021TD-57)

通信作者: *ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

面,同时增加针孔来过滤离焦信号的激光扫描共聚焦荧光显微镜被开发出来并在细胞生物成像领域得到广泛应用^[2]。共聚焦显微镜提高了成像的信噪比和灵敏度,同时具有了一定的光学层析成像能力,进一步扩展了荧光显微成像技术在高分辨活细胞和组织成像中的应用。然而,共聚焦显微镜依然存在一定的局限性,由于其激发光源主要集中在紫外可见光范围,生物结构对此波段的光源有较强的吸收能力,共聚焦显微镜很难实现对深层组织的成像。目前共聚焦显微镜的应用主要集中于体外培养的活细胞成像以及一些固定组织浅层区域的成像。

为了能够对活体深层组织实现快速的、具有细胞分辨能力的三维功能成像,Denk等^[3]于1990年将多光子吸收效应引入到激光扫描显微成像技术中,发明了双光子激光扫描显微镜,从此多光子荧光成像技术在活体生物结构和功能成像中得到快速发展。在生物样品中,通过使染料分子吸收多个近红外光子而被激发后发射荧光,多光子荧光成像技术可以实现深层组织的三维成像^[4]。这是由于近红外光具有较好的生物组织穿透能力,同时多光子吸收是一种非线性光学效应,只发生在样品中激发光高度聚焦的微小区域,所以其拥有了固有的(天生的)三维层析成像能力^[5]。根据吸收光子数的不同,目前最为常见的是双光子和三光子荧光成像技术。染料分子吸收多个光子后被激发的过程中,所需能量与其吸收一个光子后被激发(单光子激发)的能量接近,故而对同一个分子而言,三光子成像的激发光波长要长于双光子。经过三十年的发展,各种各样的多光子荧光成像技术被开发出来^[5],并成功应用到了大深度、高分辨的活体生物成像中,尤其是脑结构和功能成像的研究中^[6-9]。随着激光技术、超灵敏探测技术以及荧光探针的不断发展,多光子荧光成像技术也在朝着更快、更大视场、更高分辨率和更大深度的成像方向发展^[10]。和共聚焦显微镜相比,多光子荧光显微镜的最显著的一个优势是它所利用的近红外光作为激发光源,成像深度远高于共聚焦显微镜。

本文将围绕深层组织成像,介绍多光子荧光成像技术的基本原理和系统,介绍近红外光源在生物组织中的传播特性,讨论和分析近些年来近红外二区光源在多光子成像中的发展和研究进展。

2 多光子荧光成像原理和系统

在单光子荧光成像中,一个荧光染料分子被激发光辐照时吸收一个光子后从基态(S_0)激发到激发态(第一激发态 S_1),经过内部转换(IC)之后从激发态回到基态,同时以荧光发射的形式释放能量^[1]。在这个过程中,由于有能量的损耗,发射的单光子荧光的能量要小于激发光的能量,故其波长要长于激发光,如图1(a)所示。如果染料分子在非常短的时间内吸收两个光子(双光子吸收)或者三个光子(三光子吸收),并且吸收的多个光子的能量之和接近于其吸收单个光子后被激发所需要的能量,染料分子同样会被激发,而后发射荧光,这就是多光子激发荧光的过程^[4]。一般而言,单光子激发荧光中的光波段主要是紫外可见光,所以在多光子激发中,根据能量关系激发光将红移至近红外波段。双光子吸收的理论概念是德裔美国物理学家玛丽亚·格佩特-梅耶(Maria Göppert-Mayer)^[11]于1931年在她的博士论文中提出的,为了纪念她在双光子吸收领域所做贡献,双光子吸收截面的单位被命名为GM。玛丽亚·格佩特-梅耶因在原子核结构模型所做贡献获得了1963年的诺贝尔物理学奖。到1960年,激光器被发明出来后双光子吸收在实验上被验证,但是直到1990年第一台双光子荧光显微镜才被美国康奈尔大学的Denk、Strickler和Webb^[3]开发出来。使一个染料分子在非常短的时间内吸收两个或者更多光子并不容易,或者说概率很低,需要对激发光在时间和空间上进行压缩。实现双光子激发所需的光子数密度大约是单光子激发的一百万倍^[12]。为了产生足够的光子密度来实现多光子吸收就需要高能量的激光,但是这也可能给生物组织带来光热损伤^[13]。所以在多光子荧光成像中一般使用的是超短脉冲激光,其具有很高的单脉冲峰值功率以实现高效的多光子吸收,同时较低的平均功率可以确保可控的光毒性和热损伤^[14]。目前在多光子荧光显微镜中使用最广泛的是技术成熟、可靠性高的钛蓝宝石(Ti:Sapphire)飞秒脉冲激光器。它具有可调谐的近红外光波段(690~1040 nm),可以对很多在紫外可见光波段有吸收的荧光染料实现双光子激发。它的脉冲宽度一般在100 fs左右,同时具有高达数瓦的平均功率,可以应用于常见的多光子活体荧光成像^[15]。

荧光的单光子激发是一个线性的过程,而荧光

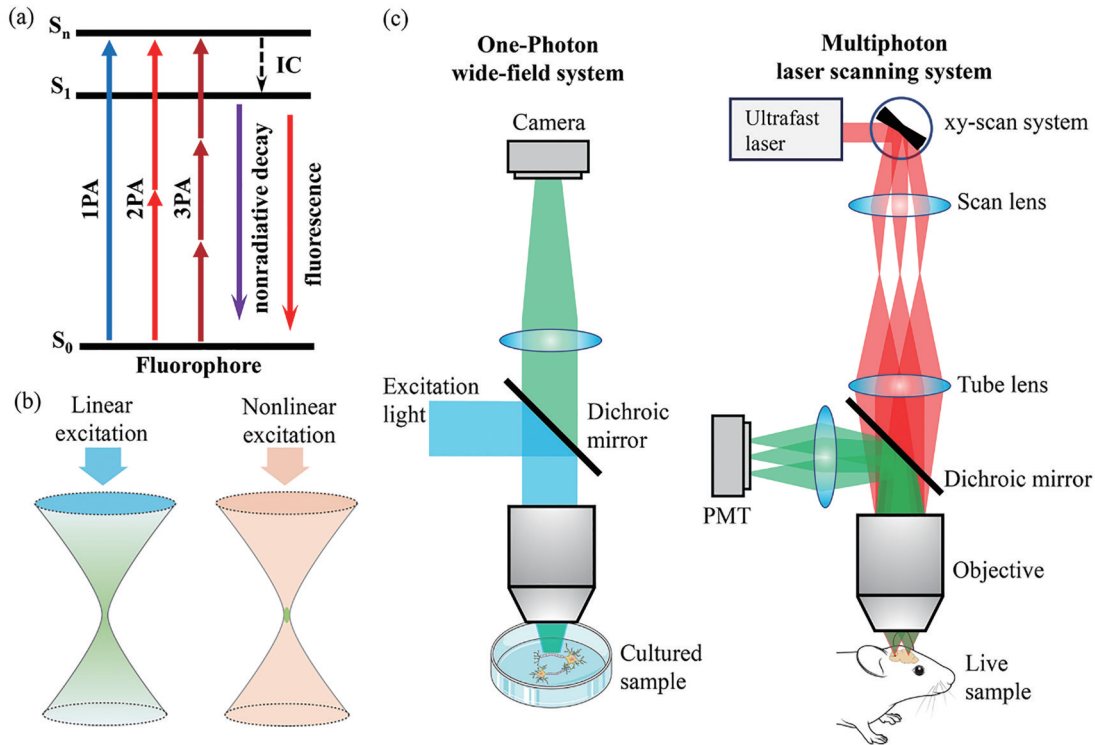


图 1 多光子荧光成像原理与系统。(a) 荧光团在吸收单光子、双光子和三光子后被激发产生荧光的 Jablonski 能级示意图; (b) 线性和非线性激发下的荧光信号空间分布^[4]; (c) 单光子宽场显微成像系统和多光子激光扫描显微成像系统示意图^[27]

Fig. 1 Mechanism and system of multiphoton fluorescence imaging. (a) Schematic of Jablonski energy level in which the fluorophore is excited to produce fluorescence after absorbing single photon, two photons, and three photons; (b) spatial distributions of fluorescence intensity under linear excitation and nonlinear excitation^[4]; (c) schematic of one-photon wide-field microscopy system and multiphoton laser scanning microscopy system^[27]

的多光子激发是一个非线性的过程。双光子吸收激发出的荧光强度与其激发光强度的二次方成正比,而三光子吸收则对应的是三次方成正比关系。正是由于多光子的激发过程需要高的光子密度,一般而言需要聚焦飞秒脉冲激光使得聚焦点处有足够高的光子能量来实现多光子吸收,因此,只有在聚焦点处才会产生多光子荧光。对于单光子吸收来说,激发光聚焦点处会有最强的荧光发射,但是在激发光所经过的路径上也会产生单光子激发而发射的荧光,如图 1(b)所示^[4]。这种特点也是单光子荧光成像和多光子荧光成像最主要的区别之一。由于只在聚焦点处激发出荧光,多光子荧光成像克服了离焦信号带来的干扰,在激光扫描模式下具有了固有的三维层析成像的能力。而在单光子荧光成像中,为了降低离焦荧光信号对焦平面图像的影响,需要添加一个针孔(pinhole)来过滤掉离焦信号,这就是共聚焦显微镜的原理^[2]。虽然针孔可以有效提升图像的信噪比,但是针孔的大小也会影响焦面处荧光信号的采集,同时紫外可见光激发光源

也限制了成像的深度。因此共聚焦显微镜主要应用在活细胞成像方面。而多光子显微镜所固有的三维层析成像能力和近红外光激发能力在生物活体大深度成像中具有不可比拟的优势。

图 1(c)展示了单光子激发模式下的宽场荧光成像系统和激光扫描多光子荧光成像系统。一台多光子荧光显微镜主要包括激发光源、扫描模块、物镜和探测器^[4-5, 16]。光源部分将在下一部分介绍。和宽场荧光显微镜的不同之一就是激光扫描模块^[17],最早的多光子荧光显微镜也是将多光子激发光引入到激光扫描显微镜中设计出来的^[3]。多光子吸收发生在聚焦点处,通过扫描模块沿 XY 方向扫描聚焦激光,可以得到一个二维的由众多单个像素点所构成的图像^[18],进而在 Z 方向上得到不同层面的二维图形,通过重构即可得到三维图像。目前使用最多的扫描模块是由电驱动的振镜扫描仪(galvanometric mirror),通过电机改变镜子的角度来控制激光束,使两个镜子分别实现沿 X 和 Y 方向上的扫描,由此可以对二维平面上任意形状进行扫

