

# 等离激元增强四波混频成像及其在抗体药物体内代谢的应用初探

耿乙迦<sup>1,3,5</sup>, 丛丽丽<sup>1</sup>, 曹修冕<sup>1,4</sup>, 关鑫<sup>2</sup>, 霍泽鹏<sup>1</sup>, 陈刚<sup>1</sup>, 刘钰<sup>3</sup>, 徐蔚青<sup>1,5\*\*\*</sup>, 梁重阳<sup>2\*\*</sup>, 徐抒平<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>吉林大学化学学院超分子结构与材料国家重点实验室, 吉林 长春 130012;

<sup>2</sup>吉林大学药学院, 吉林 长春 130021;

<sup>3</sup>中国科学院长春光学精密机械与物理研究所应用光学国家重点实验室, 吉林 长春 130033;

<sup>4</sup>吉林大学物理学院, 吉林 长春 130012;

<sup>5</sup>吉林大学化学学院理论化学研究所, 吉林 长春 130012

**摘要** 基于双输出皮秒脉冲激光器和激光扫描显微镜平台, 构建了一套可实现双光子和多种四波混频(FWM)效应的多模式成像系统, 可实现光谱采集和良好的成像功能。等离激元材料可以提高FWM信号, 在FWM成像下具有超高的成像对比度。以5 nm金纳米粒子作为成像探针, 利用等离激元增强FWM成像追踪了其在小鼠肝脏和肾脏组织内的代谢残留。该研究为体内蛋白类药物的代谢评价应用提供可能。

**关键词** 医用光学与生物技术; 四波混频; 相干拉曼; 非线性光学成像; 抗体药物追踪

中图分类号 O437

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617024

## Preliminary Exploration of Plasmon-Enhanced Four-Wave Mixing Imaging and Its Possible Application in Antibody-Drug Metabolism in the Body

Geng Yijia<sup>1,3,5</sup>, Cong Lili<sup>1</sup>, Cao Xiumian<sup>1,4</sup>, Guan Xin<sup>2</sup>, Huo Zepeng<sup>1</sup>, Chen Gang<sup>1</sup>, Liu Yu<sup>3</sup>,  
Xu Weiqing<sup>1,5\*\*\*</sup>, Liang Chongyang<sup>2\*\*</sup>, Xu Shuping<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China;

<sup>2</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Applied Optics, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China;

<sup>4</sup>College of Physics, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China;

<sup>5</sup>Institute of Theoretical Chemistry, College of Chemistry, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China

**Abstract** In this study, several imaging functions, such as two-photon imaging and multi-mode four wave mixing (FWM) imaging, were realized on a single multiphoton spectrometer by the combination of double-output picosecond pulse laser and laser scanning microscope platform. Different nonlinear effects were tested to prove that this system could achieve spectroscopic recording and have excellent imaging performance. We explored the possible application

收稿日期: 2021-11-29; 修回日期: 2022-01-04; 录用日期: 2022-01-17

基金项目: 国家自然科学基金(21873039)、应用光学国家重点实验室开放课题(SKLAO2021001A14)、吉林大学学科交叉融合创新项目(JLUXKJC2020106)

通信作者: \*xusp@jlu.edu.cn; \*\*liang@jlu.edu.cn; \*\*\*xuwq@jlu.edu.cn

of plasmon-enhanced FWM imaging for the metabolism residues of antibody drugs in a mouse's liver and kidney using 5 nm gold nanoparticles as a probe. This method acts as a tool for conducting the metabolism evaluation of protein drugs in the body.

**Key words** medical optics and biotechnology; four wave mixing; coherent Raman; nonlinear optical imaging; antibody drug tracking

## 1 引言

抗体药物是肿瘤靶向性治疗药物中重要的一类,具有高度的特异性,其研发与应用受到广泛的关注。目前已有 20 多种抗肿瘤抗体药物经过批准应用于临床,并取得了显著的疗效。抗体偶联药物(ADC)是将高特异性的单克隆抗体与高活性的小分子毒性药物通过连接器连接而成,具有肿瘤治疗靶向性高、特异性强、毒副作用小等特点。因此,ADC 迅速成为了肿瘤靶向治疗领域中的热点药物。新型抗体药物活体内药代动力学过程的评价是药物研发过程中十分重要的环节之一,单克隆抗体是通过效应 B 细胞(浆细胞)分泌,用来鉴别和清除外源物质的一种“Y”形免疫球蛋白,分子量约 150 kDa (1 Da=1 u),直径约为 12 nm。与常规的小分子药物体内代谢路径可能存在明显不同,抗体药物代谢过程的评价一直是个难点。目前,对于药物体内代谢路径的研究,是利用放射性碘( $^{131}\text{I}$ )标记技术并结合放射性计数或 CT 成像来实现。该评价方法存在多种问题:主要依赖日本进口;失效快,难以进行长时间体内跟踪;无法长期保存;药物浓度测算需要根据半衰期  $T_{\text{eff}}$  来测定,因此无法进行多次给药的评价;难以准确定量;存在放射性,导致生物毒性,无法大剂量使用。因此,发展一类可以用于抗体药物体内追踪的成像技术及高灵敏的探针具有重要意义。

四波混频(FWM)是一种三阶非线性光学效应,是由三个光束在一定的相位匹配条件下照射样品产生另一个光束的过程。通常情况下,人们将三阶非线性效应中的一部分参量过程称之为四波混频。但广义的 FWM 包括多种不同的表现形式,最为典型的如相干反斯托克斯拉曼光谱(CARS)、增强的差分频率/共频混合、三次谐波(THG)等。而受激拉曼光谱(SRS)和双光子吸收(TPA),虽然检测方式有所差异,其本质都有 FWM 效应的参与<sup>[1]</sup>。FWM 成像是上转换的光谱成像方式,可避免生物组织自身下转换荧光的影响,具有较高的成像对比度,因而被广泛地应用于生物组织、细胞的成像研

