

微型化显微成像系统的关键技术及研究进展(特邀)

刘晓宇^{1,3}, 刘紫千^{1,2}, 斯科^{1,2,3**}, 龚薇^{2,3*}¹浙江大学光电科学与工程学院, 浙江 杭州 310027;²浙江大学脑科学与脑医学学院, 浙江 杭州 310058;³浙江大学教育部脑与脑机融合前沿科学中心, 浙江 杭州 310058

摘要 神经环路动态功能的解析是当前脑科学领域的重点和难点,微型化显微成像技术为其研究提供了重要手段。相较于双光子荧光成像和光纤光度法,微型化显微系统能够在模式动物自由活动状态下进行长时程、单细胞分辨率、实时成像。近十几年来,科学家们围绕可穿戴、高稳定性要求,先后研制了单光子、多光子成像系统,并从荧光探针、光电子元件、数据传输等方面进行不断优化,提升系统性能,扩展应用范围。将从成像原理、基本结构、系统优化、应用方案及未来发展方向等方面对微型化显微成像系统进行分析 and 讨论,综述各方向研究进展,旨在为该领域技术提升和神经科学应用提供参考。

关键词 微型化显微成像; 单光子微型化显微镜; 多光子微型化显微镜; 活体荧光成像; 单细胞分辨率

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232709

Key Technologies and Progresses of Miniaturized Microscopic Imaging System (Invited)

Liu Xiaoyu^{1,3}, Liu Ziqian^{1,2}, Si Ke^{1,2,3**}, Gong Wei^{2,3*}¹College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China;²School of Brain Science and Brain Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China;³MOE Frontier Science Center for Brain Science and Brain-Machine Integration, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract Analysis of the dynamic function of neural circuits is the focus and difficulty of current brain science research. Recently, miniaturized microscopic imaging technologies provide important research tools. Compared with two-photon fluorescence imaging and fiber photometry, miniaturized microscopic imaging systems can perform long-term, subcellular resolution, real-time imaging in freely moving animals. In the past ten years, scientists have successively developed wearable one-photon and multi-photon imaging systems with high stability. In order to improve performance and expand applications, they continuously optimized systems from the aspects of probes, optoelectronic components, data transmission and etc. In this paper, we will analyze and discuss the imaging principle, basic structure, system optimization, application scheme, and future development of miniaturized microscopic imaging systems. We summarize the research progresses in various directions, aiming to provide a reference for technology improvement and application expansion of neuroscience.

Key words miniaturized microscopic imaging; one-photon miniaturized microscope; multi-photon miniaturized microscope; *in vivo* fluorescence imaging; single-cellular resolution

1 引言

脑科学被视为理解自然现象和人类自身的“终极疆域”。脑科学研究不仅要解决最具挑战性的前沿科

学问题,而且要攻克严重危害人民身心健康的脑重大疾病,同时,也将为发展类脑计算系统和器件、突破传统计算机架构的束缚提供重要依据,决定未来人工智能的深度发展方向^[1-3]。然而,大脑的活动极具复杂

收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2023-12-12; 录用日期: 2023-12-15; 网络首发日期: 2023-12-20

基金项目: 浙江省重点研发计划(2022C03034)、浙江省自然科学基金(LR22F050007)

通信作者: *weigong@zju.edu.cn; **kesi@zju.edu.cn

性,其结构和功能之间存在着多层次多尺度的复杂神经网络联系,并且具有动态、时变的特性。因此,对大脑活动信息进行精准检测是我们理解大脑的首要任务。荧光显微成像技术(FM),如宽场荧光显微镜、共聚焦荧光显微镜、多光子荧光显微镜及光片荧光显微镜等,具备非侵入性、细胞特异性、高分辨率、实时成像等诸多优势,在神经科学领域应用广泛。尤其是近十几年来基因编码光学指示剂的发展为荧光显微成像技术在神经科学领域的应用提供了更多可能,基因编码钙指示剂(GECI)允许人们同时观察到多个神经元的活动,基因编码电压指示剂(GEVI)和基因编码神经递质/调质指示剂(GENI)则分别为观察多细胞电生理和神经递质的空间异质性、发放路径提供了可能性^[4]。

