

高光谱相干拉曼散射技术及其应用

吴凡¹, 李商羽², 洪维礼^{1***}, 岳蜀华^{1**}, 王璞^{1*}

¹北京航空航天大学生物与医学工程学院北京市生物医学工程高精尖创新中心, 北京 100191;

²北京大学生物医学前沿创新中心, 北京, 100871

摘要 生物样品存在着丰富的物质信息,每一种物质都有其自身独特的性质及功能,对这些物质在生物体内的产生、转运、分布等进行研究可以使我们更加深入地了解生物系统。具备良好化学特异性的光学显微镜为这些研究提供了强大且可靠的工具。拉曼散射技术由于解决了荧光显微镜所需的外源性标记所带来的问题,极大地促进了生物医学的发展。高光谱相干拉曼散射(hyperspectral coherent Raman scattering, HS-CRS)技术可对不同成分物质进行无标记化学成像,通过同时提供图像和光谱信息,对样品内物质的性质、含量和分布状况做出判断,为科研人员提供了更多维度的物质信息。HS-CRS技术在近几十年内进行了不断的技术更新并在生物医学领域完成新的技术应用,本文对主要的HS-CRS技术的实现形式及方案进行了介绍,并总结了HS-CRS技术在生物医学领域的应用。

关键词 高光谱成像; 相干拉曼散射显微术; 无标记成像; 医用光子学

中图分类号 Q-334

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617003

Hyperspectral Coherent Raman Scattering and Its Applications

Wu Fan¹, Li Shangyu², Hong Weili^{1***}, Yue Shuhua^{1**}, Wang Pu^{1*}

¹Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing, 100191, China;

²Biomedical Pioneering Innovation Center (BIOPIC), Peking University, Beijing, 100871, China

Abstract There is abundant material information in biological samples, and each material has its unique properties and functions. Research on the production, transportation, and distribution of these materials in organisms can give us a deep understanding of biological systems. Optical microscopes with chemical specificity are powerful and reliable tools for these studies. Raman scattering technology has greatly promoted the development of biomedicine because it solves the problems caused by the fluorescence microscope. Especially, hyperspectral coherent Raman scattering (HS-CRS) microscope can perform label-free chemical imaging of substances with different components. By providing image and spectral information at the same time, the properties, content and distribution of substances in the sample can be determined. It provides scientific researchers with more dimensional material information. In recent decades, HS-CRS has been continuously updated and applied in the biomedical field. This paper introduces the main HS-CRS implementation and schemes and summarizes its application in the biomedical field.

Key words hyperspectral imaging; coherent Raman scattering microscopy; label-free imaging; medical photonics

收稿日期: 2021-12-14; 修回日期: 2022-01-26; 录用日期: 2022-01-27

基金项目: 京津冀基础研究合作专项 (19JCZDJC65500(Z))

通信作者: *10318@buaa.edu.cn; **yue_shuhua@buaa.edu.cn; ***weilihong@buaa.edu.cn

1 引言

光学显微镜利用光学显微成像技术将人类的视野从宏观世界引入微观世界,自发明后就成为人类探索微观世界的有力工具。在生物医学领域,光学显微镜也扮演着极其重要的角色。传统的光学显微镜,如明场显微镜,是依靠样品本身对光的吸收、散射和折射率变化差异来进行成像,可对样品在光照下的实际情况进行探查,但是并不具备化学特异性。荧光显微镜的出现弥补了这一劣势,其可利用荧光基团对不同的化学物质进行特异性标记,进而获得标记物在样品内的分布情况,这一发明极大地促进了生物医学的发展^[1]。尽管荧光显微镜帮助科学家们完成了众多突破性的科学研究发现,但是它也存在很大的局限性。大部分荧光基团的尺寸要大于生物体内许多小分子物质如 DNA、RNA 等,对其进行荧光标记后会影响到其正常的分子功能和结构^[2-3]。并且荧光基团还存在光漂白以及潜在的光毒性等问题。因而就需要一种无需标记并且同时对样品具有化学特异性的显微成像方式。

自发拉曼散射(spontaneous Raman scattering)现象于 20 世纪 20 年代由 Raman 及其合作者^[4]发现,随后发展成为自发拉曼散射显微技术用以探测样品内所包含的化学成分。随着自发拉曼散射显微技术的出现,化学标记的方法不再是获取样品中化学信息的首要方法。基于拉曼散射原理的相干拉曼散射(coherent Raman scattering, CRS)显微技术,克服了自发拉曼信号强度弱的缺点^[5-6]。由于相干拉曼散射现象只发生在焦点附近的极小范围内,所以其本能地拥有三维成像能力,同时由于相干拉曼散射显微镜可对生物样品进行无标记、无损伤的特异性成像,因此其在生物成像领域得到了广泛的应用^[7]。高光谱相干拉曼散射(hyperspectral coherent Raman scattering, HS-CRS)显微镜的出现填补了 CRS 显微镜成像过程中缺失样品拉曼光谱信息的缺陷,为生物医学研究提供了更多维度的特异性信息,进一步促进了生物医学领域的发展。本文对基于拉曼散射的显微成像技术进行简要介绍,对 HS-CRS 显微镜的不同技术形态进行概述,并简述了 HS-CRS 成像技术在生物医学中的应用。

2 相干拉曼散射显微成像技术概述

相干拉曼散射效应是一种非线性光学现象,主

要包括相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)^[8-10]和受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)^[11-13]两种形式。

2.1 相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术

CARS 现象的首次发现可追溯到 1965 年,由美国福特汽车公司的研究人员发现并报道^[15]。1982 年 Duncan 及其合作者^[8]搭建了第一台 CARS 显微镜。到 1999 年, Zumbusch 及其合作者^[9]奠定了现代 CARS 显微镜的基础构型;该方案利用一台 250 kHz 高重复频率的超快激光器搭建了泵浦(pump)光和斯托克斯(Stokes)光共线并紧密聚焦的光路几何结构。在随后的几十年时间内,各种基于 CARS 显微镜的技术不断出现并应用于生物医学领域。

CARS 是一个非线性光学四波混频过程,在这个过程中通常利用泵浦光和斯托克斯光对样品进行激发,其频率分别为 ω_p 和 ω_s , CARS 过程中的能级变化和光谱变化如图 1 所示。两束光通过物镜同时聚焦于样品的同一个位置,与样品发生相互作用。当两束光的频率差 $\omega_p - \omega_s$ 与所要探测的拉曼活性分子的振动频率 Ω_R 满足共振条件 $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$, 且同时满足相位匹配条件 $k_A = 2k_p \pm k_s$ 时,将激发出一束新的频率为 $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$ 的反斯托克斯光^[7, 16]。

CARS 信号的产生是一个三阶非线性光学过程,其信号强度的组成^[7, 17-18]可表示为

$$I_{\text{CARS}}(\Delta) \propto \left| \chi_{\text{NR}}^{(3)} \right|^2 + \left| \chi_{\text{R}}^{(3)}(\Delta) \right|^2 + 2\chi_{\text{NR}}^{(3)} \text{Re} \chi_{\text{R}}^{(3)}(\Delta), \quad (1)$$

式中: $\chi_{\text{NR}}^{(3)}$ 代表非共振部分; $\chi_{\text{R}}^{(3)}$ 代表共振部分; $\Delta = \omega_p - \omega_s - \Omega_R$ 表示失谐量。式中各项的含义可由图 2 形象地反映出来。第一项对应一个恒定的背景信号,与失谐量无关,在全光谱范围内为一个常量。第二项为共振信号,是所需要的特异性拉曼信号,其与探测样品内包含的振子数相关,在 $\Delta = 0$ 处为峰值位置,在两侧不断递减并呈对称分布。第三项为共振信号与非共振背景的耦合项。耦合项的存在使 CARS 信号变得复杂,其使 CARS 光谱相对于自发拉曼光谱发生扭曲和移动,给实验中波长的选择和结果中物质的指认造成极大困难。同时,由于非共振背景的存在,一些微弱的信号,尤其是指纹区内的信号会被湮没,造成对结果的错误判断。

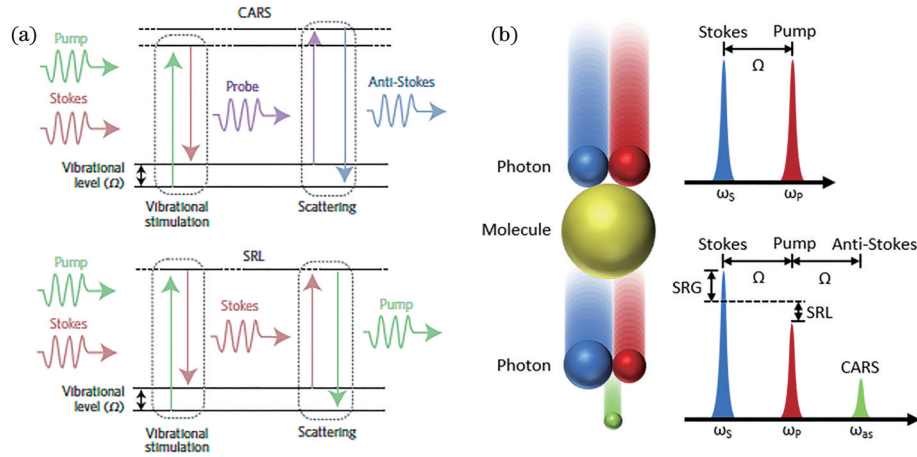


图 1 相干拉曼散射过程的能级变化图及光谱图。(a)相干拉曼散射过程中的能级变化图,上方为 CARS 过程,下方为受激拉曼损失(stimulated Raman loss, SRL)过程^[14]。在 CARS 过程中,泵浦(pump)光子和斯托克斯(Stokes)光子激发一个振动,在这个振动中探测光子发生了非弹性散射。在 SRL 过程中,pump 光子和 Stokes 光子激发分子振动,能量从 pump 光转移到 Stokes 光。(b)相干拉曼散射过程中的光谱变化,上方为输入光,下方为输出光

Fig. 1 Energy and spectrum diagrams of CRS process. (a) Energy diagrams of CRS process, the upper part is the CARS process and the lower part is the SRL process^[14]. In CARS process, a pump photon and a Stokes photon stimulate a vibration from which a probe photon inelastically scatters. In SRL process, a pump photon and a Stokes photon excite a molecular vibration, resulting in energy transfer from the pump to the Stokes; (b) spectrum diagrams of CRS process, the upper part is the input light, and the lower part is the output light

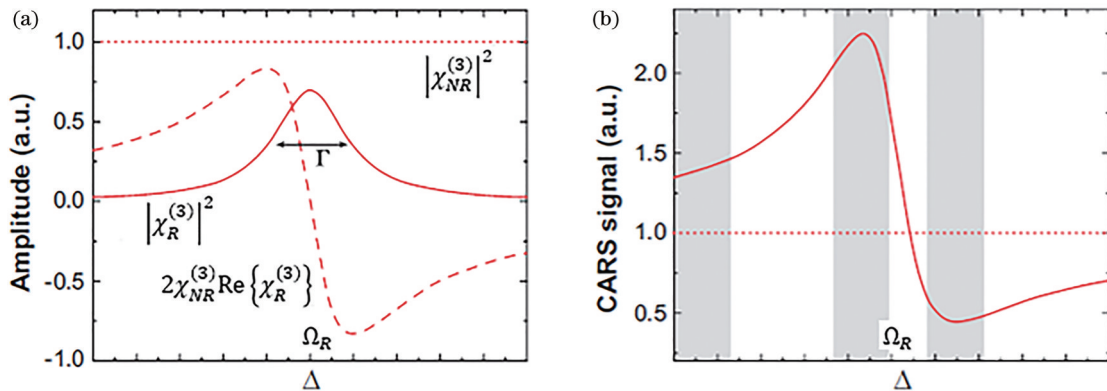


图 2 CARS 信号构成情况^[17]。(a)作为失谐函数绘制的 CARS 信号三个分量;(b)总体的 CARS 信号,实线代表图(a)中各分量的总和,点线为非共振背景