究中。FWM 涉及多个波长的光与物质相互作用。泵浦光频率  $\omega_p$ 、斯托克斯光频率  $\omega_s$  和探测光频率  $\omega_{pr}$  与样本作用并生成反斯托克斯频率( $\omega_{pr} + \omega_p - \omega_s$ )。1999 年,哈佛大学谢晓亮研究组<sup>[2]</sup>利用超快激光技术实现了具有应用价值的 CARS 显微镜系统,开启了 CARS 成像技术在生物医学方面的应用先河。由于 CARS 的发生依赖于两束入射光之频率差与化学键振动频率的匹配,是通过调谐波长实现对不同分子振动模式的共振激发与检测,因此 CARS 成像是一类典型的化学成像技术。CARS 信号的强度比自发拉曼信号提高了  $10^4 \sim 10^5$  倍,使得拉曼效应这一原本微弱的光谱现象的检测灵敏度大大提升,因此在快速动态的生命科学研究中得以大展拳脚。CARS 显微成像系统主要由多输出高重复频率超快脉冲激光器与多光子扫描显微镜组成。激光器提供两个波长的脉冲激光序列,通常一束光的波长选定为 1064 nm,另一束光为 700~1000 nm 的可调谐激光,这样拉曼位移为  $600 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$  的频率均可成像。多光子显微镜系统在近红外区具备高透过率,通过选配相应的滤光片组即可对不同检测波长进行选择。利用光电倍增管检测 CARS 信号实现成像。程继新课题组通过宽带多通路激发使 CARS 的成像速度达到  $3.5 \text{ ms/pixel}$ <sup>[3]</sup>。SRS 是另一种非线性拉曼散射过程,表现为受激辐射的特点。2009 年,谢晓亮研究组开发出适用于生物系统成像的 SRS 显微镜系统成为相干拉曼散射显微成像技术的又一突破口<sup>[4]</sup>。SRS 的激发条件与 CARS 非常相似:当两束波长分别为  $\omega_p$ 、 $\omega_s$  的激光同时照射在样品上时,如果其频率差匹配分子化学键振动的圆频率  $\Omega = \omega_p - \omega_s$ ,那么  $\omega_p$  光会向  $\omega_s$  的光发生能量转移,使得光强增益(或损失),其增加或损失的差值即为检测量。SRS 显微镜系统与 CARS 显微镜系统基本类似,可共享光源和扫描显微镜。不同之处在于:CARS 过程产生了新的波长,需用滤光片直接过滤出光信号进行检测;而 SRS 无新波长的光产生,仅发生了幅度极小的能量转移,因此需要使用外差检测的方法。即对激光系统中任意一束光施加一个高频强度调制,然后在信号收集端滤除被调制的

光,对另一束光按调制频率利用锁相放大器进行检测。这一方法能够实现对微小能量转移的灵敏检测。SRS技术使生物组织成像速度与化学分辨率都得到了极大提升<sup>[5]</sup>,借助共振扫描系统可获得视频帧率下的扫描速度<sup>[6]</sup>,多通路SRS采集 $200\text{ cm}^{-1}$ 范围已实现 $32\text{ s/pixel}$ <sup>[3]</sup>。

在各类成像技术飞速发展的同时,高灵敏度和高成像对比度探针是必不可少的。相对于荧光成像技术,CARS及SRS成像技术致力于无标记成像方面的突破。最早的活细胞SRS显微镜的研究是利用 $\text{CH}_2$ 基团在 $2850\text{ cm}^{-1}$ 的CH伸缩振动对活细胞内的脂质进行无标记成像<sup>[6]</sup>。在后续报道中,CARS及SRS成像逐渐引入标签设计来提高灵敏度和成像反差,这些标签的特点是含有炔基或氰基。北京大学黄岩谊和陈兴课题组报道了使用炔烃作为生物正交拉曼信号源对活细胞内的四种主要生物分子(包括核酸、蛋白质、聚糖和脂质)进行SRS成像<sup>[7]</sup>。该生物正交SRS成像方法集成了荧光和无标记显微镜的双重优势,实现对活细胞内不同生物分子的可视化观察。美国哥伦比亚大学闵玮教授利用炔基和氰基的拉曼振动出现在生物静默区的特点,结合了同位素标记和结构修饰等策略,合成了24种吸收在 $650\sim 750\text{ nm}$ 、三键振动频率在 $2000\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ 的新型预共振拉曼探针,形成了SRS成像的探针彩虹,并实现多达16种颜色的活细胞成像和8种颜色的脑组织成像<sup>[8]</sup>。

金属纳米粒子(MNPs)是一类重要的纳米材料,它具有出色的等离子体特性,表现出对光的强吸收、高损耗,可实现对光的调控。这些等离子体探针具有强吸收、高成像反差、检测灵敏度高、生物相容性好等优点。MNPs的局域等离子体效应能够增强三阶非线性光学效应<sup>[1]</sup>,文献中曾报道过金纳米棒<sup>[9]</sup>、金纳米球<sup>[10-11]</sup>、金纳米壳<sup>[12]</sup>、银纳米球<sup>[13]</sup>等增强FWM效应。本课题组最近报道了用银纳米粒子的FWM成像动态追踪细胞表面聚糖的变化<sup>[14]</sup>。这类材料有望成为非线性光学成像中一类新颖的增强显影试剂。

本研究基于可调谐双输出皮秒脉冲激光器和多光子显微镜平台开发了具有多种不同成像模式的非线性光学成像系统,该成像系统可在单台机器上实现双光子荧光(TPF)、CARS、SRS等不同模式的FWM成像。光源部分内置延迟器和手动角度调节模块,确保双光束能够在时间和空间上严格重