描成像^[19]。虽然振镜扫描仪使用广泛,但是由于电机在反复加速减速过程中易产生热量,限制了镜子的移动速度,进而限制了扫描成像的速度。近些年出现的共振扫描仪(resonant galvanometric mirror)克服了振镜扫描仪速度慢的缺点,它的镜子在一个固定的频率转动或者振荡,在这种高速共振频率下扫描激光束可以实现比振镜扫描更快的成像。但是需要注意的是,扫描速度快也意味着在单个像素点上激发光的照射时间变短,使得发射出的多光子荧光信号减少,这在一定程度上也会影响成像的质量。因此在成像信噪比与速度上也需要找到平衡点,许多商业化的多光子显微镜同时配备了振镜和共振扫描模块,以满足不同的应用需求。大部分用于活体成像的多光子荧光显微镜都是正置显微镜,因为物镜下可以设计有较大的空间来放置生物样本(小鼠)。物镜在正置多光子显微镜中的作用是聚焦激发光束并且收集荧光信号。物镜的数值孔径一般决定了其可以收集到的荧光信号的角度,也就决定了成像的视场大小。同时多光子成像的理论分辨率也是由数值孔径和所使用的激发光波长决定的。数值孔径越大,成像的分辨率越高,视场也随之增大。但是数值孔径的增大会降低物镜的工作距离,对于大深度成像来说是不利的。一般而言,常用的双光子专用物镜的数值孔径为1,工作距离为2 mm,放大倍数为20~30倍。除此之外,在多光子成像过程中使用物镜时也需要考虑近红外光的穿透率,以减小激发光源的损耗^[20]。目前日本奥林巴斯和尼康均有专门为多光子荧光成像设计的物镜。其中奥林巴斯的XLPLN25XWMP2(25×, NA为1.05,工作距离为2 mm,水镜)和尼康的CFI75 Apo 25XC W(25×, NA为1.1,工作距离为2 mm,水镜)是当前在商业化多光子显微镜中使用比较普遍的主要用于活体(在体)多光子荧光成像的镜头。针对其他不同的应用场景,也有工作距离更大的物镜,例如奥林巴斯的XLPLN25XSVM P2(工作距离为4 mm)和XLSLPLN25XSVM P2(工作距离为8 mm),适合于活体成像和透明化的生物组织成像。在物镜倍数层面,奥林巴斯的双光子镜头主要是25×和10×,而尼康的物镜倍数选择性更多,除了25×、10×以外,还有60×(CFI SR Plan Apo IR 60XC WI)、40×(CFI Apo NIR 40X W)、16×(CFI75 LWD 16X W)等。两家公司也有专门针对更长波近红外光源的定制双光子物镜,例如奥林

巴斯的XLPLN25XWMP2-SP1700(25×, NA为1.05,工作距离为2 mm,水镜)具有特殊镀膜,增强了近红外光的穿透性,适合于1700 nm波段激发光源的多光子成像。尼康的CFI75 Apo 25XC W 1300(25×, NA为1.1,工作距离为2 mm,水镜)是专门为1300 nm波段设计的物镜。在多光子显微镜中使用的探测器主要是可实现单像素(single-pixel)探测的光电倍增管(PMT)^[21]。光电倍增管灵敏度高,增益大,光敏区域大,量子效率也比较高,响应速度快,暗电流小,非常适合对微弱的多光子荧光信号进行采集。目前商用的超灵敏GaAsP(Gallium-Arsenide-Phosphide)PMT(例如日本滨松的H7422系列PMT)量子效率可高达40%。PMT在紫外可见光波段的量子效率高,但是在近红外波段探测效率较低。雪崩光电二极管(APD)也可实现单像素的弱光信号探测,响应光谱宽,在近红外波段也有较好表现,量子效率最高可达80%,它的缺点是敏感区域较小,对于较大范围的散射荧光的信号收集不利^[22]。近些年来发展的硅光电倍增器(SiPM)也是一种高性能的单光子探测器^[23]。SiPM是由多个像素相互并联的APD阵列组成的,因此在同一时间可以探测更多的光子,相比于容易饱和的PMT,它具有更好的单光子分辨能力。但是它的缺点是暗电流要比PMT高,量子效率也低于PMT^[22]。在激光扫描多光子显微成像中,由于多光子荧光产生的光子速率较低,所以具有高增益和低暗电流的PMT在光子探测中更具有优势。目前APD和SiPM还没有在多光子荧光显微镜中被广泛使用,但是随着对多光子成像技术的要求不断提高,新型的单光子探测器将在更高速、更高信噪比和更大深度的成像中发挥作用^[24-26]。在荧光的探测中,激光扫描共聚焦显微镜需要保证激发光和荧光在相同的路径中,以确保探测器像素点接收的信号是焦面信号。这对光路设计提出了更高要求,并且在实际的光学系统中,发射出的荧光信号在经过镜头、反射镜等光学元件后总会发生散射等,引起焦面信号丢失或者离焦信号的干扰。而多光子显微镜中由于所有的荧光信号均来自焦面,所以不需要考虑离焦信号和焦面信号被散射导致的信号丢失的影响。这些来自焦面的多光子荧光信号也不需要经过与激发光相同的路径,这样只要将光电倍增管放置在物镜后的任何位置都可以实现信号采集。这种特点的好处是降低了荧光信号在光学系统中

传播带来的损失,缩短荧光传递路径,提高了对散射荧光的收集效率。

3 多光子荧光成像的光源

无论是单光子还是多光子成像,激发光与出射荧光和生物样品(细胞和组织)的相互作用都会影响最终成像的分辨率、深度以及信噪比。尤其在活体生物组织的成像中,激发光源入射组织即会与组织发生相互作用,包括表面的反射、组织内部对激发光源的散射和吸收等^[28],这些过程会造成激发光的损耗衰减,使得最终到达组织内部成像对象处的用于荧光激发的光能量减小,直接限制了最终的成

像深度,如图 2(a)所示。而对于深层组织处的荧光染料标记的成像对象来说,出射的荧光同样面临这些可能的损耗。所以在荧光成像中光在生物组织中的传播特性对成像效果至关重要。光在组织中的吸收和散射效应是影响其传播的最主要的因素。如图 2(b)所示,血红蛋白是脊椎动物体内一种非常重要的蛋白,在血液循环中用来运输氧分子,氧合与脱氧血红蛋白在可见光波段具有非常强的吸收^[28],在 $<600\text{ nm}$ 附近有吸收峰,所以其呈现红色。而它们在 $>700\text{ nm}$ 近红外光波段的吸收能力却很小。除了血红蛋白之外,生物体内也有很多其他的分子,例如黑色素(melanin)、芳香族氨基酸残基、还

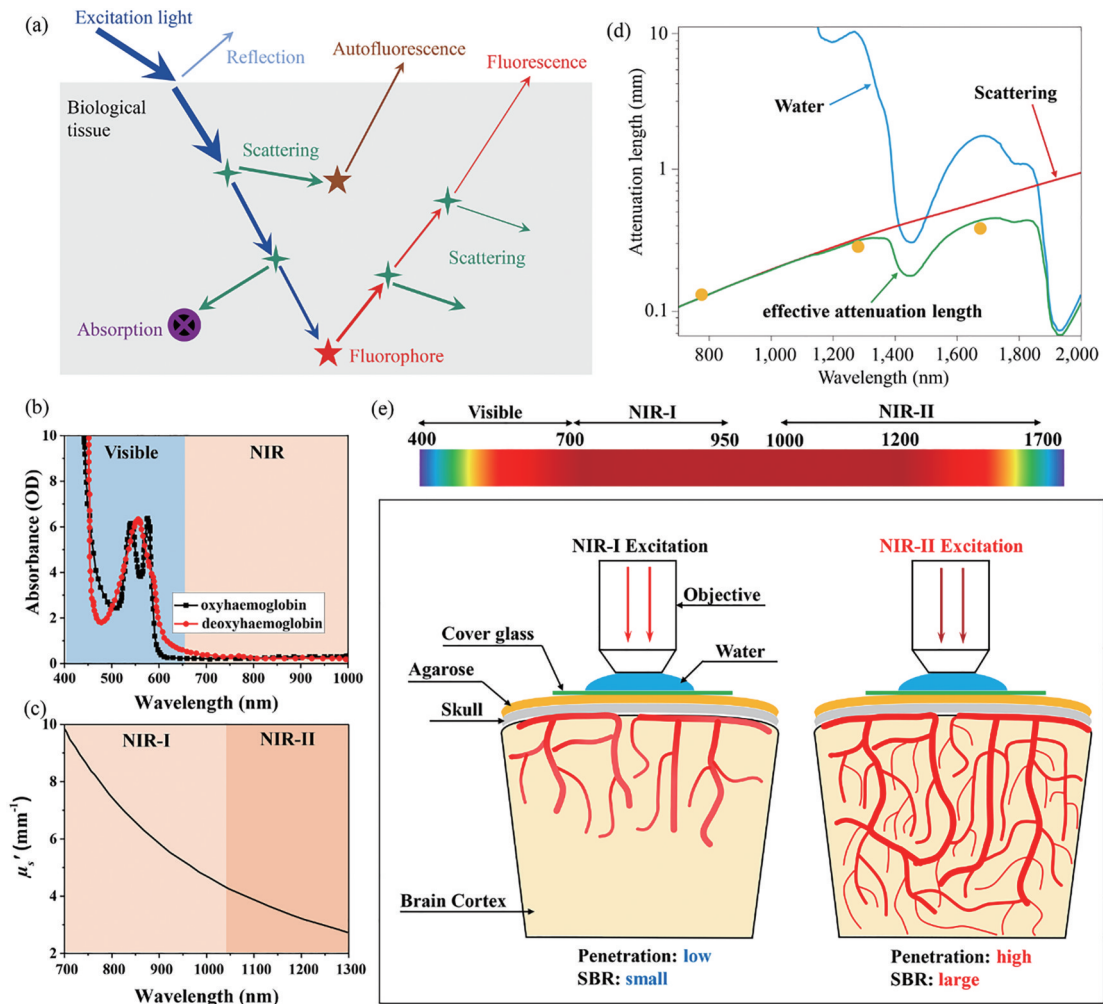


图 2 近红外光源在生物组织中的特性。(a)激发光与生物组织的作用^[28];(b)氧合和脱氧血红蛋白在可见光与近红外光波段的吸收光谱^[28];(c)近红外光在脑组织中的散射系数^[28];(d)光在脑组织中的衰减长度^[29];(e)近红外一区和二区激发下的活体多光子脑成像示意图^[48]

Fig. 2 Properties of NIR light in biological tissues. (a) Interactions of excitation light with tissues^[28]; (b) absorption spectra of oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin in visible and near-infrared bands^[28]; (c) scattering coefficient of NIR light in mouse brain tissue^[28]; (d) attenuation length of light in mouse brain cortex^[29]; (e) schematic of *in vivo* multiphoton brain imaging excited under NIR- I light and NIR- II light^[48]

原型辅酶 I (NADH)、黄素 (flavins) 等,对紫外可见光具有很强的吸收能力,这也是紫外可见光在生物体内穿透能力较弱的原因^[28],而近红外光在生物体内被这些分子吸收所造成的衰减较小。光的散射也是造成能量损耗的一个重要因素,从图 2(c)可以看出,随着光波长的增加,生物组织对光的散射系数逐渐变小,因而光的传播能力将增强^[28]。从整体上而言,激发光和出射荧光在组织中的穿透能力最终是由吸收和散射共同决定的。虽然更长的激发光波长带来的是更小的散射损耗,但是生命体内含量最高的水却对近红外光有着较强的吸收能力。如图 2(d)所示,水(上曲线)在 1500 nm 左右和 1900 nm 外的光波段有较强的吸收能力(对应较小的吸收长度),而散射长度(直线)则是一直随着光波长的增加而增大。通过综合考虑两者对光的衰减效应,得到了光在脑组织中的有效衰减长度(下曲线)。可以看出,700~1300 nm 和 1700 nm 附近是最优的穿透波长,也就是激发光实现深穿透的“组织光学窗口”^[29]。近红外光的范围是 700~1700 nm,根据其在组织中的传播特性被分为两个部分,如图 2(e)所示,近红外一区(NIR-I, 700~950 nm)和近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)。可以看出,近红外二区的光比一区的光有更小的散射,其衰减长度也要比近红外一区的长,所以近红外二区光波段在多光子荧光成像中是更好的“组织光学窗口”,而且 1300 nm 和 1700 nm 附近波段是多光子荧光成像的最优激发光波长。