神经环路动态功能的研究是当前脑科学研究的重点和难点,要求对活体动物的神经活动进行观察,代表性技术包括双光子显微成像和光纤光度法成像^[5]。双光子显微成像深度深、对生物组织损伤小、信噪比高,在活体大脑成像中颇具优势。Na Ji团队的Chen等^[6]将自适应光学应用于双光子荧光显微系统,校正了光学畸变,进一步提升了其穿透能力。该系统能够在小鼠和斑马鱼幼鱼大脑深至500 μm处进行高分辨率体成像,实现了对突触钙和谷氨酸活性的高精度测量和记录,为在体突触结构观察和功能性测量提供了高分辨率工具。然而,大型双光子系统成像实验过程需要对小鼠进行头部固定,带来的高压以及受限的行为更容易引发动物的应激反应^[7],一定程度上会影响神经细胞的活动,从而容易导致对大脑功能的错误解码。为解决这一问题,Dombeck等^[8]将头部固定的小鼠置于一款搭建的虚拟现实设备中,并结合双光子荧光显微镜研究神经环路动力学。但是,虚拟环境^[8-10]下产生的行为对应的神经活动可能与真实状态下的并不完全一致,且虚拟的行为环境有限,也不适用于一些社交行

为(如交配、攻击、嗅探等)的神经活动机制研究。另一种常用的活体神经元响应记录的方法为光纤光度法,它能够对自由活动的小鼠进行神经发放电实时监测,解决了上述行为限制等问题,并且实验操作方便,结构紧凑,可在目标组织内长期植入,成本相对较低,目前还可实现多脑区钙信号记录^[11]。然而,其空间分辨率较低,只能对神经元群体活动进行测量,不能实现单细胞分辨率的成像^[12-14]。

近年来,微型化显微技术的发展为解决动物自主活动时单细胞分辨率的成像提供了新的可能性。这些系统轻巧,可以佩戴在小鼠、大鼠、蝙蝠和鸟类等模式动物的头部,允许动物自由行为的同时研究者以高分辨率实时追踪大量神经元的活动,这为分析行为背后的神经活动机制提供了重要的工具^[15-16]。近二十年,微型显微镜的发展非常迅猛,研究者从成像性能、结构设计、使用功能等多方面进行优化,不断拓展了其应用范围。本篇综述将重点总结单光子和多光子微型化显微系统的基本原理和发展历程,为系统工程、神经生物、数据分析多领域研究者提供一个全面的介绍和展望。

2 微型化显微成像系统的成像原理和典型结构

根据荧光激发物理机制的不同,微型化成像系统可以分为单光子和多光子两大类,图1示意了单光子(1P)、双光子(2P)及三光子(3P)荧光激发原理。与传统大型显微镜原理相同,单光子微型化系统基于线性激发和宽场成像模式,能够进行大视野成像,在成像速度上具有优势,但在哺乳动物大脑等复杂组织中,光在传播时会受到米氏散射和瑞利散射的影响^[17],进而引入较强的荧光背景,限制了成像深度;多光子微型化系统则基于非线性荧光效应和激光扫描成像原理,采用近红外或更长的激发波长,以牺牲一定的成像速度和

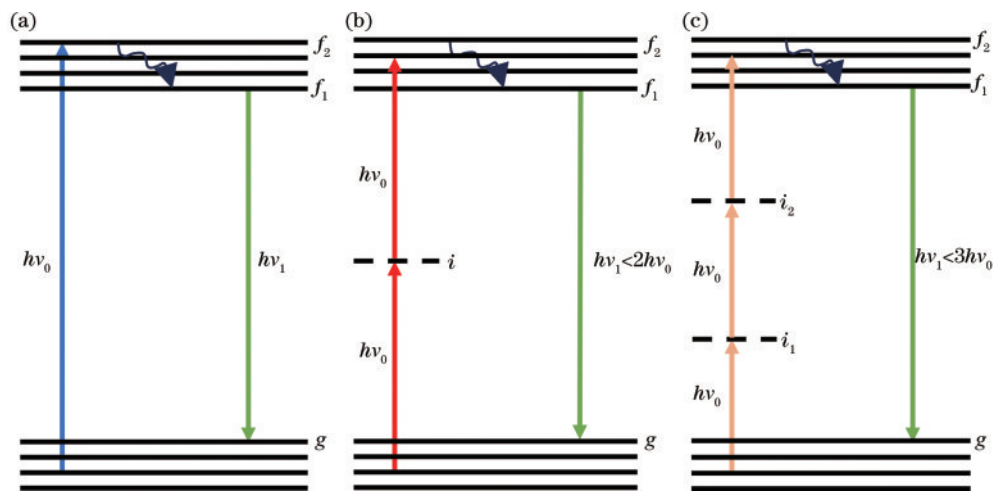


图1 荧光激发原理。(a)单光子荧光激发原理;(b)双光子荧光激发原理;(c)三光子荧光激发原理

Fig. 1 Diagram of fluorescence excitation principle. (a) One-photon fluorescence excitation; (b) two-photon fluorescence excitation; (c) three-photon fluorescence excitation