合,保障高的成像质量;高速扫描振镜系统使成像速率极大提高;可调谐激光输出使检测波长能够精确匹配待测物的能级,实现针对特定物质的化学成像。基于这一研究平台,本研究对其进行应用功能拓展。采用和探索了等离子体增强FWM成像技术。制备合成了小尺寸的金纳米粒子(5 nm),将其通过尾静脉注射于小鼠体内,通过血循环到达脏器。将小鼠的脏器制作冰冻切片后,进行FWM成像检测。由于生物体样品的自发荧光常常对成像产生干扰,本研究从两个方面来改善荧光干扰的问题:1)FWM属于上转换的成像技术,因此自发荧光的干扰会被有效屏蔽;2)通过等离子体探针的引入极大地改善了FWM成像的品质。等离子体探针在FWM成像下具有超高的辨识度,可有效避免样品自发荧光的干扰。本研究发展了一类抗体药物在脏器残留和追踪的评价方法,有可能应用于蛋白质药物体内代谢的评价。

## 2 多模式非线性光学成像仪器的搭建与测试

### 2.1 多模式非线性光学成像仪器设计

本研究在多光子显微镜成像系统上实现不同非线性光学过程的激发与检测,从各种非线性光学效应原理出发对仪器实现功能所需的硬件结构进行分析。几种非线性光学成像系统的共同点有以下几方面:1)几种非线性光学过程都需要脉冲激光激发,并利用高数值孔径物镜将激光聚焦为较小的光斑,保证光斑处具有极高的峰值功率密度;2)这些非线性光学效应只会在激光的焦点处产生,为了实现图像绘制,需要配合电控样品台或者扫描振镜对样品进行逐点扫描;3)大部分非线性光学过程都可以通过长波长激光激发,其信号多产生于短波长区域等。而不同点则在于:1)激发光源数量不同,双光子荧光成像中仅需要一束激光就可以激发,而相干拉曼散射、四波混频成像中则需要两束激光共同激发样品;2)信号检测方式不同,多数非线性光学技术是以产生的新波长成分作为反馈信号进行成像,而在SRS检测中,需要对激发光的强度变化量进行测量;3)信号光的波长范围不同,在四波混频、CARS以及一些其他的非线性光学技术中,信号光波长往往能够通过对激发光波长进行一定的运算得到,而双光子荧光的波长则取决于样品自身性质,多数情况下与激发光波长无关。此外,在仪器



设计过程中,由于原理差异还会引入一些工程问题,如两束激光在时间与空间上的重合调节、激光强度微弱变化量的读取、激光波长的调谐等。为实现多种非线性光学成像功能,需要从设计上对仪器涉及的各种硬件需求进行全面考虑。

在激光器的选取上选择了德国 APE 公司生产的 picoEmerald 双输出皮秒激光器。其中基频光为 1031 nm 的近红外激光,基频光通过分束镜分为两束,其中一束经过倍频晶体进入光学参量振荡(OPO)系统中,产生 700~960 nm 连续调谐的皮秒激光。另一束分别通过光学延迟器和电光调制器(EOM),光学延迟器用于调节两束激光脉冲在时间上的重叠,不同波长的光经过大量光学元件后,由于传播速率不同,其相对延迟会发生改变,此外激光器内部光路的调节以及波长调谐也会对延迟时间产生影响。为此激光器中设置了光学延迟器,能够实现两束激光脉冲之间 $\pm 25000$  fs 内的延迟调节。电光调制器能够对 1031 nm 的激光进行调制,使 80 MHz 的脉冲激光转换为 20 MHz,并输出调制信号,为其他仪器设备提供同步触发信号。由于波长转换、延迟调节等操作会导致光束轻微的偏移,使得两束激光的同轴性发生改变。因此激光器内部还设置有手动调节模块,能够将光路调整至严格同轴的状态,保证两束激光经复杂光学系统后焦点仍能够良好重合。

显微镜平台选用了奥林巴斯公司的 FVMPE-RS 显微镜,原理如图 1 所示,该显微镜具备常规荧光显微镜的全部功能及激光扫描成像功能,在显微镜的结构中集成了扫描振镜系统,能够精确控制激

光光斑在样品表面的位置并进行逐点扫描。两束激光同轴从激光器输出到扫描镜,扫描振镜用于改变样品上的检测点。然后激光束被滤光片轮中的镜子反射,变成向下的方向。激光通过 45°二向色分光镜(690 nm,长通)后,通过近红外物镜(20 $\times$ )聚焦在样品上。样品产生的 FWM 信号由同一物镜采集和准直。由于 FWM 信号的波长比二向色分光镜的边缘短,所以它是在水平方向反射的。FWM 信号经过短通滤光片后,通过透镜聚焦到光电倍增管(PMT)探测器上。显微镜中配备了三个 PMT,其中两个 PMT 探测器安装于显微镜的右上方,主要用于检测样品的背向发光。两个 PMT 探测器前设置有不同波长的带通滤光片,能够分别对不同波长的光进行检测。另一个 PMT 探测器安装在显微镜的下方,并与卤素灯合为一体,兼具了照明和光强检测两种功能。该部分通过光纤束连接聚光镜和探测器实现光强检测,为仪器的改造提供一定的便利,可以直接将连在探测器一端的光纤连接在外部探测器上,实现所需信号的读取。在信号检测方面,PMT 探测器输出的模拟信号通过导线连接至多通道的模数转换器(ADC)上,因此能够在不改变仪器结构的条件下直接通过这根导线获得探测器的实时输出信号,并对信号进行处理,或在中间加入新的探测器,并将其输出的信号直接返回至模数转换器中。图 1(b)展示了该多光子显微镜的照片。