前面提到,在双光子荧光显微镜中使用最广泛的是 20 世纪 80 年代开发出来的钛蓝宝石飞秒脉冲激光器,随着技术的不断发展,它本身技术趋于成熟、使用简便、可靠性高、波长容易调谐(690~1040 nm)、稳定性高,其波长覆盖了整个近红外一区窗口,可以满足许多商业化荧光染料和组织内源性荧光团(非标记成像)的双光子激发要求^[15]。钛蓝宝石激光器的单个脉冲能量可以达到 10~30 nJ,脉冲宽度在 100 fs 左右,重复频率一般在 80 MHz,平均功率高达数瓦^[29-30]。它的缺点是价格昂贵、体积大、质量大,不适合需要经常移动(便携式)的显微镜。同时,在近红外一区的激光激发下,双光子荧光成像的深度大约到 500 μm ^[31]。为了进一步提升成像的深度,钛蓝宝石激光器也可以作为泵浦光源,在光参量振荡器(OPO)^[32]或者光参量放大器(OPA)^[33]的辅助下将出射激光红移至近红外二区波段,而且在 OPA 下可以获得高达数百 nJ 的脉冲

能量,实现更加高效的多光子激发^[15]。基于钛蓝宝石的固体飞秒激光器虽然具有非常好的波长调谐性,但是在整个波段并非所有波长都具有较高的功率,一般而言只有中心波长(比如 920 nm)处功率较高,在边缘处(1000 nm)功率往往比较低。所以,具有固定波长的光纤飞秒激光器在多光子荧光成像中也受到广泛关注^[29, 34-35]。光纤飞秒激光器体积小、结构紧凑,价格相比钛蓝宝石固体激光器要低^[36],更适用于可移动式的多光子显微镜或者需要灵活布置光路的成像应用装置(比如内窥镜式的多光子成像^[37])。目前最常见的且较为成熟的是 1000 nm 波段的掺镱(Ytterbium)光纤激光器和 1500 nm 波段的掺铒(Erbium)光纤激光器^[29, 38-39]。为了能够达到多光子荧光成像中的两个最优激光波长,即 1300 nm 和 1700 nm,可以利用自相位调制或者孤子自频移等技术来拓展光纤激光器的波长^[40-43]。同时,一些特殊种类的掺杂光纤,例如掺铥(Thulium)和掺铋(Bismuth)光纤也可以实现 1700 nm 波段的飞秒脉冲激光^[44-45]。固体和光纤飞秒脉冲激光器在未来的多光子荧光成像中将继续扮演重要的角色。一般来说,在实际的应用中应根据预算、使用场景等选择合适的激光器,需要考虑的激光器参数主要是波长、脉宽、重复频率和功率。对于波长选择,根据所使用的荧光染料(有机和无机染料)或者荧光蛋白,在近红外一区的光激发下众多现有的染料或者荧光蛋白都是双光子荧光^[46-47]。目前在近红外二区的光源激发下主要是三光子荧光,一些在红光区域(600 nm 左右)有吸收的染料(例如 Alexa Fluor 680)在 1100~1300 nm 激发光波段也可实现双光子激发。虽然近红外二区对多光子荧光成像来说是非常好的光学窗口,但是现有的具有红光吸收的染料的多光子吸收能力(吸收截面)都相对较小,同时荧光量子产率也较低,这也是限制近红外二区激发多光子荧光成像发展的一个重要因素。除了波长之外,飞秒激光器的脉宽也是重要参数,更窄的脉宽意味着更加高效的荧光产生,一般在多光子成像中的飞秒脉宽基本在 100 fs 左右。而激光器的重复频率也很重要,在平均功率一定的情况下,更低的重复频率则拥有更高的脉冲能量(平均功率=脉冲能量×重复频率),可以实现更高效的多光子激发。目前在商业化的多光子显微镜中配套使用的飞秒激光光源主要由光谱物理(Spectra-Physics)公司和相干(Coherent)公司提供。光谱物理的 InSight®X3™+

系列飞秒光源具有 680~1300 nm 的宽调谐范围,平均功率最高达到 3.0 W (900 nm),脉冲宽度小于 120 fs,重复频率为 80 MHz,由于其光谱范围从传统的近红外一区扩展到了近红外二区,在大多光子显微镜制造商的产品中被广泛采用,是目前市场上在多光子显微镜中安装量最大的飞秒激光器。光谱物理的 Mai Tai[®] DeepSee[™] 系列激光器是传统的钛蓝宝石飞秒激光光源,调谐波长为 690~1040 nm,平均功率最高达到 2.4 W,脉冲宽度小于 120 fs,重复频率为 80 MHz。相干公司的 Chameleon 系列激光器也是基于钛蓝宝石的飞秒激光光源,光谱调谐范围为 680~1080 nm (Chameleon Vision II),平均功率最高可达 3.0 W,加入 OPO 系统之后可以将波长扩展至近红外二区波段 (Chameleon Compact OPO, 1000~1600 nm) 和可见光波段 (Chameleon Compact OPO-Vis, 340~1600 nm)。此外,相干公司的 Chameleon Discovery NX 系列激光器类似于光谱物理的 InSight[®] X3[™]+ 系列激光器,调谐波长为 660~1320 nm,脉冲宽度小于 100 fs,平均功率最高达到 3.6 W。这两种系列的飞秒光源在传统的近红外一区 and 一部分近红外二区 (1000~1300 nm) 具有较宽可调谐光谱,系统集成度高于带有 OPO 的钛蓝宝石激光光源,功率也提升到了较高水平,广泛应用于众多商业化的多光子显微镜 (奥林巴斯的 FVMPE-RS、尼康的 A1 MP+、布鲁克的 Ultima 2Pplus、徕卡的 STELLARIS 8 DIVE 等)。如果考虑在 1300 nm 和 1700 nm 波段激发的三光子显微镜,德国 Class 5 Photonics 公司的白矮星 OPCPA 系列激光器 WD-1300-dual 可提供 1300 nm 和 1700 nm 的输出,平均功率高达 5 W,脉宽小于 65 fs,单脉冲能量高达 5 μ J。

4 研究进展

4.1 大深度脑血管网络成像

脑科学研究大脑的结构和功能^[49]。相比于在临床脑疾病诊疗中广泛使用的功能核磁共振成像 (fMRI) 和计算机断层成像 (CT)^[50],多光子荧光成像技术可以实现更高的达到细胞级的活体成像分辨率,在脑科学的基础研究中扮演重要角色。脑部活动需要血液输入大量的营养物质和氧气,因而血管网络丰富密布。近些年来,多光子荧光成像技术已经被应用到对大脑血管网络的活体三维结构成像中,在近红外二区光源的激发下,更深层脑区的

微细血管结构被清晰成像^[51-53]。2011 年, Kobat 等^[51]采用 1280 nm 激发光实现了 1.6 mm 深度的小鼠脑活体血管网络双光子荧光成像,也是当时双光子在深层脑成像应用中的一个记录。1280 nm 的光源来自钛蓝宝石激光器泵浦的 OPO,重复频率为 80 MHz,脉宽为 140 fs。图 3(a) 展示了鼠脑血管网络的三维重构图 (中间),同时不同深度处的二维截面图展示在左右两侧。标记血管所使用的染料是分子量为 10 kDa (千道尔顿) 的 Alexa Fluor 680-Dextran。Alexa Fluor 680 是一种小分子的近红外荧光染料,吸收波长在 680 nm,发射波长为 702 nm。标记血管时需要将染料分子注射入静脉血管,这就需要染料具有一定的亲水性和稳定性。在 Alexa Fluor 680 上修饰葡聚糖可以达到这样的标记目的。在双光子成像的过程中,在脑皮层 0.7 mm 深度以上的区域,激发光的功率随着成像深度的增加而逐渐增加,以使每一层深度所获得的荧光信号接近,这样可以保证图像的信噪比。超过 0.7 mm 之后, OPO 的功率开到最大 (约 120 mW),脉冲能量约为 1.5 nJ,同时为了提高信噪比,每一帧图像的积分时间也随之延长。这项成果证实了近红外二区光源在深层脑结构多光子荧光成像中的巨大优势。当将激发光波长移动到 1700 nm 波段,可以实现三光子荧光脑成像。Horton 等^[52]通过孤子自频移技术,以 1550 nm 的高能量光纤飞秒激光器作为泵浦光源,在光子晶体棒中获得了高脉冲能量的波长为 1675 nm 的飞秒激光光源。在重复频率为 1 MHz 时,其脉冲能量可以达到 67 nJ,孤子脉宽为 65 fs。这种孤子自频移技术不但将波长红移到了 1700 nm 波段,同时把脉宽压缩了 1/6,这对大深度的三光子成像非常有利。使用葡聚糖修饰的 Texas Red 染料 (吸收峰为 595 nm,发射峰为 615 nm) 来标记脑血管,对脑血管网络的三光子荧光成像深度达到了 1300 μ m,如图 3(b) 所示。在成像深度 800 μ m 以上的区域,每帧图像 (512 \times 512 像素点) 的采集时间约为 8 s;当超过 800 μ m 后,激光器的功率需要开到最大 (对大脑表面的功率为 22 mW),每帧图像的采集时间增加至 20 s。从图 3(c) 可知,在深度超过 1000 μ m 甚至达到 1300 μ m 时,脑血管的三光子荧光信号依然可以被采集到,从而形成图像。在 1000~1135 μ m 的脑区所获得的三光子荧光图像的信噪比为 79~119。

多光子荧光成像的深度不仅受到激发光波长的影响,还有飞秒激光的功率、脉冲能量以及荧光

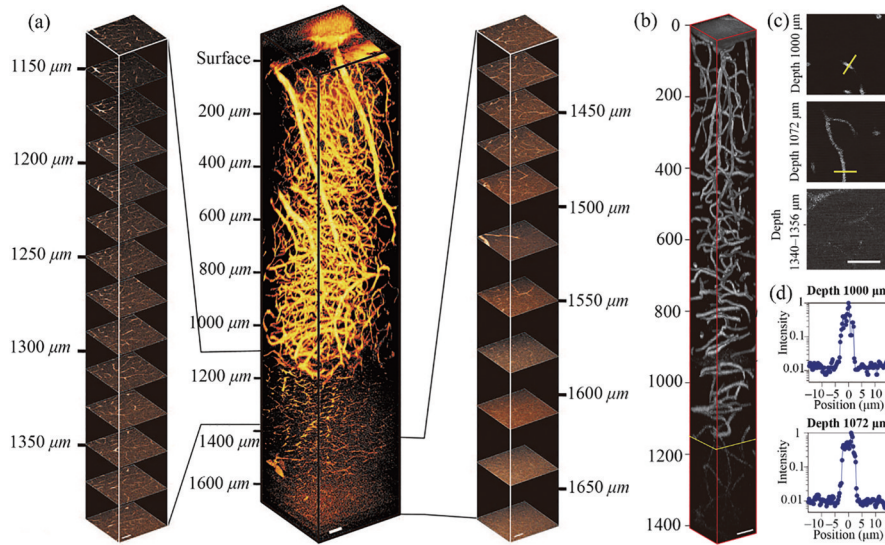


图3 大深度多光子脑血管成像。(a) 1280 nm激发下的双光子荧光活体脑血管三维重构图(中间),两侧为不同深度处的二维截面图像^[51]; (b) 1675 nm激发下的三光子荧光活体脑血管三维重构图^[52]; (c) 不同深度处的二维截面图像^[52]; (d) 图3(c)中直线处的血管的三光子荧光信号分布^[52]

Fig. 3 Deep brain vascular multiphoton imaging. (a) Reconstructed 3D *in vivo* two-photon fluorescence image of brain vasculatures under 1280 nm excitation (middle) and 2D cross section images at different depth (on each side)^[51]; (b) reconstructed 3D *in vivo* three-photon fluorescence image of brain vasculatures under 1675 nm excitation^[52]; (c) 2D cross section images at different depth^[52]; (d) three-photon fluorescence signal distribution of the straight lines across the blood vessels in Fig. 3(c)^[52]