视野为代价,实现较大的穿透深度和更高的成像分辨率^[18]。

2.1 单光子微型化显微系统

单光子微型系统主要基于宽场荧光成像方式,原理相对简单,通常采用落射式,即照明光经过准直物镜后由二向色镜将方向折转 90°,从物镜出射的激发光照射到样本上,发射的荧光被同一物镜收集,光再经过透镜聚焦到探测器表面,单次曝光就能获得整个视野内的荧光图像。图 2 为单光子微型系统的基本光路及设

计,头戴式单光子微型显微镜的典型结构包括光源、滤光片、二向色镜、物镜及成像传感器。光源一般选择高亮度的发光二极管(LED)或惰性气体光源;采用微型准直透镜、收集透镜、滤光片、二向色镜等元件构建光路主体,高灵敏度感光芯片互补金属氧化物半导体(CMOS)、电荷耦合器件(CCD)等作为成像接受面;物镜则选用高数值孔径(NA)普通或渐变折射率(GRIN)透镜。头戴结构中的元件均选用小型尺寸,因此整体结构简单、集成化高。

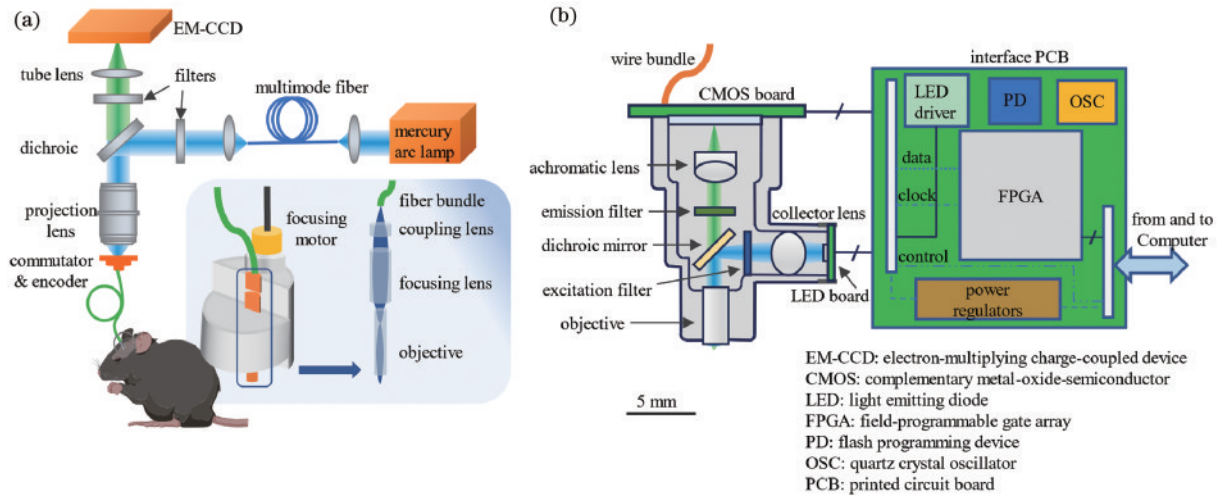


图 2 单光子微型化显微系统结构。(a)初代头戴式微型显微系统^[19]; (b)典型集成式微型显微系统^[7],左侧为系统横截面设计图,右侧为控制电路板功能示意图

Fig. 2 Diagram of one-photon miniaturized microscopic systems. (a) First-generation wearable miniaturized microscopic system with fiber bundle^[19]; (b) typical integrated miniaturized microscopic system^[7], left is design of an integrated microscopic system's cross-section, right is function of interface PCB

早在 2008 年,Flusberg 等^[19]开发了一款用于活体小鼠的单细胞分辨成像的微型化荧光成像系统,实现了在小鼠自由活动下的脑微循环和神经元 Ca^{2+} 动力学研究。如图 2(a)所示,该系统主体结构包括照明光(汞灯光源)模块、图像收集(电子增益电荷耦合器件,EM-CCD)模块及物镜组。其中前两者与物镜之间均通过光纤束连接,二向色镜反射的照明光耦合进光纤束并传导至物镜,而物镜收集到的荧光信号同样经光纤束传导至成像模块。光纤束通常直径较小并且轻便,因此基于这种设计方式,佩戴在小鼠头部的结构只包含物镜组以及焦距调整电机部分,质量仅 1.1 g。然而,光纤束在一定程度上限制了成像视场(约 0.07 mm^2)和分辨率(约 $2.8 \sim 3.9 \mu\text{m}$),且系统照明模块和成像模块所用元件结构较大并外置于主体头戴结构,影响了系统的整体集成度。