Fig. 2 Signal composition of CARS^[17]. (a) Three components of the CARS signal plotted as a function of detuning; (b) total CARS signal, the solid line represents the sum of the contributions from Fig. (a), while the dotted line represents the nonresonant background

2.2 受激拉曼散射显微成像技术

SRS 现象首次发现于 1962 年^[19],在随后的几十年时间内 SRS 技术一直作为一种光谱技术被使用。2008 年,谢晓亮研究组^[12]首先将 SRS 技术用于显微成像,研究了 SRS 显微成像技术。

SRS 和 CARS 相同,需要用两束满足共振条件的激光在同一时间同一位置对样品进行激发。如图 1 所示,在 SRS 过程中,入射光和分子之间发生能量交换,泵浦光会损失一个光子转变为斯托克斯

光。这样,在相互作用后,泵浦光能量降低,发生受激拉曼损失(stimulated Raman loss, SRL),而斯托克斯光能量升高,发生受激拉曼增益(stimulated Raman gain, SRG)^[7, 16]。通过对 SRL 或 SRG 的测量,就可以得到 SRS 信号。

SRS 作为一个受激过程,只有在严格满足共振条件 $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$ 的情况下才能发生,因此本质上不会出现类似于 CARS 的非共振背景,这也使得 SRS 光谱与自发拉曼光谱完全一致,且可以相互进

行比对。在 SRS 过程中, SRL 和 SRG 的强度^[2,7]表示为

$$\Delta I_{\text{Stokes}} \propto N \times \sigma_{\text{Raman}} \times I_{\text{pump}} \times I_{\text{Stokes}}, \quad (2)$$

$$\Delta I_{\text{pump}} \propto -N \times \sigma_{\text{Raman}} \times I_{\text{pump}} \times I_{\text{Stokes}}, \quad (3)$$

式中: N 为探测化学键的浓度; σ_{Raman} 是拉曼散射截面积。从中可看出 SRS 信号与被测物的浓度成正比, 这使得利用 SRS 进行成分的定量分析更为简便。SRS 信号较自发拉曼信号有很大程度的提升, 但整体来说 SRG 和 SRL 依旧很微弱, 激光的强度波动和噪声会对 SRS 信号的测量带来很大困难, 所以相对于 CARS, SRS 对激光器有着更高的要求, 这也在一定程度上限制了 SRS 的应用。

3 高光谱相干拉曼散射显微成像技术概述

传统的 CRS 显微成像技术通常利用带宽较窄的皮秒脉冲激光对单独的拉曼特征峰进行激发, 获取其图像信息, 称为单色 CRS 显微镜 (single-color CRS microscopy)。但在大多数情况下, 生物样品中许多分子的拉曼特征峰相互间会高度重叠, 甚至多色 CRS 显微镜 (multi-color CRS microscopy) 也很难对其化学成分进行有效的区分^[2,20]。为了填补 CRS 显微镜缺少光谱信息的空白, 可同时获得图像中每一个像素点位置处样品的拉曼光谱信息的 HS-CRS 显微镜应运而生。

3.1 基于波长扫描的高光谱相干拉曼散射显微技术

在实现 HS-CRS 显微镜的方案中, 最简单的一种就是在单色 CRS 显微镜中对其中一束激发光进行连续的波长调谐^[21]。如图 3 所示, 在不同频率的共振条件下, 每一个波长位置都将形成一幅二维 CRS 图像, 这些二维图像将同时随着波长的调谐构成一个三维图像栈。这样就可以得到被测样品随探测频率 Ω_r 变化而产生的信号强度变化, 从而得到二维图像内每一个像素点位置处样品的信号强度变化, 即每一个像素点的拉曼光谱。

为了实现对波长的连续调谐, 一些课题组使用了光学参量振荡器 (optical parametric oscillator, OPO)。OPO 内部通常使用温度调谐的、非临界相位匹配的 LBO (LiB_3O_5) 晶体进行参数转换, 通过对 LBO 晶体温度的控制进行对激光波长的调谐, 更加精细的波长调谐将通过 OPO 腔内的利奥滤波器 (Lyot filter) 完成^[22-24]。通过对 OPO 各项参数的控

制就可以实现连续的波长调谐, 完成高光谱成像。Suhaim 等^[24]利用计算机对 OPO 的晶体温度和腔长进行控制实现了基于波长扫描的 HS-CRS 系统, 他们的系统最快可以在约 10 min 内提供多于 50 幅高光谱图像。Garbacik 等^[25]在 CARS 显微镜中实现了更快的 OPO 扫描速度, 其调谐速度可达到 1.1 frame/s。OPO 技术发展至今已具有非常成熟的商业化设备, 利用 OPO 在激光器层面对 CRS 系统进行改造可在不破坏传统 CRS 显微镜原始结构的基础上实现 HS-CRS, 但受限于波长调谐速度, 该方案很难对活体细胞、微生物和组织等动态系统进行实时的高光谱成像^[26]。

除了利用传统的固体激光器搭配 OPO 对波长进行调节, 也可以利用光纤激光器实现基于波长扫描的 HS-CRS 技术。Bégin 等^[27]使用一台快速调谐的可编程激光器 (programmable laser, PL) 对 Stokes 光进行快速的波长调谐, 最高可以 10 kHz 的调谐频率对宽度为 250 cm^{-1} 的光谱进行扫描成像, 其光谱分辨率可达到 2 cm^{-1} 。PL 主要基于色散调谐和主动锁模方案^[28], 色散结构为 4 个啁啾光纤布拉格光栅 (chirped fiber Bragg grating, CFBG)。4 个 CFBG 可为不同的波长创造不同的腔长, 使他们以不同的重复频率运行。随后通过改变电光调制器 (electro-optic modulator, EOM) 的驱动频率对波长进行调谐。DePaoli 等^[29]也利用 PL 实现了对灵长类完整脑组织的鉴定。Karpf 等^[30]使用全光纤的连续波 (continuous wave, CW) 激光器, 利用时间编码技术实现了宽带的 HS-SRS 显微成像。CW 激光器可以输出周期循环变化的不同波长的激光作为 Stokes 光, 不同波长的激光在时域上连续分布, 当与固定波长的 pump 光相互作用时, 将在时域上产生随时间变化的拉曼光谱, 即时间编码。利用以上技术, Karpf 等将光谱范围提升到约 2400 cm^{-1} , 光谱分辨率为 3 cm^{-1} 。随着激光技术的发展, 用于光纤激光器的 OPO 设备 (FOPO) 也随之出现, Pence 等^[31]使用具有 FOPO 的光纤激光器实现了 HS-SRS 显微成像。

通过利用脉冲整形技术也可以对宽带宽的飞秒脉冲激光进行波长调谐。如图 4(a) 所示, 利用光栅、透镜和狭缝组成 $4f$ 系统或折叠 $4f$ 系统, 将光栅置于透镜的焦点上, 狭缝置于透镜的焦平面处, 形成脉冲整形装置。宽带宽的飞秒脉冲激光经光栅发生色散, 不同波长的激光在空间内均匀分布并通过透镜聚焦于焦平面上, 通过变换焦平面处狭缝的

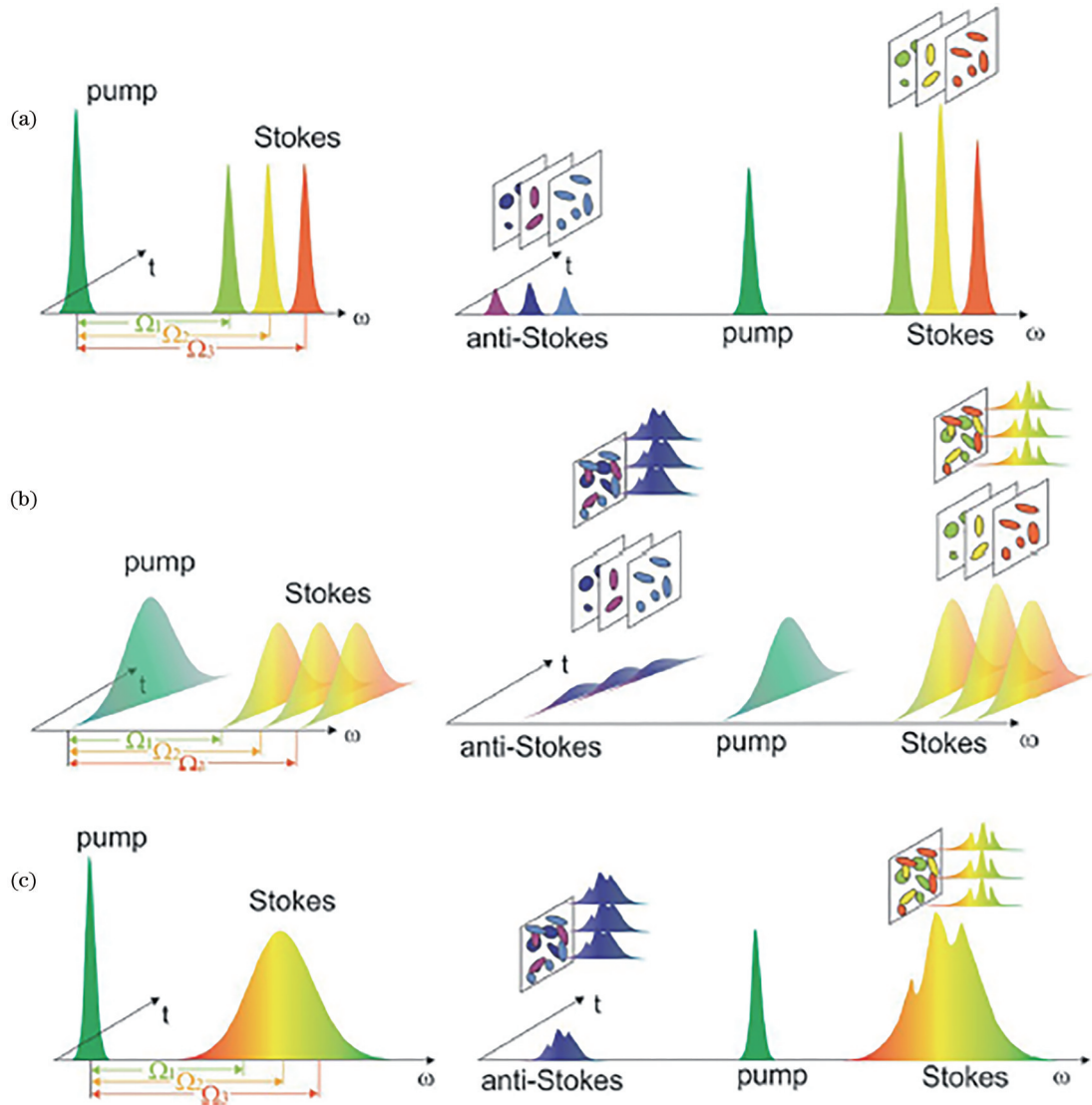


图 3 高光谱 CRS 显微镜的不同实现方法^[20]。(a)对窄带 pump 光和 Stokes 光进行频率调谐的 CRS 显微镜；(b)对宽带 pump 光和 Stokes 光进行光谱聚焦的 CRS 显微镜；(c)采用窄带 pump 光和宽带 Stokes 光的复合带宽 CRS 显微镜