染料的影响。当将分子荧光染料 Texas Red 换成量子点时可以进一步增加近红外二区激发的多光子荧光成像的深度。量子点是一种稳定的具有明亮的较窄荧光光谱的纳米晶,通过控制其组成元素和尺寸可以有效调节荧光发射波长^[54]。和有机分子染料相比,由于量子点的尺寸增大到数十纳米,根据多光子吸收截面的定义,以单个纳米晶来计算,量子点的多光子吸收截面一般高于传统的有机染料3~5个数量级。Liu等^[55]研究了不同的量子点在近红外二区(1600~1800 nm)的多光子吸收特性,并且与常见的染料如 Texas Red、SR101 等进行了对比,发现在1700 nm波段,量子点的三光子吸收截面要比这两种有机荧光染料高出4~5个数量级。利用量子点 Qtracker 655 标记小鼠脑血管,在1700 nm激发下,实现了深度达2100 μm的脑血管网络三光子成像,如图4(a)所示,在成像的过程中积分速度为2 frame/s。这种大深度高速的三光子荧光成像最主要的原因是量子点的大多光子吸收截面[如图4(b)所示]和较高的荧光量子产率,使得在1700 nm激发下可以实现高效的三光子荧光发射[如图4(c)所示]。除了量子点之外,共轭聚合物也因为具有优异的多光子吸收特性和明亮的荧光发射

而被应用于大深度的多光子荧光成像中。Hassan等^[56]研究了三种聚合物点的多光子特性,发现它们的多光子荧光特性要好于传统的荧光染料和量子点,同时它们也具有较宽的多光子吸收光谱,使得在激发光波长选择上更加容易。在共轭聚合物 CNPPV 标记的小鼠血管模型中,1225 nm激发(光源来自钛蓝宝石激光器泵浦的 OPA 系统)下实现了1300 μm的成像深度,如图4(d)所示。通过考察 CNPPV 在1225 nm激发下的多光子吸收特性,发现是双光子与三光子的混合(功率依赖关系中系数为2.5),之所以没有使用1300 nm激发是因为 CNPPV 在此波长下的吸收截面较小,而选用1225 nm激发,虽然是两种多光子吸收效应的混合,但是最终得到的成像效果出色。相比于 OPA 系统产生的飞秒光源,掺镱的飞秒激光器具有更低的成本。虽然其波长是固定的,但是由于共轭聚合物具有较宽的多光子吸收光谱,在1060 nm的激发下,聚合物 PFPV 标记的脑血管成像深度达到900 μm,和钛蓝宝石激光器的800 nm激发(深度为850 μm)相比,虽然成像深度提升有限,但是成像的信噪比却有更好的表现,尤其在大脑超过600 μm的区域。原因主要是1060 nm的功率高,穿透能力更好,其次所激发出的 PFPV 的

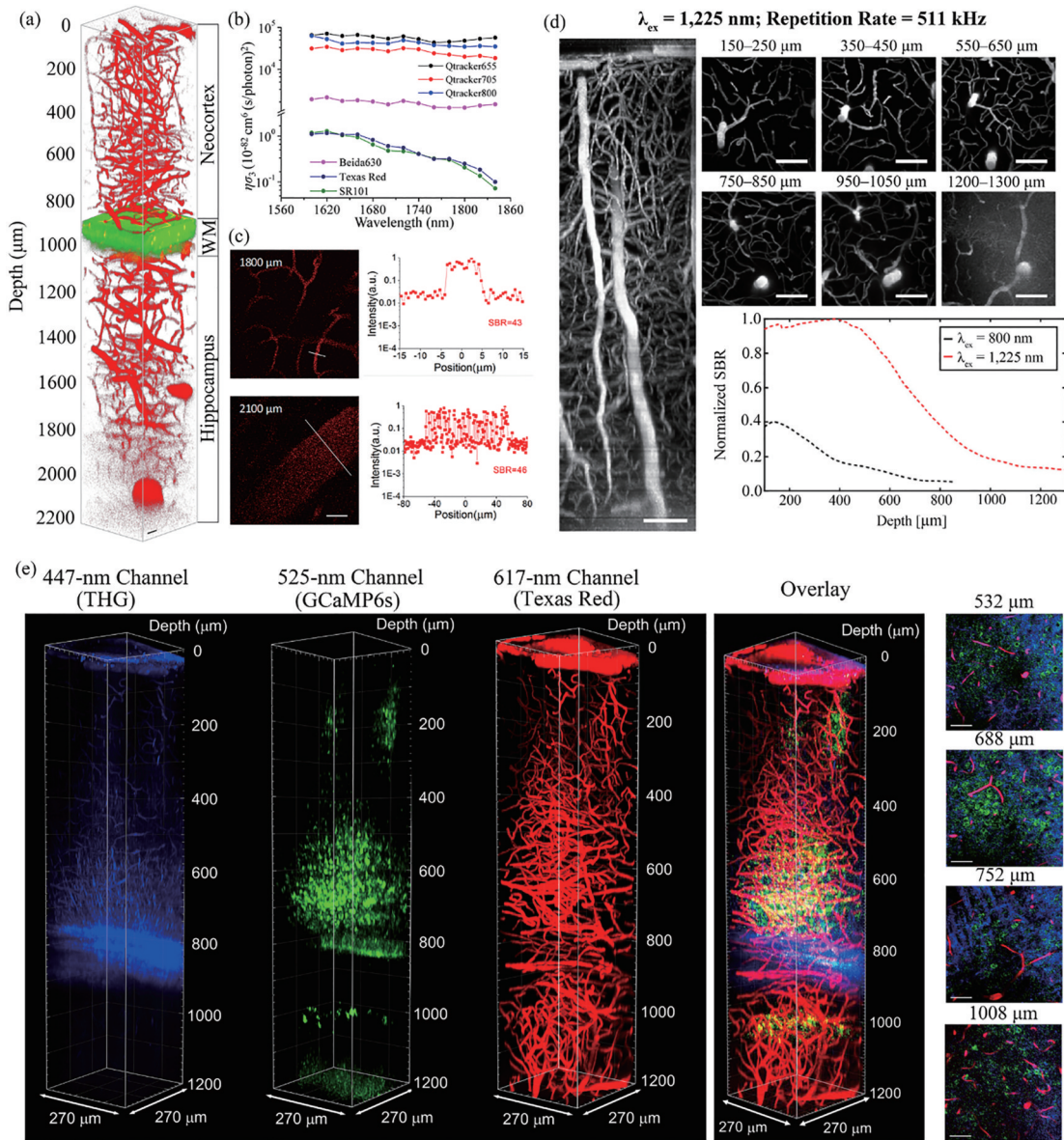


图4 染料辅助的大深度多光子脑血管成像。(a) 1700 nm激发的量子点 Qtracker655 标记的小鼠脑血管三光子荧光成像三维重构图^[55]；(b)几种荧光探针的三光子作用截面^[55]；(c)不同深度处的二维三光子血管成像截面图和对应的信噪比^[55]；(d) 1225 nm激发下的聚合物点标记的小鼠脑血管的多光子荧光成像^[56]；(e) 1340 nm激发的多色三光子脑成像^[63]。

Fig. 4 Dyes-assisted deep brain vascular multiphoton imaging. (a) Reconstructed 3D *in vivo* three-photon fluorescence image of brain vasculatures labeled by Qtracker 655 under 1700 nm excitation^[55]; (b) three-photon action cross sections of several fluorescent probes^[55]; (c) cross sections of 2D three-photon angiography at different depths and corresponding signal-to-noise ratio^[55]; (d) polymer dots assisted *in vivo* multiphoton fluorescence image of brain vasculatures under 1225 nm excitation^[56]; (e) multicolor three-photon fluorescence brain imaging under 1340 nm excitation^[63]

双光子荧光信号中有部分三光子荧光信号。除了量子点和共轭聚合物之外,其他的一些有机和无机荧光探针也在近红外二区激发的多光子荧光脑血管结构成像中表现优异。例如金纳米棒就具有等离子体共振增强的多光子吸收特性,通过可控合成可以将其共振吸收峰调谐到所需激发光对应波长上。Wang等^[8]报道了近红外一区和二区激发下的金纳

米棒标记的脑血管多光子成像,所使用的波长为近红外二区的边缘(1000 nm),双光子荧光成像深度也达到了700 μm,而近红外一区光源760 nm激发下所得到的成像深度为429 μm。近些年来出现的新颖的聚集诱导发光材料也被证明具有较好的多光子荧光特性,在近红外二区激发下(1040 nm,1550 nm波长等),其所标记的鼠脑血管网络也实现了大深度

的双光子和三光子荧光活体成像^[57-62]。最近, Hontani 等^[63]利用单一近红外二区激光激发实现了多色的三光子荧光脑成像。通过研究一系列多光子染料, 包括有机荧光染料 Texas Red、sulforhodamine 101 和 Alexa Fluor 546, 荧光蛋白 DsRed、tdTomato 和 mCherry, 量子点 Qdot 605, 发现当利用 1300 nm 波段的光源激发染料分子到更高的电子激发态时, 一些红色的荧光染料表现出更高效的三光子激发, 而 1300 nm 波段也是一些绿色染料被激发到第一激发态的最优波长。通过比较染料的三光子作用截面, 发现和 1700 nm 波段激发相比较, 1300 nm 波段的激发效率更高, 这种增强的三光子激发效率可能是双光子共振增强引起的。将绿色染料激发至第一激发态, 而将红色染料激发至更高激发态, 使用单一的 1300 nm 波段的激光则可以同时实现多色三光子成像。通过 Texas Red (红光) 标记血管, GCaMP6s (绿色) 标记神经元, 再利用血细胞的三次谐波信号, 在 1340 nm 激发下就可以实现对大脑的同时多色三光子成像, 成像深度达到 1200 μm , 如图 4(e) 所示。

4.2 脑神经成像

由于多光子荧光成像所具有的细胞级分辨率和活体深脑区三维成像能力, 在脑科学研究中被广泛应用在活体脑神经元的形貌和活动监测^[64]。基于神经元本身的特点, 利用外源性的荧光染料来标记难度较大, 均一性和特异性也不够好。目前在多光子脑神经成像中使用比较广泛的是基因编码的荧光蛋白, 例如钙离子指示剂 GCaMP6, 在未结合钙离子时几乎不发射荧光, 而与钙离子结合后荧光强度显著增强, 对神经元活动过程中的钙离子动态变化响应具有优异的灵敏度和稳定性。Ouzounov 等^[65]成功地利用 1300 nm 波长光激发 GCaMP6 标记的神经元, 实现了海马区超过 1 mm 深度的神经元三光子荧光成像。1300 nm 的光源来自非共线光参量放大系统 (NOPA), 功率高达 500 mW, 在重复频率为 400 kHz 时的脉冲能量也高达 1250 nJ, 脉宽为 55 fs。这样的激光参数非常有利于实现高效率的多光子激发。图 5(a) 展示了小鼠大脑皮层和海马区的被 GCaMP6 标记的神经元在 1300 nm 激发下的三光子荧光三维重构图, 其中绿色为神经元细胞, 粉色为三次谐波信号。高信噪比的三光子荧光图清晰地揭示了在距离大脑表面约 1 mm 位置处的海马区锥体层 (SP 层) 的神经元的典型蜂窝状排列,