随着小型化光源和图像传感器的不断优化,该团队将光源、成像模块以及光路主体进一步集成。如图 2(b)所示,他们采用高亮度的贴片式 LED 和高灵敏度的 CMOS 传感器,并设计微型电路板进行独立控制,替代了先前的汞灯光纤光源和 EM-CCD。对整个光路也进行了微型化集成设计,选择鼓形透镜对光进

行收集,以高数值孔径的折射率渐变透镜作为物镜,最终所有元件可以集成到一个约 2.4 cm^3 大小的外壳(材质为聚醚醚酮,PEEK)中。对于供电和数据传输,该系统采用有线模式,CMOS 采集到的图像通过同轴线以及自主设计的数据采集板得到收集,再由 USB 线缆传递给计算机设备进行显示和分析。这个巧妙设计的系统总质量仅约为 1.9 g,不会影响动物的自由活动。此外,相比先前基于光纤传导的头戴式系统,它的视场提升约 7 倍($\sim 0.48 \text{ mm}^2$),同时在光学分辨率上实现了约 2 倍的增加(横向分辨率约为 $1.5 \mu\text{m}$),能够在小鼠自由活动跟踪超过 200 个浦肯野神经元的钙活动响应,并分析研究不同运动行为下微区域的同步活动。这套集成化系统开创了单光子微型化显微系统的集成方式和结构设计,光电子和机械部件的整体成本更低,更加容易搭建,具有较高的用户友好性^[7]。同年该团队创立了 Inscopix 公司,对集成式显微镜进行商业转化,推出 nVista 系列。随着技术的不断优化,单光子微型化显微系统能够以单细胞分辨能力同时对大脑中数百到数千的神经元进行成像,并能长时程追踪记录。研究人员利用其可以探究在头部固定条件下无法研究

的一系列行为神经活动机制,如运动^[20]、学习记忆^[21-22]、恐惧产生^[23]、社交^[24-25]等,因此单光子微型显微镜已逐渐成为神经科学研究中极具前景的工具。

2.2 多光子微型化显微系统

基于非线性激发效应,多光子激发模式可以减少光在组织中的散射,达到更大的穿透深度,同时荧光激发聚焦在焦点周围,能够提升成像分辨率,在红外激发波段对组织的伤害性也较小。在微型化显微成像系统领域,基于多光子成像原理的系统开发比单光子还要早些,但由于系统技术复杂性和成本更高,集成难度更大,性能提升和功能扩展存在诸多挑战,因此多光子微型显微系统的成熟相较稍晚,用户使用友好性较低,应用普适性稍显逊色^[16]。

多光子微型化显微系统包括激发光源飞秒激光器、光束扫描器件、光学成像器件以及灵敏的检测器。飞秒激光器通常都比较庞大,如何将激光光源导入系统成为微型化的第一个难点;另外扫描器件同样需要安装在集成部分,高性能、紧凑的扫描器件选型是另一关键点;高灵敏的点探测器,如光电倍增管(PMT)的集成难度也很大。多光子微型化显微系统的基本结构与单光子有明显区别,头戴部分通常不包含光源和成

像传感器,常用光纤或光纤束分别传导和收集激发光和发射荧光,同时要增加激光扫描器件。

早在2001年,Helmchen等^[26]开发了一款双光子光纤视镜,如图3所示,系统由激发光源组件、头戴显微模块和控制模块组成,三者之间通过柔性线缆连接,其中包含传导激发光的单模光纤和控制电线,控制电线为扫描模块、PMT等提供电源驱动,并完成信号采集。钛宝石激光器发出的红外脉冲激光经过一对衍射光栅得到色散补偿后,耦合到单模光纤中,由单模光纤将激发光导入头戴显微模块;除成像光学元件如准直聚焦镜、二向色镜、滤光片及水浸物镜(55×, NA=0.8)外,头戴部分包含微型的压电扫描装置和PMT,分别对单模光纤进行二维方向控制和荧光信号探测。整个装配体长约7.5 cm,质量约25 g,可以通过安装在颅骨表面的金属板固定在大鼠头部颅窗上方,以2 Hz的成像速度实现了对清醒自由活动大鼠的血管和椎体神经元的成像,视场约达65 μm。这套系统展现了多光子微型显微镜的基本结构,但仍存在一些不成熟的设计,科学家们不断地对系统各模块进行改进,提升系统集成度、减轻质量,同时也在成像视野、成像速度和成像精度等性能方面进行突破,涌现了更高性能的多光子系统。