对于产生新波长成分的非线性光学成像,只需要将新的波长成分进行收集并通过 PMT 探测器对其强度进行检测,如 TPF、CARS 等。激光器发出的光首先经过扫描振镜系统,激光经扫描振镜反射

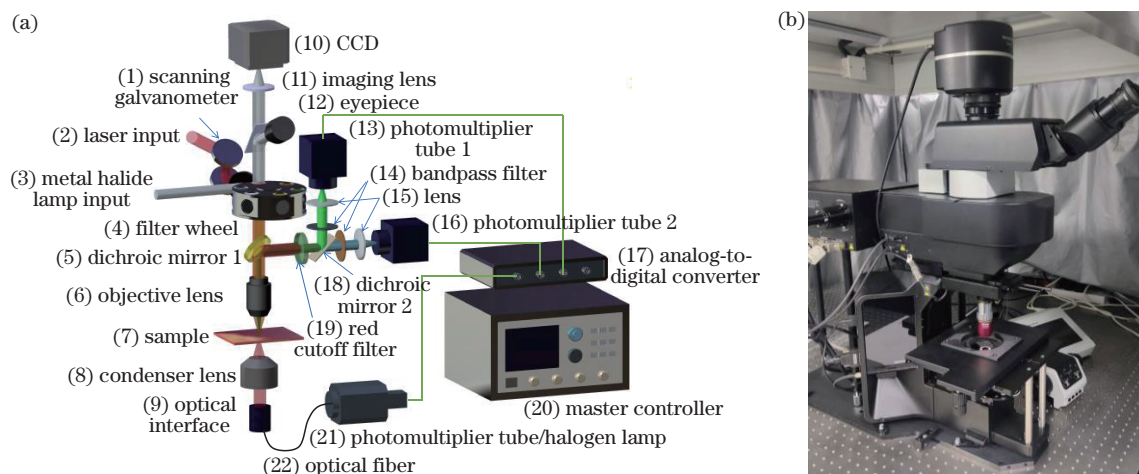


图 1 多模式非线性光学成像系统。(a)多模式非线性光学成像仪器结构;(b)奥林巴斯 FVMPE-RS 显微镜实物图  
Fig. 1 Multi-mode nonlinear optical imaging system. (a) Schematic diagram of the structure design of the multi-mode nonlinear optical imaging system; (b) picture of Olympus FVMPE-RS microscope

后经过一块反射镜反射为竖直向下方向,穿过一块二向色分光镜(690 nm,长通)后由物镜聚焦在样品表面。样品产生的信号光会被物镜重新收集,信号光的波长短于 690 nm,被反射至水平方向,通过一块短通滤光片滤除激发光后聚焦在 PMT 探测器处。为了确认探测器收到信号的光谱范围,在 PMT 探测器前设置了可切换的反射镜,将信号光反射至竖直向上方向,耦合至光纤内,利用光纤光谱仪进行检测。当两束光同轴输入时,由于物镜的聚焦作用,会使焦点处的激光存在不同的入射角度,从而实现相位的自动匹配。由于常规可见光波段的显微镜对 1031 nm 的光透过性极差,选用了日本三丰的近红外物镜。

基于光强变化量检测的非线性光学成像,也需要两束激光同时激发样品,即泵浦光和斯托克斯光。两束激光的波数差需要匹配样品分子特征振动的拉曼位移,当两束光的差频与分子振动产生共振时,会导致泵浦光强度衰减,而斯托克斯光强度增强,即受激拉曼损耗(SRL)和受激拉曼增益(SRG)。在对

SRS 成像的检测中,采用相敏检测的方式。利用锁相放大器对微弱的光强变化量进行提取。在 SRS 系统中,采用调制斯托克斯光而检测泵浦光中的 SRL 现象实现 SRS 效应的检测。

## 2.2 多模式非线性光学成像仪器的功能评估

### 2.2.1 双光子成像功能

为了测试仪器的检测效果,基于几种不同的非线性光学效应对仪器的检测能力进行测试。首先是对蒽晶体的双光子成像。将蒽晶体直接置于载玻片上并放置在显微镜载物台上,调节激光器输出波长为 700 nm,首先利用光谱仪采集蒽晶体的双光子光谱,然后在相应波长范围内利用 PMT 探测器对其进行扫描成像。

图 2(a)为蒽晶体的 TPF 成像效果,采用 700 nm 的激光进行激发,每个像素点扫描时间为 2  $\mu$ s,可以看到仪器具有良好的成像质量。图 2(b)为样品在激光激发下产生的荧光光谱,在 700 nm 的激光激发下蒽晶体在短波长区域产生了荧光峰,能够证明 TPF 效应的产生。

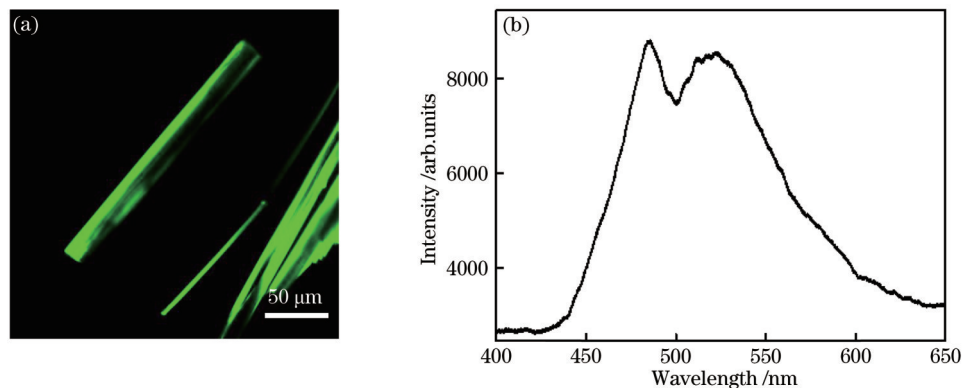


图 2 双光子成像功能验证。(a)蒽晶体的双光子成像效果;(b)蒽晶体的双光子荧光光谱

Fig. 2 Test for two-photon imaging function. (a) Two-photon imaging of anthracene crystals; (b) two-photon fluorescence spectra of anthracene crystals