Fig. 3 Methods for hyperspectral CRS microscopy^[20]. (a) CRS microscopy based on frequency tuning of narrowband pump and Stokes beams; (b) CRS microscopy based on spectral focusing of broadband pump and Stokes beams; (c) multiplex CRS microscopy using a narrowband pump beam and a broadband Stokes beam

位置可对不同波长的激光进行筛选,筛选后的激光通过透镜和光栅成为窄带激光,筛选后激光的带宽取决于狭缝的宽度。通过对狭缝的连续移动就可以完成波长调谐并进行高光谱显微成像。Zhang 等^[26]利用脉冲整形装置将带宽为 20 nm 的飞秒脉冲激光缩减为带宽为 10 cm^{-1} 的窄带激光,并利用自动化的狭缝在 3~4 min 内对生物组织进行了高光谱成像(每个图像栈包含 80 幅 SRS 图像)。Huang 等^[32]和 Yan 等^[33]也利用该技术实现了 HS-CRS 技术,并对细胞和生物组织样品进行了相关研究。Ozeki 等^[34-35]将脉冲整形系统进行了变形,将一维振镜代

替光栅放置在 $4f$ 系统的第一个焦点位置,同时取消了狭缝(图 4(b))。随着振镜的扫描,激光经过透镜后照射在光栅上的角度发生变化,导致从 $4f$ 系统原路返回的激光波长发生变化,从而实现了激光波长的控制。该系统可实现 225 cm^{-1} 的光谱扫描范围和 3.3 cm^{-1} 的光谱分辨率。Laptenok 等^[36]利用脉冲整形装置将宽带的 Stokes 光变为窄带激光,利用声光可调滤波器(acousto-optical tunable filter, AOTF)对 pump 光进行快速的波长调谐同时将其变成窄带激光,实现了光谱范围约为 2600 cm^{-1} ($800 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$) 的超宽 HS-SRS 显微成像。

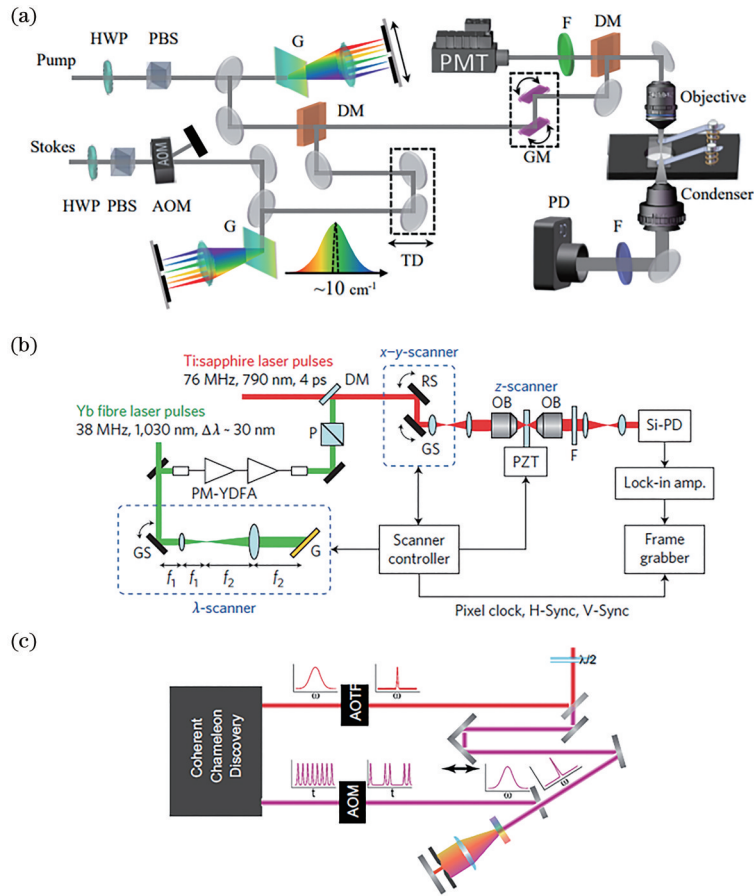


图 4 不同方式的波长扫描方案。(a)通过脉冲整形装置利用狭缝对波长进行快速扫描^[33]; (b)通过振镜控制入射角度,利用光栅在不同角度下在同一位置的衍射光波长不同,进行快速的波长扫描^[34]; (c)利用 AOTF 对宽带激光进行快速的波长扫描^[36]
 Fig. 4 Different methods for wavelength scanning. (a) Rapid wavelength scanning is performed using the slit of the pulse shaper^[33]; (b) galvanometer can control the incident angle, and the wavelength of the diffracted light in the same position changes while the angle changes, thus rapid wavelength scanning can be performed by controlling the galvanometer^[34]; (c) rapid wavelength scanning is performed by AOTF for broadband laser^[36]

3.2 基于光谱聚焦技术的高光谱相干拉曼散射显微技术

光谱聚焦 (spectral focusing, SF) 的方案最早由 Hellerer 等^[37] 提出并应用于 CARS 显微成像, 其高光谱原理如图 3(b) 所示, 文章指出 SF 方案可用于提升基于宽带飞秒脉冲激光的非线性光谱成像技术并提高 CRS 显微成像技术的光谱分辨率。随着非线性光学显微技术的不断发展与成熟, SF 技术逐渐演变为实现高光谱 CRS 成像的重要手段, 被广泛应用于 HS-CARS 和 HS-SRS 显微成像研究。

SF 方案的原理如图 5 所示, 通过对宽带飞秒脉冲激光引入线性啁啾, 由于群速度色散 (group velocity dispersion, GVD) 的存在, 两束激励脉冲的频率成分将在时域上均匀分散, 啁啾后的脉冲瞬时光谱带宽将比变换受限脉冲 (transform-limited

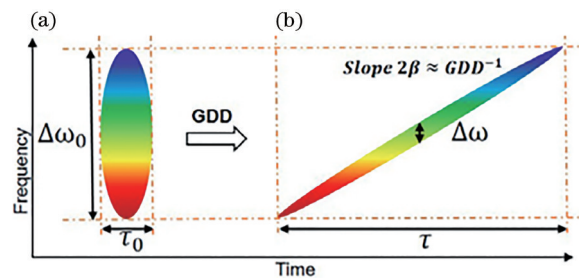


图 5 频率-时间分布图, 即所谓的维格纳分布。(a)对于傅里叶变换受限激光脉冲; (b)对于相同的经过线性啁啾的激光脉冲^[38]

Fig. 5 Frequency-time distribution, the so-called Wigner distribution. (a) For a Fourier-transform limited laser pulse; (b) for the same laser pulse that is linearly chirped

pulse) 窄得多。经过线性啁啾后, 脉冲的瞬时中心频率与原始脉冲中心频率之间的关系^[38]可表示为

$$\omega(t) = \omega_0 + 2\beta \cdot t, \quad (4)$$

式中, β 代表了在线性啁啾后脉冲中心频率处的线性斜率, 即线性啁啾参数。傅里叶变换将线性啁啾参数 β 和群延迟色散 (group delay dispersion, GDD) 联系起来^[38]:

$$\beta = \frac{2d_{\text{GDD}}}{\tau_0^4 + 4d_{\text{GDD}}^2} \approx \frac{1}{2d_{\text{GDD}}}. \quad (5)$$

当 $\tau \gg \tau_0$ 时, GDD 的存在将变换受限脉冲的脉冲宽度 τ_0 伸长为啁啾脉冲宽度 τ ^[38]:

$$\tau = \tau_0 \sqrt{1 + \left[\frac{4\ln 2 \cdot d_{\text{GDD}}}{\tau_0^2} \right]^2} \approx 2.77 \frac{|d_{\text{GDD}}|}{\tau_0}. \quad (6)$$

如图 6 所示, 当 pump 光和 Stokes 光同时经过线性啁啾后, 只有在两束光的线性啁啾参数 β 相同时, 两束激光之间的瞬时频率差 (instantaneous frequency difference, IFD) 为一个恒定的常数, 且其差值最小, 才拥有最好的光谱分辨率。在 CRS 显微成像技术中, 光谱分辨率 $\Delta\tilde{\nu}$ ^[38] 可表示为

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{2\ln 2}{\pi c} \sqrt{2(\tau_p^{-2} + \tau_s^{-2})} = 20.8 \sqrt{\tau_p^{-2} + \tau_s^{-2}}, \quad (7)$$

式中: τ_p 代表 pump 光的脉冲宽度; τ_s 代表 Stokes 光的脉冲宽度。这个方程适用于傅里叶变换受限脉

冲或者具有相同线性啁啾参数的啁啾脉冲。当两束光的线性啁啾参数不同时, HS-CRS 的光谱分辨率将受到不同程度的影响 (图 6(c))。两束光线性啁啾参数 β 之间的区别, 会引入一个附加项 $\Delta\tilde{\nu}_{\Delta\beta}$, 导致光谱分辨率恶化^[38]:

$$\Delta\tilde{\nu}_{\Delta\beta} = \frac{|\Delta\beta|}{\pi c \sqrt{\tau_p^{-2} + \tau_s^{-2}}} \approx 10.4 \frac{\Delta d_{\text{GDD}}}{\tau_m d_{\text{GDD}, m}},$$

$$\frac{\Delta d_{\text{GDD}}}{d_{\text{GDD}, m}} \ll 1, \frac{\Delta\tau_0}{\tau_m} \ll 1, \quad (8)$$

式中: τ_m 代表傅里叶变换受限脉冲的脉冲宽度的平均值; $d_{\text{GDD}, m}$ 代表两束脉冲之间 d_{GDD} 的平均值; $\Delta\tau_0$ 代表傅里叶变换受限脉冲之间的脉冲宽度的差值; Δd_{GDD} 代表两束脉冲 d_{GDD} 的差值。从公式 (8) 中也可以看出, 当两束脉冲之间的线性啁啾参数相同时, $\Delta\tilde{\nu}_{\Delta\beta}$ 对光谱分辨率的影响将消失。如果只考虑 d_{GDD} 对脉冲宽度的影响, SF 技术对 HS-CRS 光谱分辨率的提升将是无上限的。但是在绝大多数情况下, 啁啾装置对脉冲宽度的影响不仅会引入 d_{GDD} , 还会引入三阶色散 (third order dispersion, TOD) 和更高阶色散, 所以 SF 技术对高光谱分辨率的提升是有一定上限的。

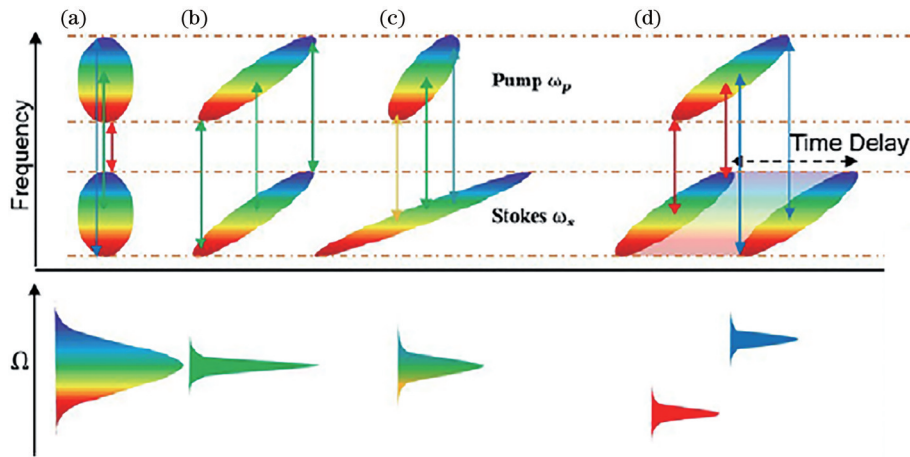


图 6 相干拉曼激发过程^[38]。(a) 傅里叶变换受限脉冲; (b) 经过相同程度啁啾的激光脉冲; (c) 经过不同程度啁啾的激光脉冲; (d) 不同时间延迟下的频率扫描