同时以 8.49 Hz 的频率记录了约 150 个神经元的活动, 长达 48 min。对于钙离子指示剂 GCaMP6, 其最优的三光子激发波长是 1300 nm, 而在 1700 nm 激发下, 由于其吸收截面小, 荧光信号弱, 所需要的功率过高, 很难应用到多光子荧光成像中。Horton 等^[52]则利用一种红色荧光蛋白标记的神经元, 实现了 1700 nm 激发下的三光子荧光成像。通过荧光成像可以清楚地看到在大脑皮层以及海马区表达红色荧光蛋白的神经元细胞。因为光源的最高功率只有 22 mW (脑表面), 在大脑深度 740~900 μm 区域, 每帧图像的积分时间为 16 s, 超过 900 μm 后的积分时间增加至 20 s, 最终能够获得最大深度为 1120 μm 的来自海马锥体层处的神经元的三光子荧光信号。Miller 等^[53]开发了基于 OPA 系统的同时具有高脉冲能量 (400 nJ) 和高重复频率 (511 kHz) 的飞秒脉冲激光器, 波长可以在 1100~1400 nm 调谐。在 1140 nm 激发下, tdTomato 标记的神经元的双光子荧光成像深度达到了 1160 μm , 在成像深度超过 850 μm 后, 激光器的功率开始增加至最大 40 mW (脑表面)。而在黄色荧光蛋白 YFP 标记的神经元中, 在 1280 nm 激发下的成像深度也达到了 1000 μm 左右。这里需要注意的是在整个成像过程中, 在不同的脑区深度, 为了实现较好的成像信噪比, 采用了平均多张图像的方式。例如在 tdTomato 标记的神经元双光子成像中, 在 0~800 μm 平均 5 帧, 800~900 μm 平均 8 帧, 900~1000 μm 平均 20 帧, 而 1000~1160 μm 平均 25 帧。由此可以看出, 随着成像深度的增加, 荧光蛋白标记的神经元信号越来越弱, 需要增加成像帧数 (或者提高积分时间) 来保证信噪比。这在一定程度上减小了成像的速度, 对于深脑区, 需要进行高速成像监测神经元的动态变化, 存在巨大的挑战性。在神经元功能成像中, Yildirim 等^[66]通过优化整个多光子成像系统的光学参数, 包括激光脉宽、物镜、传输光路、信号采集光路系统等, 在 1300 nm 飞秒激光 (脉冲宽度为 40 fs) 平均功率只有不到 20 mW 的情况下对整个大脑皮层实现三光子荧光成像。这种高效的多光子显微系统对清醒小鼠的主要视觉皮层 (V1 层)、板下神经元以及皮层 6 下的白质区域实现了高分辨、高信噪比成像, 成功揭示了这些区域的神经元特有的响应活动。这项研究证明了优化后的多光子荧光显微镜可以对深脑区进行亚细胞分辨的神经功能成像。Chow 等^[67]利用近红外二区激发的大

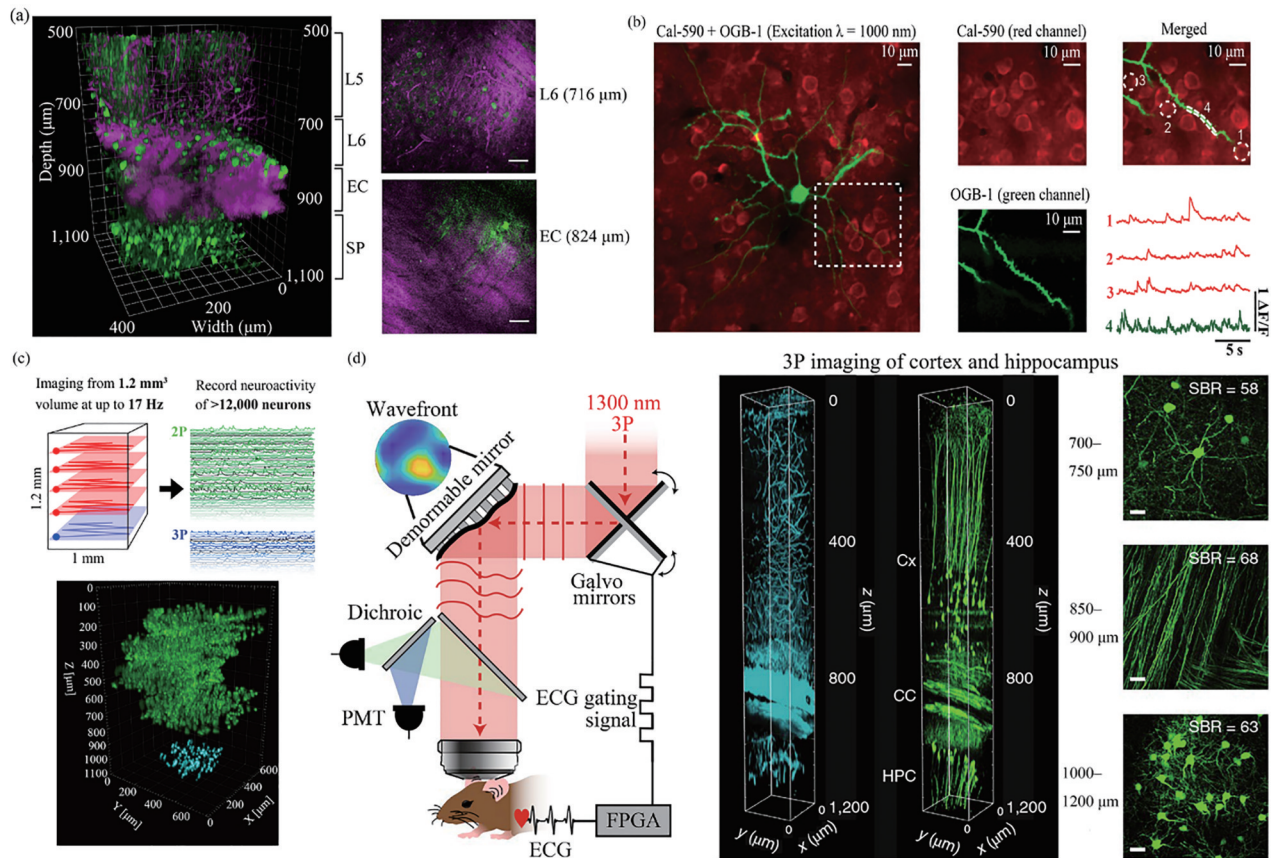


图5 多光子脑神经成像。(a) 1300 nm激发下的小鼠大脑皮层和海马区被GCaMP6s标记的神经元的三维重构三光子荧光成像^[65]；(b) 1000 nm激发下的被Cal-590和OGB-1标记的神经元的双色双光子荧光成像^[68]；(c)混合多路复用的多光子显微术(HyMS)实现小鼠大脑皮层和海马区的神经元的同时双光子和三光子体成像^[69]；(d)基于移动矫正的自适应光学三光子显微镜示意图,1300 nm激发下的小鼠视觉皮层和海马区的三光子荧光成像图^[72]

Fig. 5 Multiphoton brain neuronal imaging. (a) 3D reconstruction of three-photon fluorescence images of GCaMP6s-labeled neurons in the mouse cortex and the hippocampus under 1300 nm excitation^[65]; (b) two-color two-photon fluorescence imaging of neurons labeled with Cal-590 and OGB-1 under 1000 nm excitation^[68]; (c) hybrid multiplexed sculpted light microscopy (HyMS) for simultaneous volumetric two-photon and three-photon imaging of mouse neurons in cortex and hippocampus region^[69]; (d) schematic of motion-corrected AO three-photon microscope and three-photon microscopy of mouse visual cortex and hippocampus under 1300 nm excitation^[72]

深度三光子荧光成像实现了对成年斑马鱼的前脑的大范围非侵入性成像,使得整个大脑的结构和功能成像成为可能。

虽然三光子神经成像一定程度上提升了成像深度,但是依然需要有较高的激发功率来保证足够的三光子吸收。而双光子的激发效率则相对更高,在实现同强度荧光的条件下所需要的能量相对较低,对神经元的光损伤更小。Tischbirek等^[68]开发了一种荧光红移的钙离子指示剂Cal-590来实现双光子成像,如图5(b)所示。Cal-590的吸收峰为570 nm,荧光发射峰为590 nm,其在1050 nm处具有最大的双光子吸收截面,在1050 nm激发下的双光子荧光成像中,可以对大脑皮层软膜下900 μm区

域内的所有6个分层中的神经元进行成像。如果结合其他的钙离子指示剂,例如OGB-1(绿色荧光发射,自身激发光波长为920 nm),可以在单一波长1000 nm激发下实现双色大深度脑神经元双光子成像。在多光子脑神经成像中,也可以将双光子和三光子结合起来,充分发挥各自的优势,在一套系统中实现针对性的不同深度的神经成像。Weisenburger等^[69]设计开发了一套融合多项技术的多光子成像系统,包括时空复用、个体像素的单个脉冲激发、同步检测、远程扫描以及时间聚焦等,采用960 nm来激发双光子成像,而1300 nm来实现三光子成像。这套系统可以同时对整个脑皮层区和部分海马区进行成像,覆盖1 mm×1 mm×1.22 mm

的体积,包括了多达 12000 个神经元,最大的成像深度为 1220 μm ,而成像速度可达 17 Hz,如图 5(c)所示。但是显而易见,复杂的系统和高额的成本也会给这项技术的推广使用带来问题。在多光子荧光成像中,由于光学系统和成像样本所带来的波前变形也是限制成像信噪比、分辨率和深度的重要因素,近些年来,将自适应光学(AO)技术引入到多光子显微镜中在一定程度上解决了波前变形所导致的像差问题^[70-71],提升了多光子荧光成像的信噪比和深度。Streich等^[72]通过将AO矫正和主动心电图门控技术引入三光子显微镜来矫正像差以及心跳引起的图像偏移误差,如图 5(d)所示,在 1300 nm 激发下,实现了大脑皮层 900 μm 深处的单个突触的高分辨成像,并且可以记录 1.4 mm 深处的大脑海马区的精细树突活动过程以及白质层的纤维星形胶质细胞的活体功能成像。在AO矫正的帮助下,三光子成像的有效轴向分辨率提高了 4 倍,荧光信号实现了 8 倍的增强。

4.3 经颅脑成像

由于钛蓝宝石激光器的普及,基于近红外一区光源激发的双光子荧光显微成像被广泛应用于脑科学的研究当中。虽然所使用的近红外光具有较好的穿透能力,但是在进行脑成像的时候,由于颅骨具有强的散射能力,大部分光源被衰减,所以一般需要将颅骨去除或者将其打磨变薄^[73-75],这势必会对生物组织造成一定的侵入性,而对于研究脑部结构以及神经元的活动也可能带来影响。对于长时间观测脑部活动的研究,如何避免颅骨去除之后对小鼠的正常活动影响、防止感染以及减少外部因素的干扰等都具有一定的挑战性。已经知道,相比于传统的近红外一区光源,近红外二区光源的穿透能力更强,那么近红外二区激发下的多光子成像在经颅(颅骨完整)脑成像中可能具有一定的开发潜力。Wang等^[76]比较了 920 nm 激发下的双光子和 1320 nm 激发下的三光子荧光成像在荧光素(fluorescein)标记的同一个脑血管经颅成像中的效果,如图 6(a)所示。发现三光子成像后可以得到非常高信噪比的血管图像,在皮层下 120 μm 深度处的信噪比为 100 左右,到 510 μm 深度处的信噪比为 10。而在 920 nm 激发下的双光子成像中,穿过颅骨后的图像对比度非常低,即使在浅层区域,在没有标记的区域的背景噪声信号比三光子成像情况要高出数十倍。为了进一步验证长波长和更高阶非线性激发在经颅成像