### 2.2.2 SRS 成像功能

对聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的 SRS 成像。利用二氯甲烷溶解 PMMA,取少量滴在载玻片表面,待溶剂挥发,利用拉曼光谱仪(T64000,Horiba,日本)对其进行拉曼光谱检测,激光波长为 532 nm。然后将其放置在线性光学显微镜的载物台上,利用双光束激光进行扫描成像,其中一束激光波长为 1031 nm,另一束激光波长根据其拉曼峰位分别调整至 788 nm、790 nm、792 nm、794 nm、796 nm,观察成像情况,此外调节两束激光的相对延迟时间,使其处于时间上分开和重合两种不同情况,观察图像

的变化。

图 3(a)和(b)为 PMMA 的明场及 SRS 成像。SRS 成像采用双光束激发,两束光的波长分别为 790 nm 和 1031 nm,能够对应 PMMA 样品 2953  $\text{cm}^{-1}$  处的振动峰[图 3(c)]。SRS 成像对两束激光脉冲时间上的重叠极为敏感,为了排除多光子等效应对图像的干扰,通过调节两束激光的相对延迟时间,判断信号是否产生于两束激光的共同激发。如图 4(a)所示,随着两束激光相对延迟时间的改变,图像呈现出对比度先增加后降低的趋势,即两束激光逐渐在时间上重合后又分离的过程,表明样品的

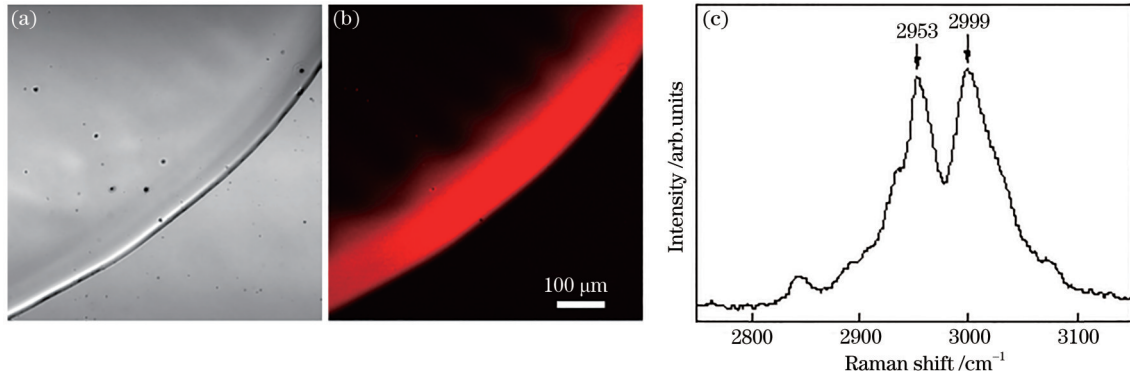


图 3 SRS 成像功能验证。(a) PMMA 的明场照片;(b) SRS 成像效果;(c) PMMA 的拉曼光谱

Fig. 3 Test for SRS imaging function. (a) Bright field imaging of PMMA; (b) SRS imaging effect; (c) Raman spectra of PMMA

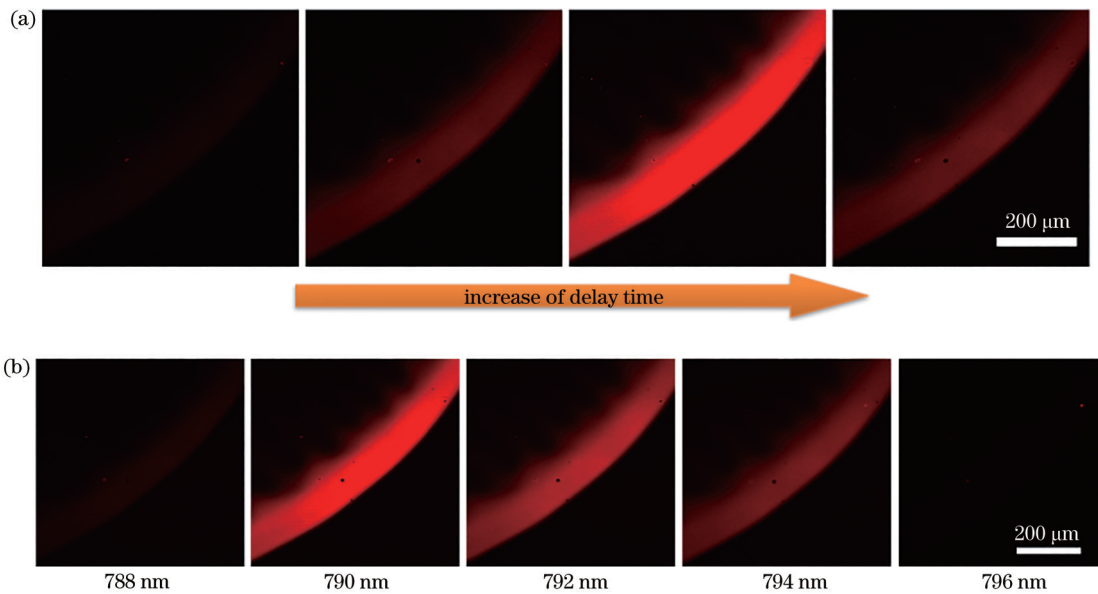


图 4 SRS 共振条件优化。(a) PMMA 的 SRS 成像随两束激光延迟时间变化的效果图;(b) PMMA 的 SRS 成像随激光波长变化的效果图

Fig. 4 Optimization of SRS resonance conditions. (a) SRS images of PMMA varying with the delay time of two wavelength lasers; (b) SRS images of PMMA associated with the pump laser wavelength