Fig. 6 Coherent Raman excitation process^[38]. (a) Fourier-transform limited laser pulses; (b) laser pulses with the same chirp; (c) laser pulses with different chirps; (d) frequency scan with time delay

为实现 SF 技术, 可以利用玻璃棒的材料色散特性对宽带飞秒脉冲激光进行展宽 (图 7(a)), 这也是最简单的一种方法。2008 年, Rocha-Mendoza 等^[39]利用 SF57 材质的玻璃棒对宽带飞秒脉冲激光进行展宽, 将其脉冲宽度从 100 fs 展宽至几个皮秒, 同时利用位移台控制两束激光的时间延迟实现了

HS-CARS 技术。随后, Rocha-Mendoza 等^[40]拓展了该技术, 将 SF 技术和频率调制技术相融合在实现高光谱成像的同时抑制了 CARS 的非共振背景信号, 从而提高了 HS-CARS 成像的灵敏度。2009 年, Langbein 等^[41]采用一台单路输出的脉冲宽度小于 10 fs 的 Ti:sapphire 激光器作为光源, 利用二向色镜

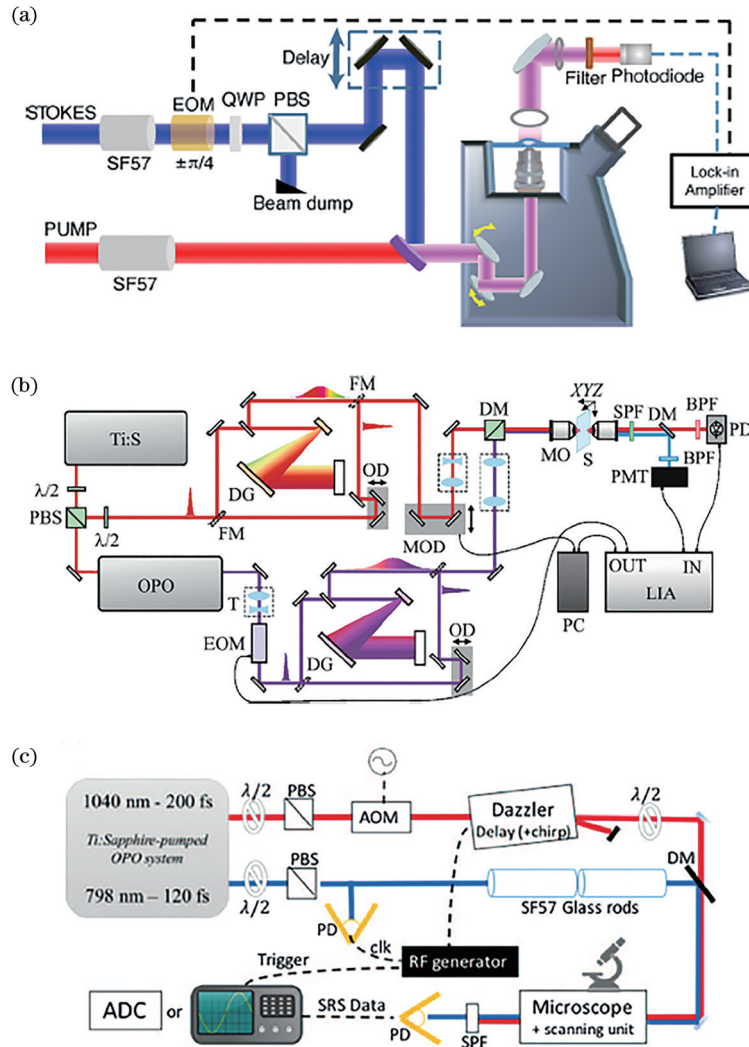


图 7 实现 SF 方案的不同方法。(a) 利用材料色散引入线性啁啾^[56]；(b) 利用光栅的空间色散引入线性啁啾^[53]；(c) 利用 AOPDF 引入线性啁啾并同时控制时间延迟^[55]

Fig. 7 Different methods for SF-CRS microscopy. (a) Introduce linear chirp through material dispersion^[56]; (b) introduce linear chirp through the spatial dispersion of the grating^[53]; (c) use AOPDF to introduce linear chirp and control time delay at the same time^[55]

(dichroic mirror) 将输出光分为 pump 光和 Stokes 光, 同时利用 SF57 材质的玻璃棒在会合前对两束激光分别进行啁啾, 在第 2 块二向色镜处会合后又同时经过另一根 SF57 玻璃棒进入显微镜。该方案适用于许多实验研究, 是高光谱 CRS 设备的一个重要发展。2013 年, Fu 等^[42] 采用 SF 方案实现了 HS-SRS, 在对胆固醇纯样进行测试时其探测灵敏度可达到 4 mmol/L, 并在 1 min 内完成对碳-氢(C—H)振动区间(2800~3100 cm^{-1})的高光谱成像。Masia 等^[43] 采用 SF 技术实现了超宽光谱范围的 HS-CARS 成像, 其光谱成像范围为 1200~3800 cm^{-1} 。2016 年, Porquez 等^[44] 采用一台飞秒脉冲激光器和一个商业化的可产生超连续光的光纤模块, 利用 S-NPH2 材

质的玻璃棒, 实现了光谱范围在 630~3250 cm^{-1} 的超宽光谱成像, 其在 C—H 振动区间上的光谱分辨率达到 25 cm^{-1} 。后续随着科研人员们不断的研究和创新, 发展了各种基于材料色散的 HS-CRS 成像方案, 用于提高该系统的光谱成像范围^[45-46]、光谱成像速度^[47-51]等。以上技术的发展使得基于材料色散对激光脉冲 GVD 进行控制的 SF 方案成为被广泛使用的高光谱成像方案。

除了材料色散, 利用光栅或棱镜也可以对脉冲的 GVD 进行控制以实现 SF 技术^[37, 46, 52-53](图 7(b))。光栅将宽带飞秒激光在空间上进行色散, 当不同频率的光再次通过光栅合束后其空间上的均匀分布会转换为时间上的均匀分布, 完成对宽带激光的啁

啾。同样地,棱镜也可以通过同样的方式完成对宽带激光的啾啾。声光可编程色散滤波器(acousto-optic programmable dispersive filter, AOPDF)的出现给 SF 技术的实现带来了一种新的方案^[54-55](图 7(c))。AOPDF 是由共线光路(提供可编程色散补偿)和声光调制器组成的一种滤波器,它可对光波脉冲的振幅和相位同时调制,并对激光脉冲提供色散补偿、进行脉冲整形等,同时还可控制激光的通过时间。基于这些特性,AOPDF 可以同时代替线性啾啾装置和时间延迟装置,对 CRS 光路中某一路宽带激光脉冲进行时域上的展宽并同时控制其与另一路啾啾后的宽带激光的时间延迟,从而完成高光谱成像。2017 年,Alshaykh 等^[55]利用该方案在 C—H 振动区间内实现了高光谱 SRS 成像,其中 AOPDF 形成的快速延迟线可在 12.8 μs 内扫描 3 ps 的时间延迟范围。2020 年,Audier 等^[54]同样利用 AOPDF 实现了高光谱 SRS 成像,其可在 12.5 μs 内获取脂质带光谱,光谱分辨率可达到 23 cm^{-1} 。

SF 技术中对两束光时间延迟的控制主要是通过一些机械结构来进行的,如电动一维位移台、一维振镜等,这就要求在线性连续地控制时间延迟的同时要与数据采集及图像重建模块保持高度的同步性,否则将会造成在时间延迟线移动过程中图像的扭曲,进而造成图像中各像素点位置处光谱的扭曲。为解决这个问题,人们研究了复合带宽激光的高光谱技术。

3.3 基于复合带宽激光的高光谱相干拉曼散射显微技术

基于复合带宽激光的高光谱技术可以在扫描成像的同时获得每一个像素点的拉曼光谱信息,它是以拉曼光谱信息形成图像堆栈,而不是像波长扫描技术和 SF 技术一样先在每一个探测频率获取图像信息形成图像堆栈后再据此获取拉曼光谱信息。该技术需要一束窄带的皮秒激光和一束宽带的飞秒激光对样品进行 CRS 信号的激发。当两束光同时聚焦到样品上时,窄带的皮秒激光会同时与宽带的飞秒激光中不同频率成分的光一起,组成不同探测频率的激光组合,对样品中不同化学成分的拉曼跃迁进行激发。随后将得到不同频率成分上的 CARS 信号,及其不同激发波长下的 SRG 或 SRL 信号。将获得的不同频率成分的 CARS 信号或 SRS 信号在空间或时间上进行分离并接收,以此实现高光谱成像。

通常情况下,在激光器的选择上,会选用两台单独的单路输出的皮秒脉冲激光器和飞秒脉冲激光器,或者采用一台双路输出的飞秒脉冲激光器。当选用一台飞秒脉冲激光器时,需要利用脉冲整形装置对其中一路激光进行脉冲整形,使其从宽带的飞秒脉冲变为窄带的皮秒脉冲。在光路传输、时间耦合、空间共线和扫描成像等方面同传统的 CRS 显微镜设备相同。CRS 信号激发后,需要利用光栅等装置对 CRS 信号进行色散,完成空间上的分离,随后通过多通道探测器对不同频率成分的信号进行采集,或者利用光纤等装置对 CRS 信号进行啾啾,完成时间上的分离,随后在时域上对 CRS 信号进行采集。

第一台基于复合带宽激光的 HS-CARS 设备由 Müller 和 Schins^[57]以及 Cheng 等^[58]报道,两项研究都使用了两台电子同步的 Ti:sapphire 激光器,提供一束窄带的 pump 光(10 ps, 1.5 cm^{-1})和一束宽带的 Stokes 光(80 fs, 180 cm^{-1})对样品进行激发,并使用光谱仪和电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)对 CARS 信号进行探测,实现了在 C—H 振动区间内宽约 200 cm^{-1} 的高光谱成像。随后,Kee 等^[59]、Kano 等^[60-61]以及 Motzkus 等^[62-64]在此基础上将光谱宽度扩展到了几千个波数。第一台宽带 SRS 设备使用了光学多道分析器(optical multichannel analyzer, OMA)对 SRG 信号进行探测,OMA 主要由色散光谱仪和线性阵列探测器组成^[6]。Ploetz 等^[11]在该研究中使用了一台重复频率为 1 kHz 的 Ti:sapphire 飞秒脉冲激光器,利用带通滤波片形成窄带的 pump 光,另一部分聚焦到蓝宝石片上产生宽带的白光连续体(white light continuum, WLC),两束光同时聚焦到样品后,产生的 SRG 光谱信号将由 OMA 进行接收。Ploetz 等使用的 OMA 包含一个 512 通道的二极管阵列,工作频率在 1 kHz,通过将 pump 光调制到 500 Hz,实现了宽带的高光谱 SRS 成像,光谱范围为 600~3800 cm^{-1} 。但是较低的重复频率限制了灵敏度和信号采集时间。Rock 等^[65]利用高帧率的 CMOS 相机作为信号采集装置实现了基于高重复频率激光器的 HS-SRS 成像,激光器的重复频率可达到 1 MHz。

在单色 SRS 成像中,高频调制搭配锁相放大器对信号进行解调的信号采集方式可以满足高速成像的需求。因此,将探测器转换为阵列探测器,在每个探测器后方连接锁相放大器,也可以实现高速