中的优势,利用 Alexa Fluor 680 标记了血管,在 1320 nm 激发下可以实现双光子荧光成像。结果显示 1320 nm 激发下的三光子成像和 920 nm 激发下的双光子成像具有相似的信噪比,只是在图像对比度上有了一定的提升,可能源于长波长减小的散射和像差。这项研究表明,近红外二区长波长激发三光子才能实现高效的经颅成像。当使用 1320 nm 波长光激发三光子时,对于经颅后的脑皮层 GCaMP6s 标记的神经元,最大成像深度可以达到 465 μm 。利用这种方法则可以无损地对大脑皮层 2/3 区域的神经元进行成像,如图 6(b)所示,但是需要注意的是,其所需要的激发光能量要高于开颅实验中的双光子成像,所以对光源能量的要求可能也会限制经颅三光子成像的最终效果。Wang等^[77]利用 1660 nm 高能量激发脉冲(脉冲能量为 137 nJ,脉冲宽度为 75 fs),实现了对小鼠颅骨内的骨细胞的三次谐波成像,所探测到的颅骨厚度为 140 μm ,颅骨下大脑皮层 150 μm 内的血管和神经元树突也被激发出较强的三次谐波信号。同时,利用 SR101 红色染料对颅骨染色后,对颅骨内骨细胞的三次谐波和三光子荧光成像揭示了“三明治”式的结构特征,如图 6(c)所示。这一结果表明,近红外二区光源在脑颅骨中具有较好的穿透能力。

Wang等^[78]开发设计了一种具有聚集诱导发光特性的纳米颗粒 DCDPP-2TPA,其吸收峰为 443 nm,荧光发射峰在 642 nm,在近红外区域 1550 nm 处的三光子吸收截面为 $2.95 \times 10^{-79} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2$,远高于传统的有机荧光染料罗丹明 6G。在 1550 nm 的激发下,在穿透整个颅骨之后,此纳米颗粒标记的小鼠脑皮层血管网络的三光子荧光成像深度达到了 300 μm ,如图 6(d)所示,并且对经颅后的血管实现了三光子荧光寿命成像,利用明亮的三光子荧光信号测试了血流的速度。近红外光在高度散射组织中具有明显的穿透优势,如果能够将激发光和发射荧光都红移到近红外波段,则会实现更好的经颅成像效果。Wang等^[48]设计双光子荧光成像的激发光和发射光分别在近红外二区和一区,以实现更好的穿透能力和更大的成像深度。通过设计制备了超小共轭聚合物点,将其吸收红移至长波长波段,以利于近红外二区光(1200 nm)实现高效双光子激发;通过优化聚乙二醇包覆比例,抑制聚集诱导淬灭效应,提高了聚合物点在近红外一区荧光发射(725 nm)量子产率,达 20%。在小鼠活体开颅脑血管网络成像

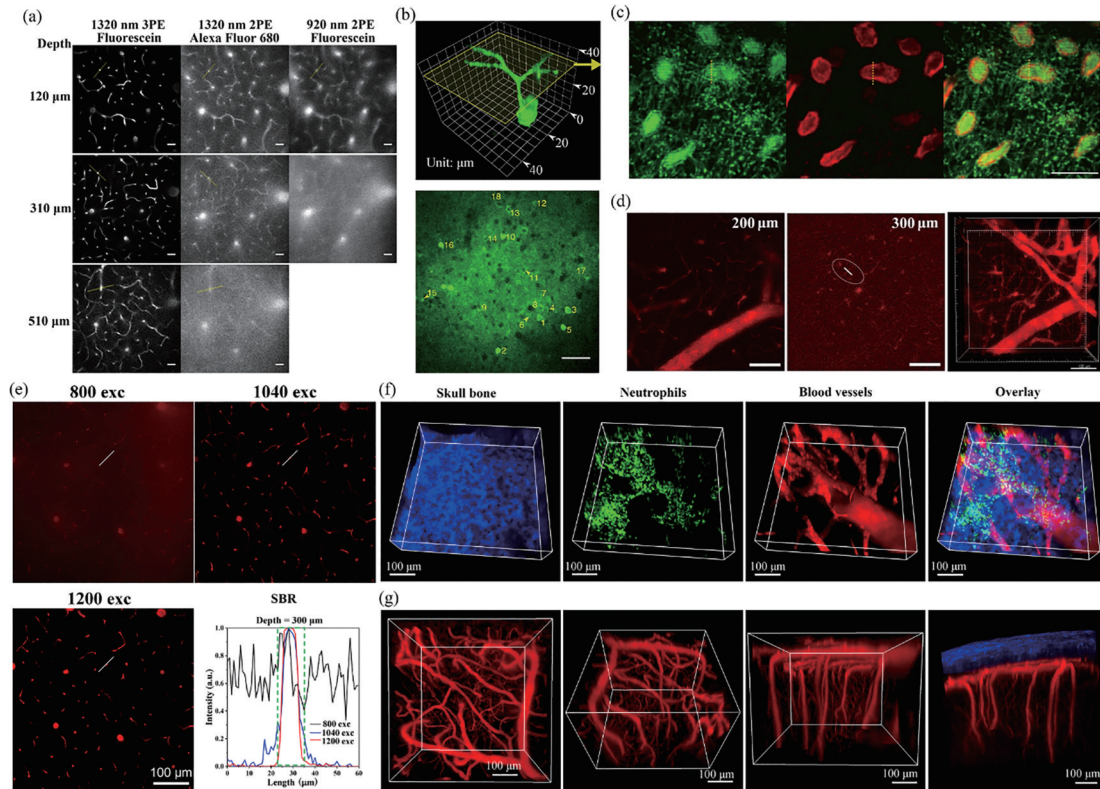


图 6 多光子经颅成像。(a) 1320 nm 激发的三光子和 920 nm 激发的双光子对活体经颅脑血管成像的比较^[76]；(b) 1320 nm 激发的经颅三光子荧光神经成像^[76]；(c) 1660 nm 激发的颅骨内骨细胞的三次谐波和三光子荧光成像^[77]；(d) 1550 nm 激发的 DCDPP-2TPA 纳米颗粒标记的脑血管经颅三光子荧光成像^[78]；(e) 超小共轭聚合物点标记的脑部血管在不同激发光下的双光子荧光图^[48]；(f) 颅骨内的活体双光子荧光成像^[48]；(g) 1200 nm 激发的经颅脑血管双光子荧光三维重构图^[48]

Fig. 6 Multiphoton brain imaging through skull. (a) Comparison of 1320 nm excited three-photon and 920 nm excited two-photon for *in vivo* brain vascular imaging through intact skull^[76]; (b) 1320-nm-excited three-photon fluorescence neurons imaging through intact skull^[76]; (c) 1660-nm-excited third-harmonic generation (THG) and three-photon fluorescence imaging of osteocytes in skull bone^[77]; (d) 1550-nm-excited three-photon fluorescence imaging of brain blood vessels labeled by DCDPP-2TPA nanoparticles through skull^[78]; (e) two-photon fluorescence images of brain blood vessels labeled by ultrasmall conjugated polymer dots under different laser excitations^[48]; (f) *in vivo* two-photon fluorescence imaging of bone marrow^[48]; (g) 3D reconstructed two-photon images of brain blood vessels upon 1200 nm excitation through intact skull^[48]

中,通过系统性地对比不同波长近红外光(一区和二区)激发下的双光子成像质量和深度,如图 6(e)所示,证明了近红外二区激发下可以得到超大成像深度(1010 μm)和超高信噪比(100)的三维脑血管网络图像;同时在颅骨完整的情况下可以对骨髓中的免疫细胞进行示踪成像[图 6(f)所示],并且穿透完整颅骨后可以对脑部 400 μm 深的血管实现高信噪比三维成像[图 6(g)所示]。成像速度约为 0.31 frame/s,这种成像速度和常规的双光子荧光成像接近(每个像素点 2~3 μs),不需要超长的积分时间或者多帧平均来获得高信噪比的图像^[76]。

4.4 肿瘤和心血管疾病多光子成像

多光子成像技术除了在脑科学中发挥重要作用,由于其不可替代的细胞分辨活体成像能力,在肿瘤和心血管疾病等人类杀手性基础性疾病的基础研究中也受到关注^[79-82]。通过肿瘤组织和正常组织中的一些内源性荧光团的含量变化和分布差异^[83],或者利用特异性的靶向荧光团标记肿瘤分子^[84],可以通过多光子荧光成像技术在活体水平对这些现象进行高分辨成像。目前纳米颗粒类的药物在肿瘤的治疗中发挥了出色的效果,但是纳米颗粒如何进入肿瘤、在肿瘤中如何滞留、如何分布等问题在学术界存在很大争议^[85]。具有高分辨的活

体多光子荧光成像或许可以为这些问题提供新的思路。实体肿瘤内拥有丰富的血管网络来运输营养物质和氧分以供其生长,而且与正常组织中的血管结构存在明显不同。肿瘤血管往往具有异常的结构和特性,例如会存在较高的渗透性(管壁存在缺陷不完整)、膨胀、扭曲的形貌和增强的血流异质性^[86]。Wang等^[87]开发了一种高亮度的荧光纳米颗粒来标记肿瘤血管,实现近红外二区激发的多光子荧光成像。这种纳米颗粒在550~650 nm波段有较强的吸收,在1200 nm激发下可以发射明亮的荧光(荧光峰700 nm,量子产率19%),在对小鼠脑部血管网络结构的三维双光子成像中,深度达到了

924 μm 。为了实现在显微镜下直接观察肿瘤,设计了一种在小鼠耳朵皮下生长的肿瘤模型。当将荧光纳米颗粒注射入小鼠体内后,在1200 nm激发下可以清晰地看到小鼠正常组织的血管和肿瘤组织内的血管网络。在正常组织中,血管中荧光分布均匀,血管结构平滑,排列有序。而在肿瘤组织中,可以明显观察到扭曲错落的血管形貌,加之血流的异质性升高,导致血管内的荧光信号分布不均匀,有些地方的荧光信号非常强,如图7(a)所示。通过这些差异性,就可以区分出肿瘤组织的边缘。这种纳米颗粒在体内的循环时间较长,在12 h内依然可以对肿瘤血管进行清晰的双光子成像,如图7(b)所

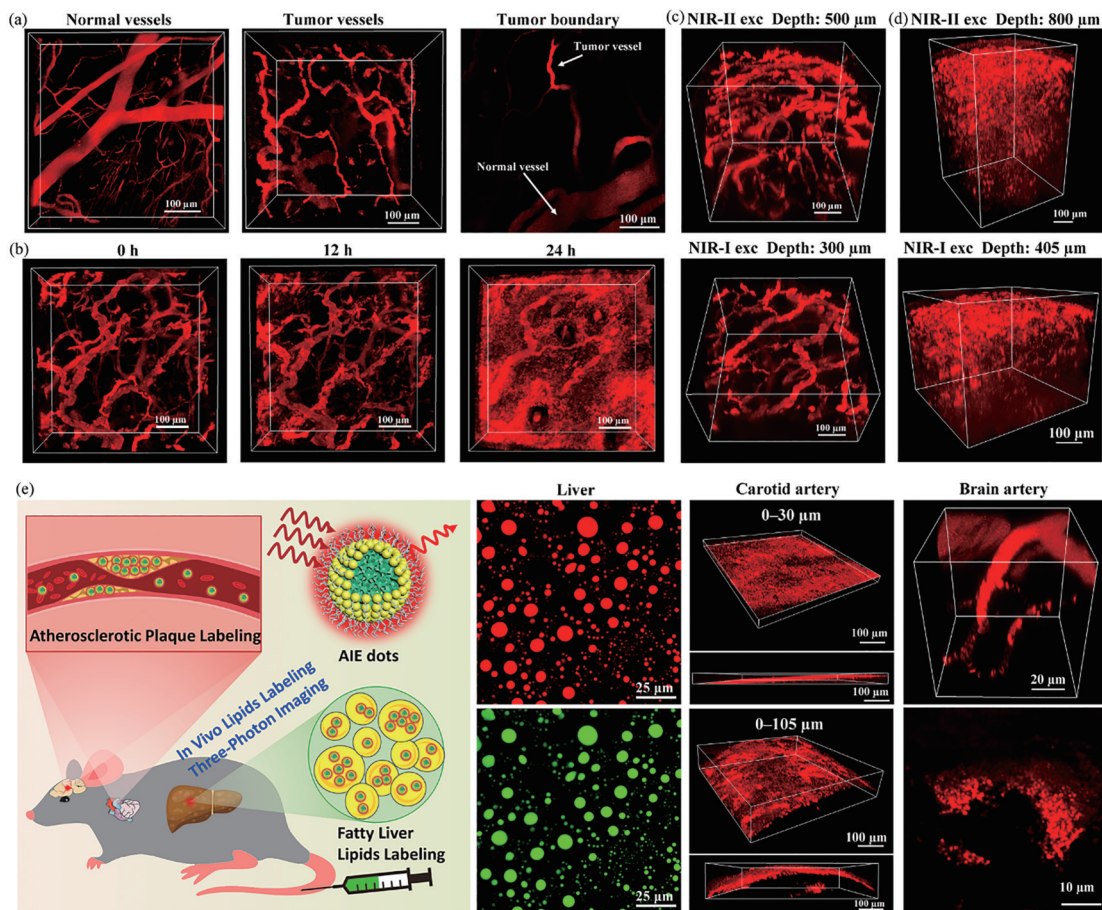


图7 肿瘤和心血管疾病多光子荧光成像。(a)近红外二区激发下的正常与肿瘤组织的血管网络活体双光子成像^[87]; (b)纳米颗粒在血液中的长时间循环^[87]; (c)近红外二区和一区激发下的肿瘤血管三维重构双光子荧光图^[87]; (d)近红外二区和一区激发下的纳米颗粒在肿瘤微环境中分布的三维重构双光子荧光图^[87]; (e)近红外二区激发下的脂肪肝、颈动脉和脑动脉中的脂质的活体三光子荧光成像^[99]