信号是由两束激光共同激发产生。为了验证 SRS 成像对于激光波长的选择性,选用不同的波长对样品进行成像,如图 4(b)所示,从图中可以看到,当激光波长逐渐接近样品的峰位时,其成像对比度越来越强,随着波长超过 790 nm,其对比度逐渐减弱,表明 SRS 成像具有波长选择性。

### 3 等离子体增强 FWM 现象

#### 3.1 等离子体增强 FWM 效应的 FDTD 模拟验证

作为一种非线性效应,FWM 过程是通常展现出非常低的效率。本研究采用了基于金属纳米粒子的等离子体增强效应。表面等离子体共振现象是一种局域的场增强策略。贵金属纳米材料的自

由电子产生集体振荡,当集体振荡的频率与光的频率相同时,会发生共振,导致其局部电磁场的极大增强。当有金属纳米材料的等离激元效应参与下,FWM 过程的非线性极化率<sup>[1]</sup>可以表示为

$$P(\omega_4) = L(\omega_4) \epsilon_0 \chi^{(3)}(-\omega_4; \omega_1, \omega_1, -\omega_3) L^2(\omega_1) L(\omega_3) E^2(\omega_1) E(\omega_3), \quad (1)$$

式中: $\omega$ 为光的驱动频率; $L(\omega)$ 为局部场频率的校正因子; $\epsilon_0$ 为真空介电常数; $E(\omega_1)$ 为泵激光波长下的电场; $E(\omega_3)$ 为探测激光波长下的电场; $\chi^{(3)}(-\omega_4; \omega_1, \omega_1, -\omega_3)$ 为块体金属的三阶磁化率。由(1)式可以看出,入射电磁场放大可以显著改善 FWM 过程,即  $P \propto E^2(\omega_1) E(\omega_3)$ 。

由于金属纳米材料的等离激元谱带较宽,因此对



于  $\omega_1, \omega_2, \omega_3, \omega_4$  均产生贡献[图 5(a)]。本文利用时域有限差分(FDTD)模拟了银和金纳米粒子(50 nm)的局部电场。利用商业软件(Lumerical Solutions, Inc.),采用三维时域有限分数值方法进行仿真计算。入射光源为三个总场散射场光源,其中两个光源频率为 374.6 THz (800 nm,  $\omega_1$  和  $\omega_2$ ),一个光源频率为 290.9 THz (1031 nm,  $\omega_3$ )。所有入射光均按时域设定,脉冲长度为 2000 fs,偏移量为 4000 fs,振幅为  $1.0 \times 10^8$ 。在模拟中,沿  $x, y$  和  $z$  方向网格尺寸设定为 1 nm。对于单粒子模拟,在各个方向上都使用完美匹配层边界边界条件。通过二维区域场分布监视器(DFTM)功率监测器和 DFTM 采集光源和电磁场分布分别监测。参考 Boltaev 等<sup>[15]</sup>的工作,

Ag 的光学参数  $\chi^{(3)} = 3.64 \times 10^{-17} \text{ m}^2/\text{V}^2$ , Au 的光学参数  $\chi^{(3)} = 1.22 \times 10^{-16} \text{ m}^2/\text{V}^2$ 。

如图 5(b)所示,银纳米粒子和金粒子均产生局域电场分布增强的现象。其中金纳米粒子的更为显著。这将极大改善 FWM 成像品质。Boyd 等<sup>[16]</sup>探讨了金属纳米材料的 FWM 效应的实验数据,对于金的三阶非线性光学过程归纳于三方面:1) 带内或“自由电子”的贡献,源于部分填充的 6s 导带电子;2) 带间的贡献;3) 热电子贡献,即来自激光激发下,5d 价带到 6sp 导带的电子贡献。在 FWM 的过程里,表现为三阶非线性的热电子辐射。但对于这些过程,哪项占主导,或是多种过程协同,仍需要更多的实验证据加以证实。