的宽带 SRS 成像。Lu 等^[66]利用该方案实现了三通道的 SRS 探测。在其研究中, SRL 光谱信号通过光栅色散在空间上分离, 分别照射到 3 个独立的光电二极管 (photodiode, PD) 上, 每个 PD 后连接有一台锁相放大器, 基于此实现了对三个拉曼振动峰的同时探测。Kobayashi 等^[67-68]首先在增加通道数量上做出了努力, 宽带的 SRL 光谱信号经过光谱仪色散后被耦合进一个由 128 根光纤组成的光纤束, 每根光纤都对应一个雪崩光电二极管 (avalanche photodiode, APD) 探测器, 同时每个 APD 对应一个多通道锁相放大器的信号接收通道, 利用该系统 Kobayashi 等实现了 128 通道的 HS-SRS 探测。但是商业化的多通道锁相放大器只能对低频率的信号 (约 100 kHz) 进行解调, 在低频率下激光器的噪声会对 SRS 信号造成很大影响^[6]。为克服调制频率的限制, Liao 等^[69]研究了一套基于 16 通道的可调谐放大器 (tunable amplifier, TAMP) 的多通道探测装置, 该装置无需使用锁相放大器, 并且可对调制频率高达 2.1 MHz 的 SRS 信号进行探测。更高的调制频率提高了其信号采集速度, 每个像素点的停留时间可降低到 32 μs 。随后, Zhang 等^[70]对该探测系统进行了升级, 研制出了 32 通道的 TAMP 探测器, 其光谱采集时间可达到 5 μs 。

在光子时间伸展 (photonic time stretch, PTS) 方案中, 探测端可以使用单个探测器而不需要使用复杂的探测器阵列。其主要构成是一段极长的光纤, 该光纤用于将信号光的脉冲宽度延展到纳秒量级, 使其可被高频的光电探测器准确测量。信号光在光纤内色散后, 在探测器端每个时间节点上都对应一个波长的信号, 将时域上分布的信号转换为频域上分布的信号, 就可得到高光谱信息。PTS 允许系统内使用重复频率为几十 MHz 的激光器进行高速的信号采集, 进而提高图像的采集速度。Saltarelli 等^[71]和 Dobner 等^[72]利用 PTS 方案实现了宽带的 HS-SRS 成像, 其设备结构如图 8 所示, 与其他方案的主要区别在信号接收部分。通过滤波片后, 信号光就将进入 PTS 部分, PTS 主要分为两部分。首先进入光栅对后将信号光进行初步色散, 在将信号光在时域上展宽的同时将脉冲的峰值功率降低, 在以较低的峰值功率进入光纤时可极大降低光纤内的非线性效应对信号光的影响。随后, 信号光进入光纤内将脉冲宽度展宽至 ns 量级。

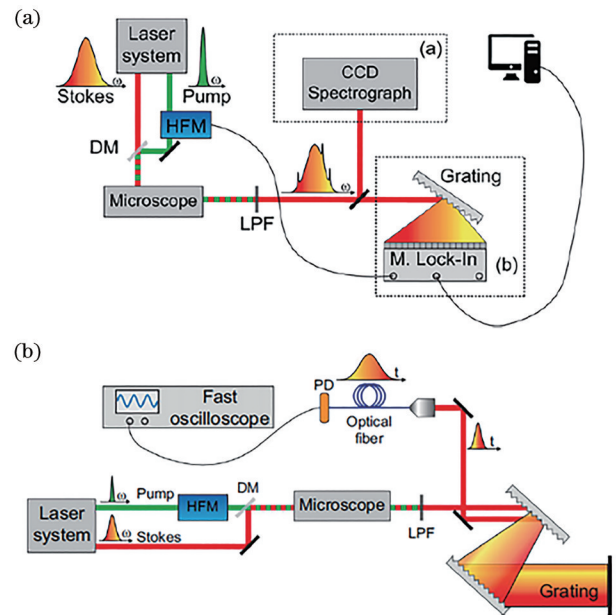


图 8 复合带宽 CRS 显微镜的不同实现方式^[6]。(a) 利用光栅对信号光进行空间色散, 通过多通道探测器对信号进行采集; (b) 利用光子时间伸展装置将信号光在时域上色散, 通过高频单通道探测器对信号进行采集

Fig. 8 Different methods for multiplex CRS^[6]. (a) Signal light is spatially dispersed by the grating, and the signal is collected by the multi-channel detector; (b) signal light is dispersed in the time domain through the photon time stretching device, and the signal is collected by the high-frequency single-channel detector

4 高光谱相干拉曼散射技术在生物医学中的应用

传统的 CRS 显微成像技术由于缺少光谱的整体信息, 通常关注拉曼光谱的特征峰区域。图 9 展示了小鼠组织作为典型生物样品的拉曼光谱。大部分的 CRS 技术研究波数范围为 2800~3100 cm^{-1} 的 C—H 特征峰区域。在这片高波数的区域中, 更高能量的氢原子独立振动使得这里有着更强的信号, 对应着 CH_n 不同震动模的多个特征峰, 为 CRS 成像提供了极佳的信号强度。而与之相比, 在 600~1800 cm^{-1} 的低波数指纹区域, 则包含了如 O—H, C—C, C=C, C=O 等多种特征峰。这些特征峰的信号强度较低, 且拥有相对更窄的带宽和更密集分布。这片区域的特征峰检测对于光谱分辨率和激发强度有着更高的要求。在两者之间, 波数为 1800~2500 cm^{-1} 的静默区则对应着 C—D 等一般生物样品中少见的特征峰, 因此适用于同位素标记的拉曼成像。

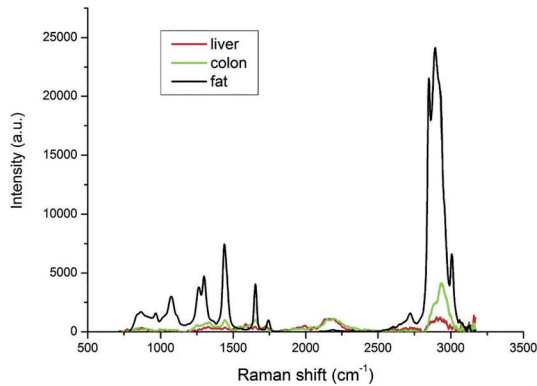


图 9 小鼠模型 C3H/HeN 中肝脏、结肠和脂肪组织的拉曼光谱^[73]

Fig. 9 Raman spectra of liver, colon and adipose tissue in murine model C3H/HeN^[73]

传统 CRS 成像技术以其卓越的灵敏度、成像速度以及其对比度,为生物医药方面提供了多种应用。但由于样品的光谱重叠,再加以自身光谱分辨率不足,传统 CRS 依旧缺乏足够的化学特异性来区分多种类型的复杂生物分子。HS-CRS 技术在提高光谱分辨率方向的迈进,为精细区分不同的生物分子提供了有力的帮助。

4.1 细胞代谢中的多组分分析

细胞是生物体的基本结构和功能单位。CRS 成像技术以其亚细胞级的空间分辨率,被广泛用于

细胞成像。观察细胞结构,区分细胞中脂类、蛋白质、遗传物质等组分,并检测如葡萄糖、氨基酸、胆固醇、胆碱和其他生物成分在细胞代谢中的变化,是 CRS 的一大主要应用方向。

脂类作为细胞的重要组成部分、能量和物质来源,其代谢过程往往与动脉粥样硬化、肥胖、糖尿病等多种代谢疾病相关。通常的共聚焦或者双光子成像技术无法细致区分脂类的组成和观察代谢过程,HS-CRS 技术的应用为其提供了可能。Fu 等^[56]使用 HS-CRS 对细胞和组织中胆固醇酯和三酰甘油这两种重要的中性脂质进行量化,揭示了脂类组成的变化与肥胖和脂肪性肝炎的关联。进一步地,通过稳定同位素标记,Fu 等^[56]使用 HS-SRS 成像追踪了活细胞和活秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的脂肪酸代谢动力学,发现不饱和脂肪酸优先吸收到脂质储存中,而饱和脂肪酸在肝细胞中表现出毒性,二者并未表现出相关性。这些发现为活细胞和生物体中性脂质及其前体的代谢追踪提供了新的方法和思路。图 10 为哺乳动物细胞中不同类型的脂质分布图。

除了脂类以外,同样作为重要组分的蛋白质、遗传物质等也有着不同的胞内定位和代谢过程。这些生物大分子共同形成了复杂的细胞的结构,使一般 CRS 技术很难有效获取更多精确的信息。

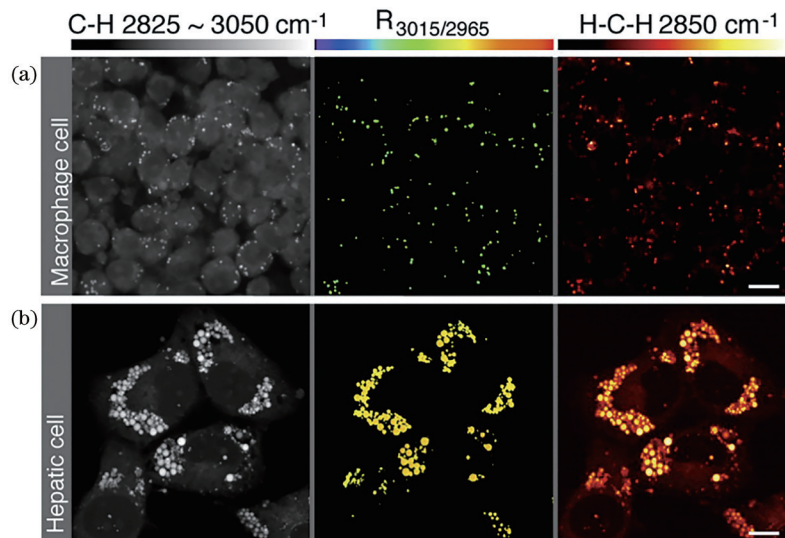


图 10 使用 HS-SRS 技术揭示哺乳动物细胞中不同类型的脂质分布^[56]。(a) 小鼠巨噬细胞;(b) 大鼠的肝细胞。左列的 SRS 图像展示了整体的细胞形态;中列的 $R_{3015/2965}$ 图像揭示了在巨噬细胞中胆固醇酯占主要成分,而在肝细胞中则以三酰甘油为主;右列在 2850 cm^{-1} 的成像展示了细胞的总脂质水平。比例尺为 $10 \mu\text{m}$

Fig. 10 HS-SRS visualization of neutral lipid distribution in mammalian cells^[56]. (a) Mouse macrophage cells; (b) rat hepatic cells. The row to the left shows the overall cell morphology using SRS; the $R_{3015/2965}$ images in the middle row reveal predominant storage of CE in macrophage cells and TAG in hepatic cells; total lipid levels were visualized in the row to the right. The scale is $10 \mu\text{m}$

HS-CRS 凭借其无标记的成像和优秀的光谱分辨率,能够做到在复杂的细胞组分中对目标分子进行定位。Freudiger 等^[74]通过对光谱信息的分辨,定量分析了混合物中脂类、胆固醇的含量,并对活体秀丽隐杆线虫进行了蛋白质、硬脂酸和油酸的多通道实时成像。Wang 等^[75]同样通过 HS-SRS 对完整的动脉粥样硬化动脉组织中的胆固醇、脂类、蛋白质进行了多通道成像,并对胆固醇水平、脂质的不饱和度进行了定量分析。

凭借对细胞复杂组分的精细分析,可以进一步通过 HS-CRS 技术,对整个细胞进行可靠的无标记分析、拆分等。Fu 等^[42]通过对哺乳动物细胞的 SRS 高光谱成像,揭示了饱和脂质、不饱和脂质、胆固醇和蛋白质在细胞中不均匀的空间分布,并在随后结合光谱相量分析方法,在对其组成或光谱没有先验认知的情况下,完成了对哺乳动物细胞的快速细胞器分割,为单细胞分析提供了可靠的解决方案^[76]。近年来,伴随着技术的不断发展,使用 HS-SRS 进行代谢追踪、组成分析等单细胞分析的技术方法也已经越发成熟^[77-79]。而随着对科学问题逐步的深入了解和探求,HS-SRS 也开始被广泛地应用到诸如疾