Fig. 7 Multiphoton fluorescence imaging of tumor and cardiovascular diseases. (a) *In vivo* two-photon fluorescence images of blood vessels in normal and tumor tissues under NIR- II excitation^[87]; (b) long time circulation of nanoparticle probes in blood^[87]; (c) 3D reconstructed two-photon fluorescence images of tumor blood vessel network under NIR- II and NIR- I excitations^[87]; (d) 3D reconstructed two-photon fluorescence images of nanoparticle distributions in tumor microenvironment under NIR- II and NIR- I excitations^[87]; (e) *in vivo* three-photon fluorescence imaging of lipids in fatty liver, carotid artery, and brain artery under NIR- II excitation^[99]

示。经过 24 h 后,纳米颗粒通过肿瘤血管进入肿瘤组织内部,通过多光子成像则可以观察纳米颗粒进入以及在肿瘤中的分布情况。通过对比近红外二区和一区激发下的肿瘤成像深度,发现近红外二区激发下血管网络成像深度达到 500 μm [如图 7(c)所示],肿瘤内颗粒分布深度达到 800 μm [如图 7(d)所示],而在近红外一区激发下血管网络深度为 300 μm ,肿瘤内颗粒分布深度为 405 μm 。这项研究强调了近红外二区可激发的多光子荧光成像在大深度实体肿瘤成像中的优势和重要作用,并且为研究纳米药物在肿瘤中的运输与动态分布提供了可靠的方案。

近些年的多项研究表明,脂质在代谢类疾病,包括糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝和动脉粥样硬化等中扮演着重要角色^[88-93]。但是目前大部分涉及脂质的生物学检测与分析都是在细胞和离体组织水平,在动物活体水平上研究脂质的动态发展具有非常大的挑战性。主要有两个方面的原因,一是目前的脂质检测技术(质谱和拉曼显微术等)很难应用于活体动物^[94-96],而现有的商业化脂质荧光染料具有较高疏水性(亲脂性),无法应用于生物体内脂质标记^[97-98]。基于多光子荧光成像与生俱来的活体动物成像能力,Wang 等^[99]设计开发了在水相环境中高度稳定的、可以在动物体内特异性标记脂滴(脂质在体内的存储形式)的纳米粒子探针。该探针在近红外二区具有较大的三光子吸收截面($2.45 \times 10^{-73} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2 \cdot \text{photon}^{-2}$),同时其在深红/近红外波段的荧光量子产率达到 26%。探针注射小鼠体内后可以特异性地标记肝脏中的脂滴及颈动脉和脑部血管中的动脉粥样硬化斑块(富含脂质的组织),在近红外二区(1200 nm)的激发下,三光子荧光成像实现了大深度的活体脂质成像,如图 7(e)所示。由于该探针在脂质内的大量富集,荧光信号得以增强,与双光子荧光成像相比展现出更好的信噪比和更大的成像深度。这项研究证明了活体标记脂质的可能性以及三光子荧光成像在动态监测体内疾病发展变化中的巨大优势。

5 总结和展望

近些年来,随着超短脉冲飞秒激光技术的不断发展,在近红外二区(1000~1700 nm)波段的光源日趋成熟、稳定,性能不断提升,并且成功地在多光子荧光成像中推广使用。首先介绍了多光子荧光显微成像的基本原理和构成激光扫描多光子显微镜

的系统,对系统内的各个关键部件做了简要分析。其次,对近红外光源,尤其是近红外二区光源在生物组织内的特性,主要是散射和吸收这两个影响传播能力的要素做了介绍和分析,并对目前在多光子荧光显微成像中广泛使用的固体激光器和新颖的光纤飞秒激光器做了介绍。随后,围绕深层组织成像这一中心,对近些年来近红外二区激发的多光子荧光成像技术在脑血管结构成像、脑神经元成像、经颅脑成像、肿瘤和心血管疾病中的应用研究进展做了讨论和分析。

近红外光源的使用,是多光子荧光成像最大的优势之一,再加之非线性的多光子激发,其在生物活体细胞分辨级的深组织成像中扮演着不可替代的角色。以传统的高功率固体激光器作为泵浦光源,在 OPO 和 OPA 等技术的辅助下,已经可以将飞秒脉冲激光从近红外一区红移至近红外二区,并且得到了较高性能的基本满足多光子激发的波长可调谐超短脉冲激光。同时,具有固定波长的、成本更低的光纤飞秒激光器也加速走进了多光子荧光成像的应用场景。通过对近红外二区光源在生物组织中吸收、散射等影响其衰减的参数进行综合分析,1300 nm 和 1700 nm 波段是多光子激发的最优“组织光学窗口”。从近些年来发展可以看出,在实际具体的应用场景,考虑到多光子染料的性能、生物样品的差异、激发光的性能等多种因素,1700 nm 波段的成像效果并非一定好于 1300 nm 波段^[63],甚至在近红外二区的其他波段,例如 1040, 1160, 1200 nm 等波长激发的多光子荧光成像也取得了与这两个“组织光学窗口”相媲美的效果。需要注意的是,在近红外二区波段,1000~1300 nm 区域的光源在荧光分子匹配的情况下可以实现双光子或者三光子激发,而在 1550~1700 nm 区域的光源则受限于目前荧光分子的吸收特性,主要还是三光子激发。三光子激发的优势在于长波长和更高阶的非线性所得到的更小限域(confinement)和更高信噪比,但是它也有明显的缺点,很多荧光染料的三光子吸收截面都过小,激发效率较低,需要更高的激发功率,而过高的激发功率会引起生物组织的热损伤,这在三光子荧光神经元成像中尤为明显。所以在同样的近红外二区激发光波长下,在成像信噪比并非主要限制因素时,更高效的双光子成像可能比三光子成像具有更大的优势。另一方面,目前近红外二区最为热门的研究方向是荧光发射峰在近红外二区的

单光子荧光成像,这些荧光染料的吸收峰已经开始红移至近红外一区波段,这就意味着这些染料分子有可能在 1700 nm 波段实现双光子激发。但是目前这些染料分子的荧光量子产率都远远低于传统的多光子染料,还不足以在多光子荧光成像中有较好的表现。随着荧光染料性能的不不断提升,加之高脉冲能量和高功率的飞秒脉冲激光器的发展,近红外二区激发下的双光子成像、三光子成像,或者两者融合的成像技术必定会为脑科学和重大疾病的大深度、高分辨、高信噪比成像带来更大的发展和突破。

参 考 文 献

- [1] Lichtman J W, Conchello J A. Fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 910-919.
- [2] Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto F H, et al. Introduction to confocal microscopy[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(12): e3.
- [3] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [4] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [5] Hoover E E, Squier J A. Advances in multiphoton microscopy technology[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(2): 93-101.
- [6] Kerr J N D, Denk W. Imaging *in vivo*: watching the brain in action[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008, 9(3): 195-205.
- [7] Shih A Y, Driscoll J D, Drew P J, et al. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012, 32(7): 1277-1309.
- [8] Wang S W, Xi W, Cai F H, et al. Three-photon luminescence of gold nanorods and its applications for high contrast tissue and deep *in vivo* brain imaging[J]. *Theranostics*, 2015, 5(3): 251-266.
- [9] del Bonis-O'Donnell J T, Chio L, Dorlhiac G F, et al. Advances in nanomaterials for brain microscopy[J]. *Nano Research*, 2018, 11(10): 5144-5172.
- [10] Lecoq J, Orlova N, Grewe B F. Wide. fast. deep: recent advances in multiphoton microscopy of *in vivo* neuronal activity[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2019, 39(46): 9042-9052.
- [11] Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen[J]. *Annalen Der Physik*, 1931, 401(3): 273-294.
- [12] He G S, Tan L S, Zheng Q D, et al. Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(4): 1245-1330.
- [13] Vogel A, Noack J, Hüttman G, et al. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues [J]. *Applied Physics B*, 2005, 81(8): 1015-1047.
- [14] Sibbett W, Lagatsky A A, Brown C T A. The development and application of femtosecond laser systems[J]. *Optics Express*, 2012, 20(7): 6989-7001.
- [15] Lefort C. A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2017, 50(42): 423001.
- [16] Young M D, Field J J, Sheetz K E, et al. A pragmatic guide to multiphoton microscope design[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2015, 7(2): 276-378.
- [17] Halbhauer K J, König K. Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine [J]. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2003, 185(1): 1-20.
- [18] Denk W, Piston D W, Webb W W. Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy [M]//Pawley J B. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston: Springer, 2006: 535-549.
- [19] Montagu J. Scanners: galvanometric and resonant [M]//*Encyclopedia of optical and photonic engineering*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2015: 1-22.
- [20] Wang K, Wen W H, Liu H J, et al. Transmittance characterization of objective lenses covering all four near infrared optical windows and its application to three-photon microscopy excited at 1820 nm[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2018, 10(3): 3900607.
- [21] Kim K H, Buehler C, Bahlmann K, et al. Multifocal multiphoton microscopy based on multianode photomultiplier tubes[J]. *Optics Express*, 2007, 15(18): 11658-11678.
- [22] Modi M N, Daie K, Turner G C, et al. Two-photon imaging with silicon photomultipliers[J]. *Optics Express*, 2019, 27(24): 35830-35841.
- [23] Giacomelli M G. Evaluation of silicon photomultipliers for multiphoton and laser scanning microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2019, 24(10): 106503.
- [24] Fang J N, Wang Y Q, Yan M, et al. Highly sensitive detection of infrared photons by nondegenerate