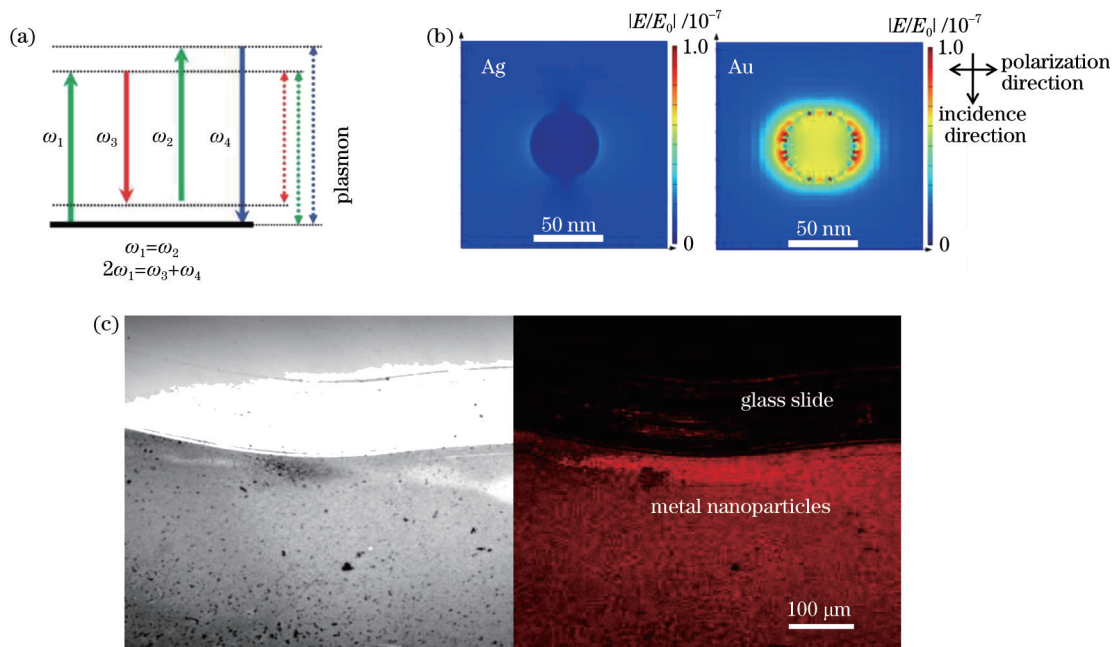


图 5 等离子元增强 FWM 现象。(a)FWM 中等离子元共振耦合能级图;(b) Ag 和 Au 纳米粒子在 FWM 下的局域电磁场模拟结果;(c)利用自行组装的多光子显微镜系统测得金属纳米粒子 FWM 的成像效果

Fig. 5 Schematic diagram of plasmon enhanced FWM. (a) Diagram showing the coupling of surface plasmon resonance for energy levels for FWM; (b) local electromagnetic field simulations of Ag and Au nanoparticles in FWM; (c) FWM image of metal nanoparticles recorded by the self-built multi-photon microscope

### 3.2 等离子元增强 FWM 效应的 FDTD 实验验证

本文对等离子元增强 FWM 成像特性进行测试。首先将银纳米粒子组装在玻璃片表面,然后用刀片刮去一半的纳米粒子,利用多模式非线性光学成像仪器对刮痕边缘处进行成像。其中激发光采用 790 nm 和 1031 nm 两束光分别作为泵浦光和探测光共同激发。

从图 5(c)可以看到,玻璃片上被刮掉的部分呈现黑色,而另一侧则有明显的信号产生,由此可

知,金属纳米粒子具有较好的成像反差,整个玻璃片的成像均采用了相同的波长和相位匹配条件,都满足四波混频效应的产生条件,但是信号强度明显不同,能够表明贵金属纳米粒子对于四波混频效应具有增强作用。与普通染料的荧光成像相比,其抗光漂白能力显著提高。且能够避免生物组织杂散光和荧光的干扰。对金属纳米粒子的共振成像确保了金属纳米粒子在成像体系中的高辨识度<sup>[14,17]</sup>。

## 4 等离子体增强 FWM 成像在抗体药物体内代谢的应用

本文采用金纳米粒子作为探针,利用等离子体增强 FWM 成像技术,用于示踪抗体药物在体内代谢的路径。金纳米粒子具有较好的生物相容性,且容易进行表面修饰。为了保障该探针对抗体产生的影响最小化,我们选取了粒径较小的金纳米粒子。其制备方法可以参考文献[18]。将 1.5 mL 质量分数为 1.0% 氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )水溶液和 0.5 mL 浓度为 0.2 mol/L 的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液加入至 1000 mL 纯净水中。在冰浴下进行磁力搅拌,溶液颜色由亮黄色变为无色。向上述溶液中分次加入 0.5 mg/mL 硼氢化钠溶液 5.0 mL (1 mL/次,共 5 次)。溶液的颜色由蓝紫色变为橙红色。硼氢化钠加入完成后继续搅拌溶液 5.0 min。将金纳米粒子溶液置于 4.0 °C 冰箱中保存。如图 6 的透射电镜(TEM)照片显示,该金纳米粒子的平均粒径约为 5 nm。

所有动物实验均在无菌条件下的动物实验室中进行,并且符合国际实验动物评估委员会(AAALAC)的规定。将 200  $\mu\text{L}$  的金纳米粒子(5 nm)通过尾静脉注射到小鼠体内。等待 1 h 后,将所有小鼠暴露于二氧化碳中进行安乐死。随后,取出小鼠肝、肾脏组织,并用冷冻切片机将其制成 5  $\mu\text{m}$  厚

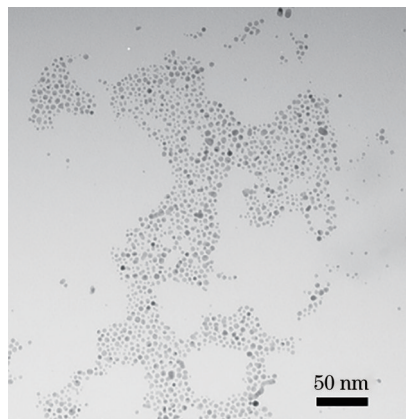


图 6 金纳米粒子透射电镜照片  
Fig. 6 TEM image of gold nanoparticles

度的切片,显微镜下进行观察。设置两束 790 nm 的光为泵浦光;一束 1031 nm 的光为探测光。激光功率为 50 mW,扫描速度为 20  $\mu\text{s}/\text{pixel}$ 。

如图 7 所示,在明场下,金属纳米粒子无法分辨。但在 FWM 成像下,金纳米粒子的位置显示较为清晰。通过与明场下的叠加照片可见,金纳米粒子已经代谢到了小鼠的肝脏和肾脏中。对于肝脏的放大图可发现,金属纳米粒子已经到达了肝细胞的间隙中。而在肾脏里,发现了大量的金属纳米粒子。由此可见,其肾脏富集度更为高。该成像效果充分说明这一探针可被有效追踪,该技术为应用于