病研究、药物分析、癌症诊疗等方面。

4.2 癌症及其亚型的精细诊断

癌症作为目前最大的致死性疾病之一,它的恶化往往与癌细胞的扩散和转移密不可分。对其有效地诊断成为了对抗癌症的重要手段。HS-CRS 技术在研究癌症组织异质性的进展能够很好地帮助癌症诊断。透过光谱信息,高光谱 SRS 技术能够定量分析细胞组织中的饱和与不饱和脂质,从而对癌症组织进行诊断。通常认为,细胞脂质的不饱和度积累能够增强肿瘤细胞的生长与繁殖^[80]。在对卵巢癌干细胞(CSC)的分析研究中,研究人员发现了脂质去饱和酶(lipid desaturase)受 NF-KB 的调节,并发现了其调节通路,这揭示了脂质不饱和度的增加与卵巢癌干细胞代谢的相关性,从而帮助找到了一个卵巢癌的治疗靶点^[81]。与上面不同,在对癌变肝组织中脂质代谢的原位分析中发现,癌变的肝组织中积累了大量的饱和脂肪,而在正常组织中则并未发现这一现象。这表明了异常积累的饱和脂肪很可能成为肝癌代谢的标志物^[33]。HS-SRS 对癌症肝脏组织中饱和与不饱和脂肪的成像如图 11 所示。

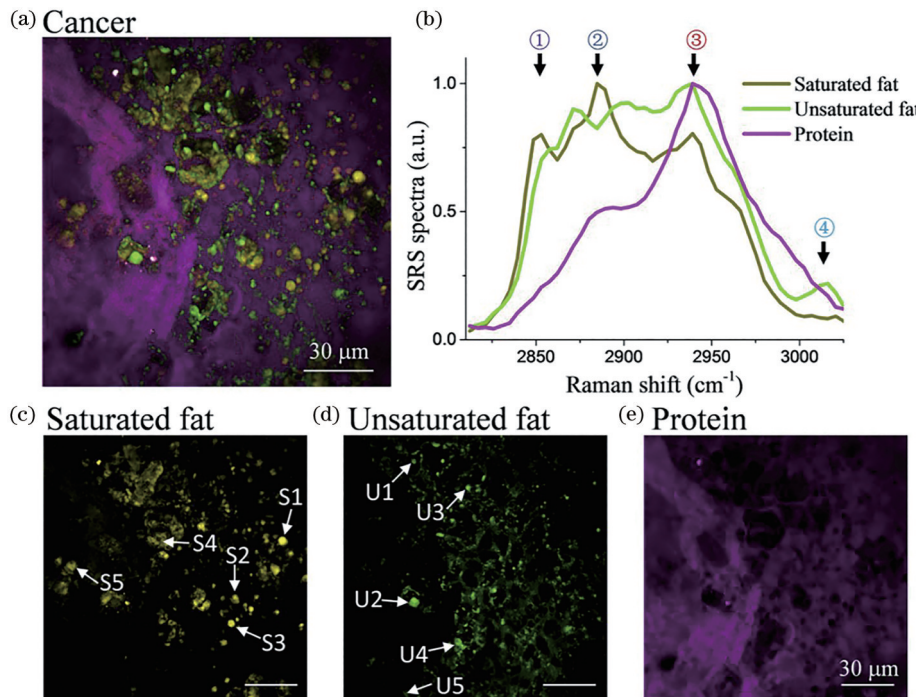


图 11 HS-SRS 对癌症肝脏组织中饱和与不饱和脂肪的成像^[33]。(a)饱和脂肪,不饱和脂肪与蛋白质图像;(b) SRS 光谱;

(c)~(e)使用 MCR 重建后饱和脂肪、不饱和脂肪与蛋白质对应的分布

Fig. 11 Hyperspectral SRS imaging of saturated and unsaturated fat in cancerous liver tissue^[33]. (a) Overlay image of saturated fat, unsaturated fat and protein; (b) SRS spectra; (c)~(e) MCR reconstructed concentration maps of saturated fat, unsaturated fat and protein, respectively

而在脂质以外,HS-SRS的高光谱分辨率在拉曼光谱的指纹区更能体现其优势。通过提取微钙化的化学和形态特征,HS-SRS能够基于光谱和空间域分析,精确评估乳腺恶性肿瘤。Yang等^[82]对来自23名患者的211个钙化部位进行成像,通过微钙化的化学和几何特征的优化组合,对良性和恶性

病例的分类精度达到98.21%。该技术相比于纯光谱或成像的分析方法有显著的提高。这一研究结果提供了一种对乳腺恶性肿瘤快速活检、准确评估的方法,在了解肿瘤发展、帮助疾病诊断方面具有重要的实用价值。乳房活检成像图如图12所示。

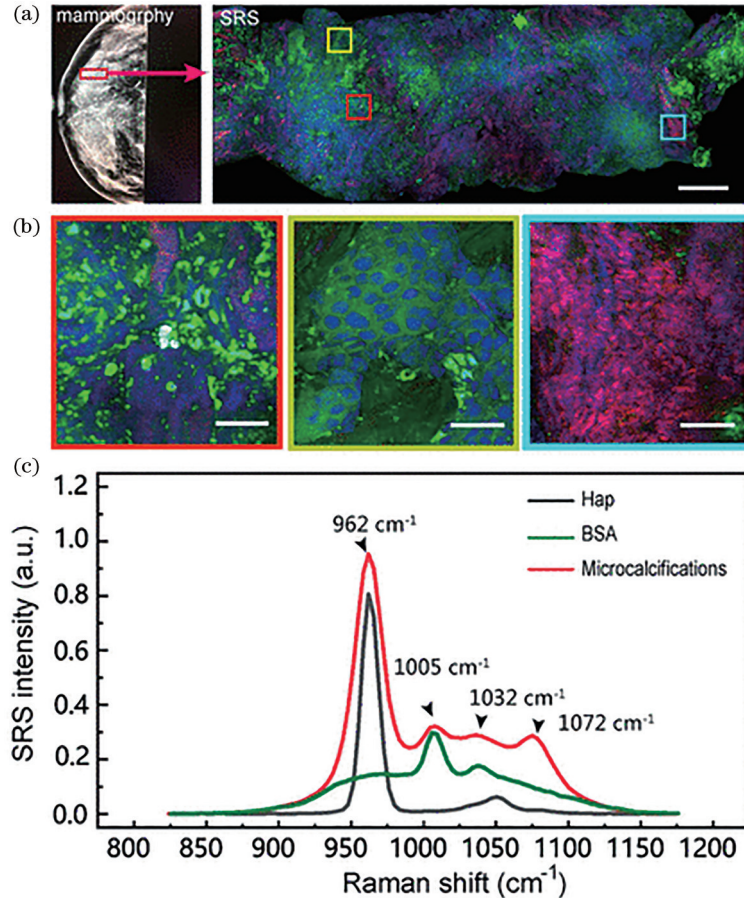


图12 使用HS-SRS进行乳房活检成像^[82]。(a)在乳房X射线成像的区域,使用乳房核心针活检拍摄的多色SRS图像;(b)部分区域的放大,突出显示了具有钙化、密集细胞和富含脂质、蛋白质、胶原纤维和羟基磷灰石的结缔组织的特定区域;(c)微钙化的乳腺组织、标准BSA和羟基磷灰石的SRS光谱。比例尺:图(a)500 μm ;图(b)50 μm

Fig. 12 Typical hyperspectral SRS imaging results of a breast biopsy^[82]. (a) Multicolor SRS image of a breast core needle biopsy taken from a region shown in X-ray mammography; (b) zoomed-in areas exhibit specific regions with calcifications, densely packed cells, and connective tissue rich in lipids, proteins, collagen fibers, and hydroxyapatite; (c) SRS spectra of microcalcifications in breast tissue, standard BSA, and hydroxyapatite. Scale bars: Fig. (a) 500 μm ; Fig. (b) 50 μm

高光谱SRS丰富的光谱信息不仅能够用于区分正常组织与肿瘤组织,更可以分辨同一肿瘤的不同亚型。Bae等^[83]使用光谱聚焦SRS技术对神经胶质母细胞瘤(GBM)进行成像,量化了GBM原神经(proneural)和间充质(mesenchymal)亚型的主要生物分子分布情况,并在两个亚型的区分中达到了96.7%的诊断灵敏度和88.9%的特异性。在对于神经外科肿瘤亚型的快速无标记诊断中,高光谱

CRS技术展现出了巨大的潜力。随后在以此技术开发的诊断平台中,研究人员发现了GBM的高度异质性并对其加以区分,实现了多种亚型共存的GBM肿瘤的鉴定,这极大推动了GBM靶向治疗技术的改进^[84]。