- two-photon absorption under midinfrared pumping[J]. *Physical Review Applied*, 2020, 14(6): 064035.
- [25] Bruschini C, Homulle H, Antolovic I M, et al. Single-photon avalanche diode imagers in biophotonics: review and outlook[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 87.
- [26] Ching-Roa V D, Olson E M, Ibrahim S F, et al. Ultrahigh-speed point scanning two-photon microscopy using high dynamic range silicon photomultipliers[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 5248.
- [27] Yang W J, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 349-359.
- [28] Hong G S, Antaris A L, Dai H J. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 10.
- [29] Xu C, Wise F W. Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(11): 875-882.
- [30] Matras G, Huot N, Baubeau E, et al. 10 kHz water-cooled Ti: sapphire femtosecond laser[J]. *Optics Express*, 2007, 15(12): 7528-7536.
- [31] Miller D R, Jarrett J W, Hassan A M, et al. Deep tissue imaging with multiphoton fluorescence microscopy [J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2017, 4: 32-39.
- [32] Mojzisova H, Vermot J. When multiphoton microscopy sees near infrared[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(5): 549-557.
- [33] Cerullo G, de Silvestri S. Ultrafast optical parametric amplifiers[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2003, 74(1): 1-18.
- [34] Tang S, Liu J, Krasieva T B, et al. Developing compact multiphoton systems using femtosecond fiber lasers[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(3): 030508.
- [35] Fermann M E, Hartl I. Ultrafast fibre lasers[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(11): 868-874.
- [36] Hu M L, Wang J, Fan J T. Research progress on fiber laser-pumped femtosecond optical parametric oscillators[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021(19): 1901001.
胡明列, 王珏, 范锦涛. 光纤激光器泵浦的飞秒光学参量振荡器研究进展[J]. *中国激光*, 2021(19): 1901001.
- [37] Tang S, Jung W, McCormick D T, et al. Design and implementation of fiber-based multiphoton endoscopy with microelectromechanical systems scanning[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(3): 034005.
- [38] Liu G J, Kieu K, Wise F W, et al. Multiphoton microscopy system with a compact fiber-based femtosecond-pulse laser and handheld probe[J]. *Journal of Biophotonics*, 2011, 4(1/2): 34-39.
- [39] Kieu K, Mehravar S, Gowda R, et al. Label-free multi-photon imaging using a compact femtosecond fiber laser mode-locked by carbon nanotube saturable absorber[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(10): 2187-2195.
- [40] Liu W, Li C, Zhang Z G, et al. Self-phase modulation enabled, wavelength-tunable ultrafast fiber laser sources: an energy scalable approach[J]. *Optics Express*, 2016, 24(14): 15328-15340.
- [41] Li B, Wang M R, Charan K, et al. Investigation of the long wavelength limit of soliton self-frequency shift in a silica fiber[J]. *Optics Express*, 2018, 26(15): 19637-19647.
- [42] Wang K, Qiu P. Optimal spectral filtering in soliton self-frequency shift for deep-tissue multiphoton microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(5): 055003.
- [43] Delahaye H, Hage C H, Bardet S M, et al. Generation of megawatt soliton at 1680 nm in very large mode area antiresonant fiber and application to three-photon microscopy[J]. *Journal of Optics*, 2021, 23(11): 115504.
- [44] Li C, Shi J W, Gong X J, et al. 1.7 μm wavelength tunable gain-switched fiber laser and its application to spectroscopic photoacoustic imaging[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(23): 5849-5852.
- [45] Firstov S V, Alyshev S V, Riumkin K E, et al. Watt-level, continuous-wave bismuth-doped all-fiber laser operating at 1.7 μm [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(18): 4360-4363.
- [46] Pawlicki M, Collins H A, Denning R G, et al. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes [J]. *Angewandte Chemie*, 2009, 48(18): 3244-3266.
- [47] Kim H M, Cho B R. Small-molecule two-photon probes for bioimaging applications[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(11): 5014-5055.
- [48] Wang S W, Liu J, Feng G X, et al. NIR-II excitable conjugated polymer dots with bright NIR-I emission for deep *in vivo* two-photon brain imaging through intact skull[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(15): 1808365.
- [49] Alivisatos A P, Andrews A M, Boyden E S, et al. Nanotools for neuroscience and brain activity mapping

- [J]. ACS Nano, 2013, 7(3): 1850-1866.
- [50] Otte A, Halsband U. Brain imaging tools in neurosciences[J]. Journal of Physiology-Paris, 2006, 99(4/5/6): 281-292.
- [51] Kobat D, Horton N G, Xu C. *In vivo* two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex[J]. Journal of Biomedical Optics, 2011, 16: 106014.
- [52] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. Nature Photonics, 2013, 7(3): 205-209.
- [53] Miller D R, Hassan A M, Jarrett J W, et al. *In vivo* multiphoton imaging of a diverse array of fluorophores to investigate deep neurovascular structure[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(7): 3470-3481.
- [54] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels[J]. Nature Methods, 2008, 5(9): 763-775.
- [55] Liu H J, Deng X Q, Tong S, et al. *In vivo* deep-brain structural and hemodynamic multiphoton microscopy enabled by quantum dots[J]. Nano Letters, 2019, 19(8): 5260-5265.
- [56] Hassan A M, Wu X, Jarrett J W, et al. Polymer dots enable deep *in vivo* multiphoton fluorescence imaging of microvasculature[J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(2): 584-599.
- [57] Qian J, Zhu Z F, Qin A J, et al. High-order nonlinear optical effects in organic luminogens with aggregation-induced emission[J]. Advanced Materials, 2015, 27(14): 2332-2339.
- [58] Wang Y L, Hu R R, Xi W, et al. Red emissive AIE nanodots with high two-photon absorption efficiency at 1040 nm for deep-tissue *in vivo* imaging[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(10): 3783-3794.
- [59] Wang Y, Han X, Xi W, et al. Bright AIE nanoparticles with F127 encapsulation for deep-tissue three-photon intravital brain angiography[J]. Advanced Healthcare Materials, 2017, 6(21): 1700685.
- [60] Samanta S, Huang M N, Li S Q, et al. AIE-active two-photon fluorescent nanoprobe with NIR-II light excitability for highly efficient deep brain vasculature imaging[J]. Theranostics, 2021, 11(5): 2137-2148.
- [61] Lou X D, Zhao Z J, Tang B Z. Organic dots based on AIEgens for two-photon fluorescence bioimaging[J]. Small, 2016, 12(47): 6430-6450.
- [62] Liu M X, Gu B B, Wu W B, et al. Binary organic nanoparticles with bright aggregation-induced emission for three-photon brain vascular imaging[J]. Chemistry of Materials, 2020, 32(15): 6437-6443.
- [63] Hontani Y, Xia F, Xu C. Multicolor three-photon fluorescence imaging with single-wavelength excitation deep in mouse brain[J]. Science Advances, 2021, 7(12): eabf3531.
- [64] Wang T Y, Xu C. Three-photon neuronal imaging in deep mouse brain[J]. Optica, 2020, 7(8): 947-960.
- [65] Ouzounov D G, Wang T Y, Wang M R, et al. *In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain[J]. Nature Methods, 2017, 14(4): 388-390.
- [66] Yildirim M, Sugihara H, So P T C, et al. Functional imaging of visual cortical layers and subplate in awake mice with optimized three-photon microscopy[J]. Nature Communications, 2019, 10: 177.
- [67] Chow D M, Sinefeld D, Kolkman K E, et al. Deep three-photon imaging of the brain in intact adult zebrafish[J]. Nature Methods, 2020, 17(6): 605-608.
- [68] Tischbirek C, Birkner A, Jia H B, et al. Deep two-photon brain imaging with a red-shifted fluorometric Ca^{2+} indicator[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): 11377-11382.
- [69] Weisenburger S, Tejera F, Demas J, et al. Volumetric Ca^{2+} imaging in the mouse brain using hybrid multiplexed sculpted light microscopy[J]. Cell, 2019, 177(4): 1050-1066.
- [70] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2017, 14(4): 374-380.
- [71] Yang Y H, Chen W, Fan J L, et al. Adaptive optics enables aberration-free single-objective remote focusing for two-photon fluorescence microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2020, 12(1): 354-366.
- [72] Streich L, Boffi J C, Wang L, et al. High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy[J]. Nature Methods, 2021, 18(10): 1253-1258.
- [73] Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow D K, et al. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window[J]. Nature Protocols, 2009, 4(8): 1128-1144.
- [74] Drew P J, Shih A Y, Driscoll J D, et al. Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull[J]. Nature Methods, 2010, 7(12): 981-984.
- [75] Yang G, Pan F, Parkhurst C N, et al. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice[J]. Nature Protocols, 2010, 5

- (2): 201-208.
- [76] Wang T Y, Ouzounov D G, Wu C Y, et al. Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(10): 789-792.
- [77] Wang K, Du Y, Liu H J, et al. Visualizing the “sandwich” structure of osteocytes in their native environment deep in bone *in vivo*[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): e201800360.
- [78] Wang Y L, Chen M, Alifu N, et al. Aggregation-induced emission luminogen with deep-red emission for through-skull three-photon fluorescence imaging of mouse[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(10): 10452-10461.
- [79] Liu Y L, Yi Y, Li Z, et al. Multiphoton microscopy for monitoring the occurrence, metastasis and therapy of breast cancer[J]. *Microwave and Optical Technology Letters*, 2021, 63(10): 2470-2491.
- [80] Perrin L, Bayarmagnai B, Gligorijevic B. Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer[J]. *Cancer Reports*, 2020, 3(1): e1192.
- [81] Baugh L M, Liu Z Y, Quinn K P, et al. Non-destructive two-photon excited fluorescence imaging identifies early nodules in calcific aortic-valve disease [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1(11): 914-924.
- [82] Zhang R L, Li H, Wu Y H, et al. Identification of human coronary atherosclerotic plaques using spectrum- and time-resolved multiphoton microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207025. 张荣丽, 李慧, 吴岳恒, 等. 利用光谱和时间分辨的多光子显微技术识别人体冠状动脉粥样硬化斑块 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207025.
- [83] Li Y, Shen B, Zou G, et al. Super-multiplex nonlinear optical imaging unscrambles the statistical complexity of cancer subtypes and tumor microenvironment [J]. *Advanced Science*, 2021, 9(5): e2104379.
- [84] Singh A K, Nair A V, Singh N D P. Small two-photon organic fluorogenic probes: sensing and bioimaging of cancer relevant biomarkers[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(1): 177-192.
- [85] Sindhvani S, Syed A M, Ngai J, et al. The entry of nanoparticles into solid tumours[J]. *Nature Materials*, 2020, 19(5): 566-575.
- [86] Tozer G M, Kanthou C, Baguley B C. Disrupting tumour blood vessels[J]. *Nature Reviews. Cancer*, 2005, 5(6): 423-435.
- [87] Wang S W, Liu J, Goh C C, et al. NIR-II-excited intravital two-photon microscopy distinguishes deep cerebral and tumor vasculatures with an ultrabright NIR-I AIE luminogen[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(44): e1904447.
- [88] Hodson L, Gunn P J. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15(12): 689-700.
- [89] Gluchowski N L, Becuwe M, Walther T C, et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 14(6): 343-355.
- [90] Petersen M C, Vatner D F, Shulman G I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(10): 572-587.
- [91] Wei X C, Song H W, Yin L, et al. Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes[J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 294-298.
- [92] Mutlu A S, Gao S M, Zhang H N, et al. Olfactory specificity regulates lipid metabolism through neuroendocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1450.
- [93] Kuznetsova T, Prange K H M, Glass C K, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis[J]. *Nature Reviews. Cardiology*, 2020, 17(4): 216-228.
- [94] Folick A, Min W, Wang M C. Label-free imaging of lipid dynamics using Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(5): 585-590.
- [95] Zumbusch A, Langbein W, Borri P. Nonlinear vibrational microscopy applied to lipid biology[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(4): 615-632.
- [96] Thiele C, Wunderling K, Leyendecker P. Multiplexed and single cell tracing of lipid metabolism[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1123-1130.
- [97] Mehlem A, Hagberg C E, Muhl L, et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(6): 1149-1154.
- [98] Fam T K, Klymchenko A S, Collot M. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets[J]. *Materials*, 2018, 11(9): 1768.
- [99] Wang S W, Li X Q, Chong S Y, et al. *In vivo* three-photon imaging of lipids using ultrabright fluorogens with aggregation-induced emission[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(11): e2007490.