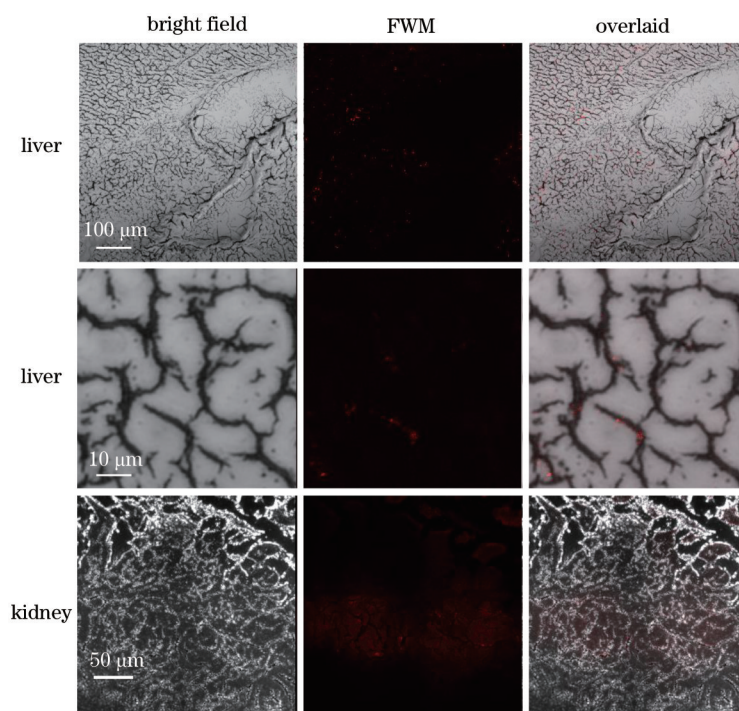


图 7 小鼠肝组织和肾组织的薄片成像图  
Fig. 7 Thin-section images of mouse liver and kidney tissue



蛋白类药物的体内代谢的评价提供可能。

## 5 结 论

四波混频效应在高对比度和高灵敏度成像领域展现出巨大的应用潜力。本文详细分析了非线性光学成像仪器的特点,并搭建了一套多功能非线性光学成像系统。该系统以双输出皮秒脉冲激光器和多光子激光扫描显微镜为基础,经过功能设计和整合,使其具有双光子、受激拉曼、相干反斯托克斯拉曼等不同模式 FWM 效应的成像功能。通过对萘晶体、PMMA 和贵金属纳米粒子进行成像,验证了该系统具有良好的非线性光学成像效果。通过对双光束相对延迟时间和激发波长进行调节,表明信号在相干成像中来源于双光束的共同激发。利用该系统探究了等离激元增强 FWM 现象,并从局域电场增强角度分析了增强原理。将该技术应用于小鼠组织成像,利用 5 nm 金纳米粒子作为成像探针,追踪了其在肝脏和肾脏组织切片中的代谢残留。研究表明金纳米粒子在这类脏器中具有较为明显的成像反差,不受组织自发荧光干扰。该成像探针可作为抗体药物在动物体内代谢评价的探针。相较于已有的同位素标记成像技术,该探针具有成本低、毒性低等优势。该成像技术及探针为抗体和蛋白质药物等大分子药物代谢评价提供一种有效手段。

## 参 考 文 献

- [1] Wang Y, Lin C Y, Nikolaenko A, et al. Four-wave mixing microscopy of nanostructures[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2010, 3(1): 1-52.
- [2] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering[J]. *Physical Review Letters*, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Suzuki Y, Kobayashi K, Wakisaka Y, et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019 116(32):15842-15848.
- [6] Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1368-1370.
- [7] Hong S L, Chen T, Zhu Y T, et al. Live-cell stimulated Raman scattering imaging of alkyne-tagged biomolecules[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(23): 5827-5831.
- [8] Wei L, Chen Z X, Shi L X, et al. Super-multiplex vibrational imaging[J]. *Nature*, 2017, 544(7651): 465-470.
- [9] Jung Y, Chen H T, Tong L, et al. Imaging gold nanorods by plasmon-resonance-enhanced four wave mixing[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(7): 2657-2663.
- [10] Masia F, Langbein W, Watson P, et al. Resonant four-wave mixing of gold nanoparticles for three-dimensional cell microscopy[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(12): 1816-1818.
- [11] Masia F, Langbein W, Watson P, et al. Triply surface-plasmon resonant four-wave mixing imaging of gold nanoparticles[J]. *Proceedings of SPIE*, 2011, 7911: 79110Y.
- [12] Garrett N, Whiteman M, Moger J. Imaging the uptake of gold nanoshells in live cells using plasmon resonance enhanced four wave mixing microscopy[J]. *Optics Express*, 2011, 19(18): 17563-17574.
- [13] Chemla D S, Heritage J P, Liao P F, et al. Enhanced four-wave mixing from silver particles[J]. *Physical Review B*, 1983, 27(8): 4553-4558.
- [14] Geng Y J, Cong L L, Tian Y, et al. Silver nanoparticle-enhanced four-wave mixing (FWM) imaging technique for visualizing sialic acid on cell membrane [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 301: 127074.
- [15] Boltaev G S, Ganeev R A, Krishnendu P S, et al. Strong third-order optical nonlinearities of Ag nanoparticles synthesized by laser ablation of bulk silver in water and air[J]. *Applied Physics A*, 2018, 124(11): 766.
- [16] Boyd R W, Shi Z M, de Leon I. The third-order nonlinear optical susceptibility of gold[J]. *Optics Communications*, 2014, 326: 74-79.
- [17] Cong L L, Geng Y J, Tian Y, et al. Plasmon-enhanced four-wave mixing imaging for microdroplet-based single-cell analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(14): 9459-9464.
- [18] Hermanson G T. *Bioconjugate techniques*[M]. San Diego: Academic Press, 1996: 597.