同样,在前列腺癌的研究中,基于对异常胆固醇酯积累的分析,HS-SRS技术可以以高灵敏度和特异性区分低级别和高级别的前列腺癌。Chen

等^[85]对患者的正常、低级别和高级前列腺癌组织进行分析,在脂质通道内,分别根据不同的拉曼波段之间的信号强度比,定量绘制脂滴中胆固醇酯的占

比和不饱和水平,找到了低级别和高级前列腺癌的显著差异,为更准确地检测诊断前列腺癌提供了新的可能,如图 13 所示。

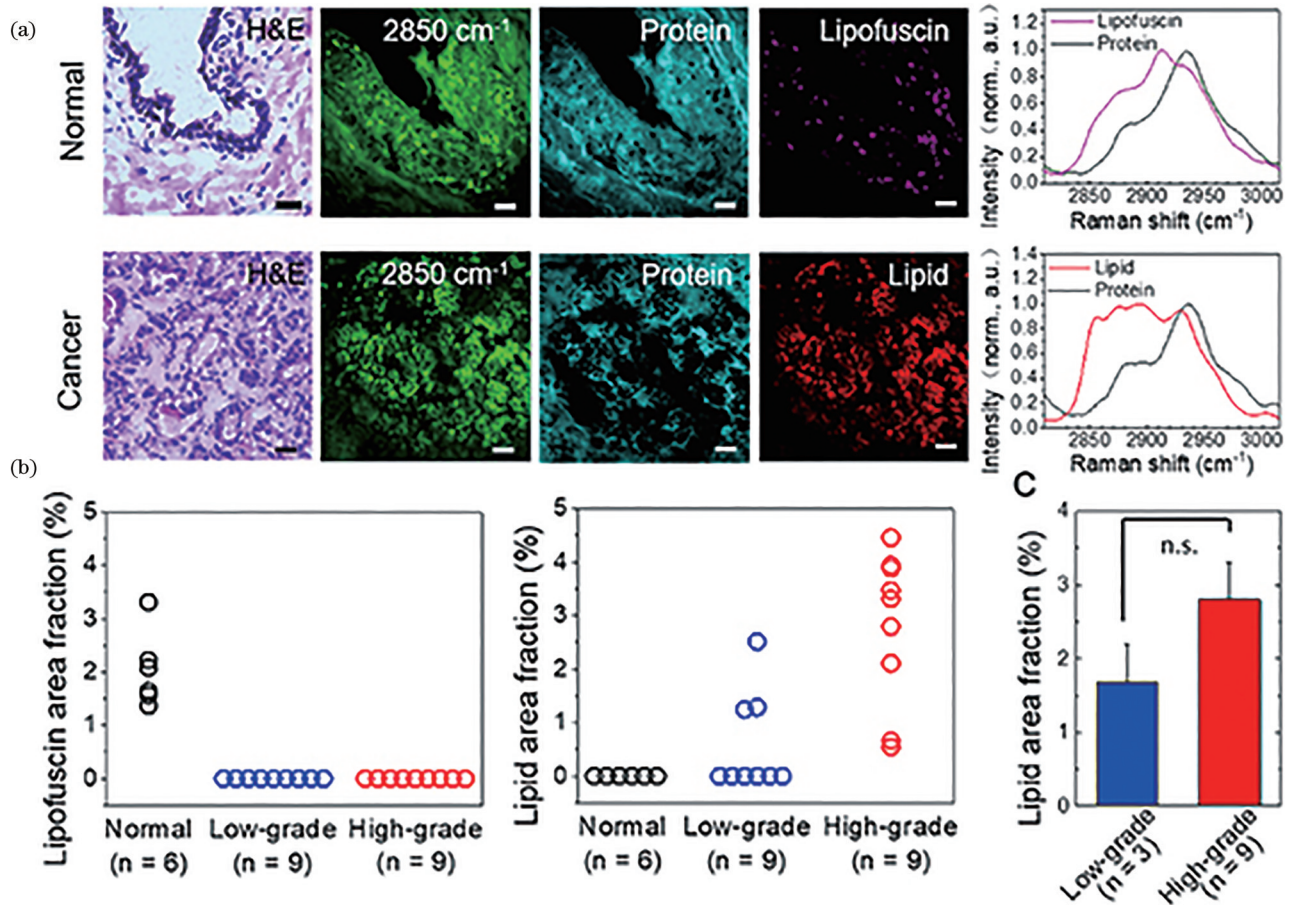


图 13 人类前列腺癌组织的高光谱 SRS 成像和 MCR 分析^[85]。(a) 在 2820~3020 cm⁻¹ 的范围拍摄的 50 张图像的高光谱叠加,像素停留时间为 10 μs; (b) 正常、低级和高级前列腺癌组织中,脂褐质区域比例和脂质区域比例的定量比较; (c) 低级别和高级前列腺癌组织之间的脂质区域比例的 t 检验(脂质区域比例大于 0, $p > 0.05$)。比例尺为 10 μm

Fig. 13 Hyperspectral SRS imaging and MCR analysis of human prostate cancer tissues^[85]. (a) Hyperspectral stack images acquired from 50 images at the range of 2820~3020 cm⁻¹, with pixel dwell time of 10 μs; (b) quantitation of lipofuscins area fraction and lipid area fraction in normal, low-grade and high-grade prostate cancer tissues; (c) student's t test ($p > 0.05$) of lipid area fraction (lipid area fraction is larger than 0) between low-grade and high-grade prostate cancer tissues.

Scale bar is 10 μm

4.3 药物分析、植物分析与更多应用

药物和外源性物质的亚细胞行为在药理学、毒理学和药物研究中非常重要。一直以来,人们很难通过显微成像直接观察药物中的小分子化合物的分布和运输。CRS 技术则在这方面有着广阔的应用前景。对于小分子化合物,其特征拉曼信号通常位于指纹区域,HS-CRS 的光谱分辨能力在这里得到充分发挥^[86]。使用 HS-CRS 成像,能够对活细胞内伊马替尼(imatinib)和尼罗替尼(nilotinib)两种酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine-kinase inhibitors, TKI)

药物进行直接无标记成像和量化,并发现由于它们的溶酶体特性,两种药物在溶酶体中的浓度大幅增加。进一步研究发现,当同时使用氯喹时,伊马替尼的溶酶体捕获减少为 1/10 甚至更少,这表明氯喹可能通过溶酶体介导的药物相互作用来提高 TKI 的疗效^[87],如图 14 所示。

凭借其高灵敏度和特异性,CRS 成像技术可以通过观察抗生素和生物膜之间相互作用,帮助更好地理解抗生素的耐药机制。HS-CRS 成像在基于芳基炔烃的拉曼标签的帮助下,研究万古霉素和金

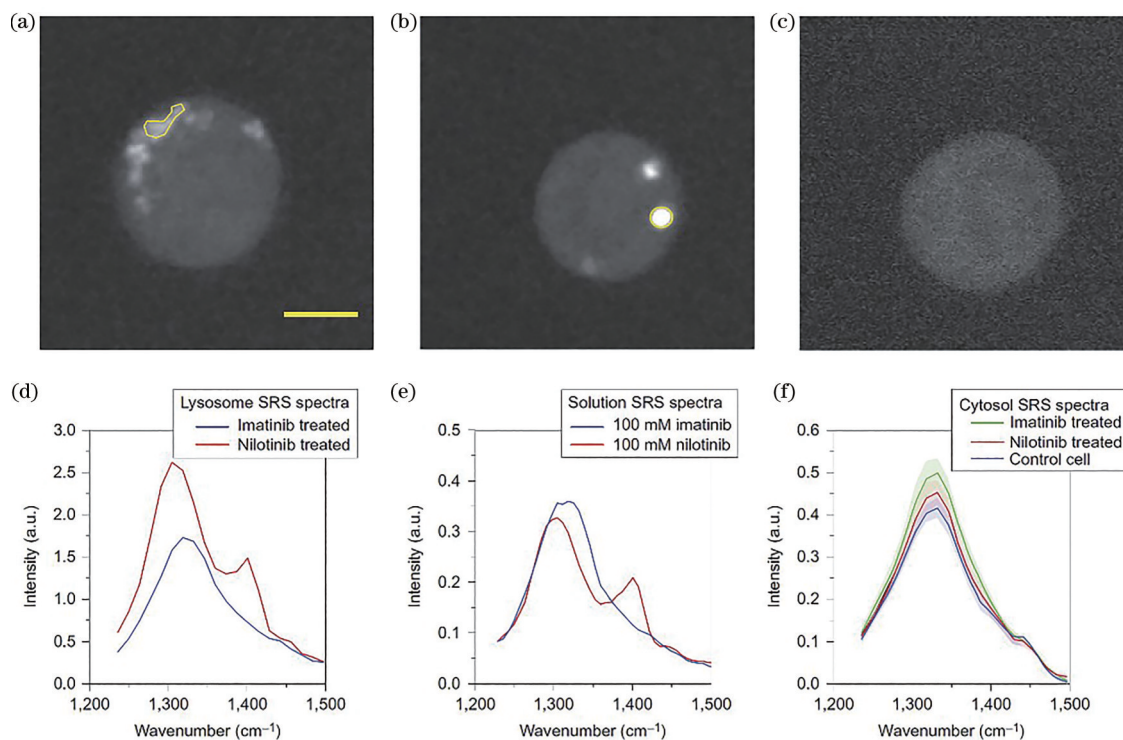


图 14 使用 HS-SRS 揭示药物在细胞中的积累^[87]。细胞中的亮斑处的 SRS 光谱与药物溶液的 SRS 光谱呈现一致。(a) BaF3/BCR-ABL1 在 20 mmol/L 的 imatinib 下培养 4 h 后的 SRS 图像, 比例尺为 5 mm。(b) BaF3/BCR-ABL1 在 20 mmol/L 的 nilotinib 下培养 4 h 后的 SRS 图像。(c) BaF3/BCR-ABL1 在 DMSO 下培养 4 h 后的 SRS 图像。(d) 图 (a), (b) 中亮斑区域的 SRS 光谱。(e) 100 mmol/L imatinib 和 100 mmol/L nilotinib 的 SRS 光谱。(f) 三种细胞的细胞质平均 SRS 光谱比较

Fig. 14 HS-SRS microscopy reveals enrichment of drugs in living cells^[87]. SRS spectra of the bright spots in drug-treated cells match the SRS spectra of the drug in solution, but differ from that of cytosol. (a) Representative SRS images of BaF3/BCR-ABL1 cells treated with 20 mmol/L imatinib for four hours. Scale bar is 5 mm. (b) Representative SRS images of BaF3/BCR-ABL1 cells treated with 20 mmol/L nilotinib for four hours. (c) Representative SRS images of control cells treated with DMSO. (d) SRS spectra of selected ROIs in (a) and (b). (e) SRS spectra of 100 mmol/L imatinib and 100 mmol/L nilotinib solutions. (f) Comparison of average SRS spectra of cytosol of imatinib-treated, nilotinib-treated and control BaF3/BCR-ABL1 cells

色葡萄球菌生物膜之间的动态相互作用, 获得了对抗性机制的新见解^[88]。

在动物组织之外, 植物样品中不同分子的光谱细微差别也可以通过 HS-CRS 成像来辨别。对山茶花的叶子、拟南芥的根和地钱地草的菌体的成像中, HS-SRS 可以在没有标记的情况下区分多达 6 种不同成分^[89]。通过 CRS 研究植物中的纤维素、木质素分布以及对植物各种生物分子的无标记多色成像分析, 能够为植物选育、生物燃料转化等发展提供帮助^[30]。

5 总结与展望

在现代生物医学研究中, 对生物成分无标记的研究方法越来越受到研究人员的关注。无标记的研究方法可以在不破坏生物成分及生物系统的条

件下, 更好地研究各种成分的功能及分布。HS-CRS 系统本身具有 CRS 系统可对样品进行无标检测的特性以及良好的化学特异性, 同时 HS-CRS 系统还可以在获取图像信息的同时提供每个数据点的光谱信息, 从而为研究人员提供新的信息维度。在过去几十年的发展, 越来越多的技术和应用创新使得 HS-CRS 显微成像系统成为一个强大且可靠的研究平台。研究人员利用该系统对细胞代谢、药物输送、癌症诊断和治疗等做出了突破性的研究, 这些研究在许多综述文章中进行了总结^[90-97]。本文对 HS-CRS 显微技术的不同实现形式进行了总结, 并对不同技术形式的主要实施方案, 以及 HS-CRS 在生物医学领域的应用进行了介绍。不过目前 HS-CRS 显微技术的探测灵敏度相比于荧光显微镜依旧较低, 这也在一定程度上限制了 HS-CRS 显微镜在生物

医学领域的应用。另一个限制 HS-CRS 应用的问题就是其昂贵的设备成本,为了获取稳定的灵敏度和信号强度,HS-CRS 需要使用昂贵的超快激光器作为光源产生激发光。降低其成本也是扩展其应用的一个重要方面。随着 HS-CRS 技术的不断发展,HS-CRS 显微技术将同其他光学成像技术一起为科学家们提供更多的实验选择和更丰富的图像信息,共同促进生物医学领域的发展。

参 考 文 献

- [1] Lichtman J W, Conchello J A. Fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 910-919.
- [2] Zhang C, Aldana-Mendoza J A. Coherent Raman scattering microscopy for chemical imaging of biological systems[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2021, 3(3): 032002.
- [3] 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.
- [4] Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [5] Zhang C, Zhang D L, Cheng J X. Coherent Raman scattering microscopy in biology and medicine[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2015, 17: 415-445.
- [6] Polli D, Kumar V, Valensise C M, et al. Broadband coherent Raman scattering microscopy[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2018, 12(9): 1800020.
- [7] Cheng J X, Xie X S. Coherent Raman scattering microscopy[M]. New York: CRC Press, 2016.
- [8] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. *Optics Letters*, 1982, 7(8): 350-352.
- [9] 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.
- [10] Hashimoto M, Araki T, Kawata S. Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a collinear configuration[J]. *Optics Letters*, 2000, 25(24): 1768-1770.
- [11] Ploetz E, Laimgruber S, Berner S, et al. Femtosecond stimulated Raman microscopy[J]. *Applied Physics B*, 2007, 87(3): 389-393.
- [12] 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.
- [13] Nandakumar P, Kovalev A, Volkmer A. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy[J]. *New Journal of Physics*, 2009, 11(3): 033026.
- [14] Camp C H, Jr, Cicerone M T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(5): 295-305.
- [15] Terhune R W, Maker P D, Savage C M. Measurements of nonlinear light scattering[J]. *Physical Review Letters*, 1965, 14(17): 681-684.
- [16] Cheng J X, Xie X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [17] 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: 883-909.
- [18] Liao C S, Cheng J X. *In situ* and *in vivo* molecular analysis by coherent Raman scattering microscopy[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2016, 9(1): 69-93.
- [19] Woodbury E, Ng W. Ruby laser operation in near IR[J]. *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, 1962, 50(11): 2367.
- [20] Zhang C, Cheng J X. Perspective: Coherent Raman scattering microscopy, the future is bright[J]. *APL Photonics*, 2018, 3(9): 090901.
- [21] 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.
- [22] Kienle F, Teh P S, Lin D J, et al. High-power, high repetition-rate, green-pumped, picosecond LBO optical parametric oscillator[J]. *Optics Express*, 2012, 20(7): 7008-7014.
- [23] Lin C Y, Potma E O, Suhaimi J L, et al. Picosecond spectral coherent anti-Stokes Raman scattering imaging with principal component analysis of meibomian glands[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16: 021104.
- [24] Suhaimi J L, Chung C Y, Lilledahl M B, et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic

- plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2012, 102(8): 1988-1995.
- [25] Garbacik E T, Herek J L, Otto C, et al. Rapid identification of heterogeneous mixture components with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering imaging[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2012, 43(5): 651-655.
- [26] Zhang D L, Wang P, Slipchenko M N, et al. Quantitative vibrational imaging by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy and multivariate curve resolution analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(1): 98-106.
- [27] Bégin S, Burgoyne B, Mercier V, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering hyperspectral tissue imaging with a wavelength-swept system[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(5): 1296-1306.
- [28] Li S P, Chan T. Electrical wavelength-tunable actively mode-locked fiber ring laser with a linearly chirped fiber Bragg grating[J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 1998, 10(6): 799-801.
- [29] DePaoli D T, Lapointe N, Messaddeq Y, et al. Intact primate brain tissue identification using a completely fibered coherent Raman spectroscopy system[J]. *Neurophotonics*, 2018, 5(3): 035005.
- [30] Karpf S, Eibl M, Wieser W, et al. A time-encoded technique for fibre-based hyperspectral broadband stimulated Raman microscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6784.
- [31] Pence I J, Kuzma B A, Brinkmann M, et al. Multi-window sparse spectral sampling stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(10): 6095-6114.
- [32] Huang B, Yan S, Xiao L, et al. Label-free imaging of nanoparticle uptake competition in single cells by hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Small*, 2018, 14(10): 1703246.
- [33] Yan S, Cui S 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.
- [34] 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.
- [35] Ozeki Y, Umemura W, Sumimura K, et al. Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband fiber laser pulses[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(3): 431-433.
- [36] Laptенок S P, Rajamanickam V P, Genchi L C, et al. Fingerprint-to-CH stretch continuously tunable high spectral resolution stimulated Raman scattering microscope[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(9): e201900028.
- [37] Hellerer T, Enejder A M K, Zumbusch A. Spectral focusing: high spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(1): 25-27.
- [38] Mohseni M, Polzer C, Hellerer T. Resolution of spectral focusing in coherent Raman imaging[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 10230-10241.
- [39] Rocha-Mendoza I, Langbein W, Borri P. Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 93(20): 201103.
- [40] Rocha-Mendoza I, Langbein W, Watson P, et al. Differential coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with linearly chirped femtosecond laser pulses[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(15): 2258-2260.
- [41] Langbein W, Rocha-Mendoza I, Borri P. Single source coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing[J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 95(8): 081109.
- [42] 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.
- [43] Masia F, Glen A, Stephens P, et al. Quantitative chemical imaging and unsupervised analysis using hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10820-10828.
- [44] Porquez J G, Cole R A, Tabarangao J T, et al. Spectrally-broad coherent anti-Stokes Raman scattering hyper-microscopy utilizing a Stokes supercontinuum pumped at 800 nm[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(10): 4335-4345.
- [45] Chen K, Wu T, Zhou T, et al. Cascaded dual-soliton pulse Stokes for broadband coherent anti-Stokes Raman spectroscopy[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2016, 8(6): 1602308.
- [46] Figueroa B, Fu W, Nguyen T, et al. Broadband hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy with a parabolic fiber amplifier source[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6116-6131.

- [47] Liao C S, Huang K C, Hong W L, et al. Stimulated Raman spectroscopic imaging by microsecond delay-line tuning[J]. *Optica*, 2016, 3(12): 1377-1380.
- [48] 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.
- [49] He R Y, Liu Z P, Xu Y K, et al. Stimulated Raman scattering microscopy and spectroscopy with a rapid scanning optical delay line[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(4): 659-662.
- [50] Lin H N, Liao C S, Wang P, et al. Spectroscopic stimulated Raman scattering imaging of highly dynamic specimens through matrix completion[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7(5): 17179.
- [51] Lin H N, Lee H J, Tague N, et al. Microsecond fingerprint stimulated Raman spectroscopic imaging by ultrafast tuning and spatial-spectral learning[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3052.
- [52] Lanin A A, Stepanov E A, Tikhonov R A, et al. A compact laser platform for nonlinear Raman microspectroscopy: multimodality through broad chirp tunability[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2016, 47(9): 1042-1048.
- [53] Lanin A A, Stepanov E A, Tikhonov R A, et al. Multimodal nonlinear Raman microspectroscopy with ultrashort chirped laser pulses[J]. *JETP Letters*, 2015, 101(9): 593-597.
- [54] Audier X, Forget N, Rigneault H. High-speed chemical imaging of dynamic and histological samples with stimulated Raman micro-spectroscopy [J]. *Optics Express*, 2020, 28(10): 15505-15514.
- [55] Alshaykh M S, Liao C S, Sandoval O E, et al. High-speed stimulated hyperspectral Raman imaging using rapid acousto-optic delay lines[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(8): 1548-1551.
- [56] 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.
- [57] Müller M, Schins J M. Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(14): 3715-3723.
- [58] Cheng J X, Volkmer A, Book L D, et al. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(34): 8493-8498.
- [59] Kee T W, Cicerone M T. Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Optics Letters*, 2004, 29(23): 2701-2703.
- [60] Kano H, Hamaguchi H O. Ultrabroadband ($>2500\text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber[J]. *Applied Physics Letters*, 2005, 86(12): 121113.
- [61] Kano H, Hamaguchi H O. Vibrationally resonant imaging of a single living cell by supercontinuum-based multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(4): 1322-1327.
- [62] von Vacano B, Meyer L, Motzkus M. Rapid polymer blend imaging with quantitative broadband multiplex CARS microscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007, 38(7): 916-926.
- [63] Pohling C, Buckup T, Pagenstecher A, et al. Chemoselective imaging of mouse brain tissue via multiplex CARS microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(8): 2110-2116.
- [64] Pohling C, Buckup T, Motzkus M. Hyperspectral data processing for chemoselective multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy of unknown samples[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(2): 021105.
- [65] Rock W, Bonn M, Parekh S H. Near shot-noise limited hyperspectral stimulated Raman scattering spectroscopy using low energy lasers and a fast CMOS array[J]. *Optics Express*, 2013, 21(13): 15113-15120.
- [66] Lu F K, Ji M B, Fu D, et al. Multicolor stimulated Raman scattering (SRS) microscopy[J]. *Molecular Physics*, 2012, 110(15/16): 1927-1932.
- [67] 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.
- [68] Seto K, Okuda Y, Tokunaga E, et al. Multiplex stimulated Raman imaging with white probe-light from a photonic-crystal fibre and with multi-wavelength balanced detection[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2014, 47(34): 345401.
- [69] 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.
- [70] Zhang C, Huang K C, Rajwa B, et al. Stimulated Raman scattering flow cytometry for label-free single-particle analysis[J]. *Optica*, 2017, 4(1): 103-109.
- [71] Saltarelli F, Kumar V, Viola D, et al. Broadband stimulated Raman scattering spectroscopy by a photonic time stretcher[J]. *Optics Express*, 2016, 24(19): 21264-21275.
- [72] Dobner S, Fallnich C. Dispersive Fourier transformation femtosecond stimulated Raman scattering[J]. *Applied Physics B*, 2016, 122(11): 278.
- [73] Huang N Y, Short M, Zhao J H, et al. Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model[J]. *Optics Express*, 2011, 19(23): 22892-22909.
- [74] Freudiger C W, Min W, Holtom G R, et al. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(2): 103-109.
- [75] Wang P, Li J, Wang P, et al. Label-free quantitative imaging of cholesterol in intact tissues by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2013, 52(49): 13042-13046.
- [76] Fu D, Xie X S. Reliable cell segmentation based on spectral phasor analysis of hyperspectral stimulated Raman scattering imaging data[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(9): 4115-4119.
- [77] Nahmad-Rohen A, Regan D, Masia F, et al. Quantitative label-free imaging of lipid domains in single bilayers by hyperspectral coherent Raman scattering[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(21): 14657-14666.
- [78] Adams W R, Gautam R, Locke A K, et al. Visualizing the role of lipid dynamics during infrared neural stimulation with hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy[J/OL]. *bioRxiv*, 2021: 444984. (2021-05-25)[2021-12-01]. <https://doi.org/10.1101/2021.05.24.444984>.
- [79] Huang K C, Li J J, Zhang C, et al. SRS image cytometry for high-content single cell analysis[J]. *Proceedings of SPIE*, 2019, 10882: 108822E.
- [80] Young R M, Ackerman D, Quinn Z L, et al. Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress[J]. *Genes & Development*, 2013, 27(10): 1115-1131.
- [81] Li J J, Condello S, Thomes-Pepin J, et al. Lipid desaturation is a metabolic marker and therapeutic target of ovarian cancer stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 303-314.
- [82] Yang Y F, Yang Y L, Liu Z J, et al. Microcalcification-based tumor malignancy evaluation in fresh breast biopsies with hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(15): 6223-6231.
- [83] Bae K, Zheng W, Lin K, et al. Epi-detected hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy for label-free molecular subtyping of glioblastomas[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(17): 10249-10255.
- [84] Bae K, Xin L, Zheng W, et al. Mapping the intratumoral heterogeneity in glioblastomas with hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2377-2384.
- [85] Chen X, Cui S S, Yan S, et al. Hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy facilitates differentiation of low-grade and high-grade human prostate cancer[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2021, 54(48): 484001.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] Bae K, Zheng W, Ma Y, et al. Real-time monitoring of pharmacokinetics of antibiotics in biofilms with Raman-tagged hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(5): 1348-1357.
- [89] Iino T, Hashimoto K, Asai T, et al. Multicolour chemical imaging of plant tissues with hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy[J]. *The Analyst*, 2021, 146(4): 1234-1238.
- [90] Pezacki J P, Blake J A, Danielson D C, et al. Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(3): 137-145.
- [91] Yue S H, Cheng J X. Deciphering single cell metabolism by coherent Raman scattering microscopy [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 33: 46-57.

- [92] Zhao Z L, Shen Y H, Hu F H, et al. Applications of vibrational tags in biological imaging by Raman microscopy[J]. *The Analyst*, 2017, 142(21): 4018-4029.
- [93] Lee H J, Cheng J X. Imaging chemistry inside living cells by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Methods*, 2017, 128: 119-128.
- [94] Hu F H, Shi L X, Min W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 830-842.
- [95] Hill A H, Fu D. Cellular imaging using stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9333-9342.
- [96] Shen Y H, Hu F H, Min W. Raman imaging of small biomolecules[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2019, 48: 347-369.
- [97] Fung A A, Shi L Y. Mammalian cell and tissue imaging using Raman and coherent Raman microscopy [J]. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 2020, 12 (6): e1501.