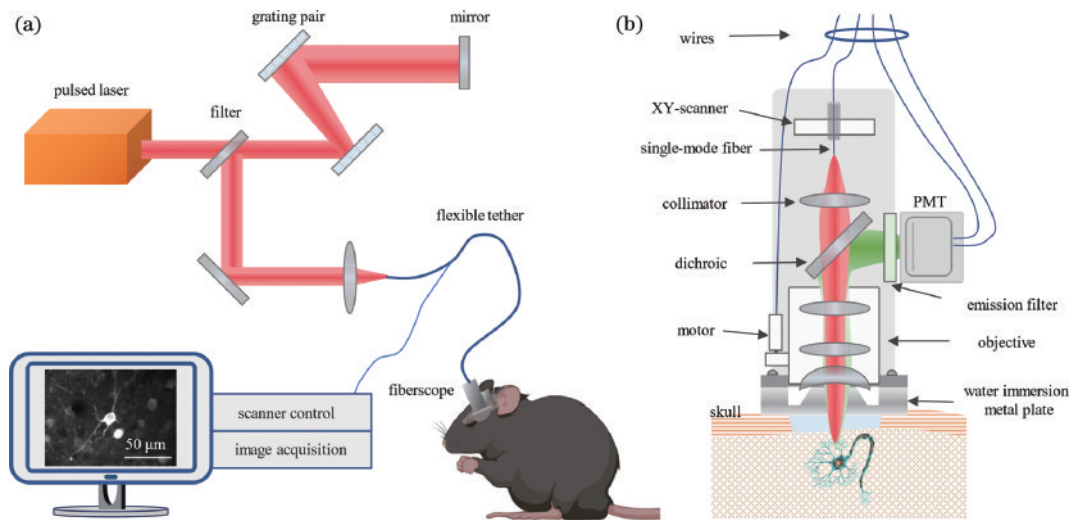


图3 多光子微型化显微系统结构^[26]。(a)初代多光子微型显微系统光路及成像方案;(b)头戴部分光路结构

Fig. 3 Diagram of multi-photon miniaturized microscopic system^[26]. (a) Optical path and imaging scheme of the first-generation multi-photon miniaturized microscopic system; (b) optical path of wearable component

3 单光子微型化系统技术进展

单光子微型显微镜的集成式结构开发后,加利福尼亚大学洛杉矶分校、波士顿大学、多伦多大学和国家药物滥用研究所(NIDA)也相继设计了多种单光子微型显微镜系统^[15],如 UCLA miniscope^[27]、Finchscope^[28]、CHEndoscope^[29],设计结构基本与图2(b)相似。UCLA miniscope的光学元件、设计框架以及组装指南已经在网站(<http://miniscope.org>)上公开,供技术专家及应用者搭建和使用。但商业化的折射率渐变透镜的NA有限,

可能会影响激发和收集效率,视场也会受到一定的限制,因此有研究团队进一步优化了物镜模块,如NIDA miniScope^[30]采用一组消色差透镜作为物镜,一定程度上可以提升NA,减少光学畸变并校正色差。表1总结了几个相似结构系统的主要参数,综合来看,这些典型系统的质量通常在3 g左右,视场大小约为500 μm×500 μm^[29]到1.1 mm×1.1 mm^[30],具备单细胞分辨率,不同的图像传感器能够提供不同的成像帧率,通常可以达30 frame/s,基本满足钙信号活动记录需求,然而对于更多或特殊的应用需求,这些系统仍存在一定的局限。

表 1 典型单光子微型显微系统性能参数

Table 1 Performance parameters of typical one-photon miniaturized microscopic systems

Typical IP system	Weight /g	Size	Frame rate /Hz	Field of view / μm	Objective
Integrated microscope ^[7]	1.9	$\sim 2.4 \text{ mm}^3$	36–100	600×800	GRIN lens
UCLA miniscope V4 ^[27]	2.6	$15.6 \text{ mm} \times 16.9 \text{ mm} \times 22.3 \text{ mm}$	120	1000	Achromatic lens
Finchscope ^[28]	1.8	$10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times 21 \text{ mm}$	30	600×800	GRIN lens
CHEndoscope ^[29]	4.5	$15.9 \text{ mm} \times 17 \text{ mm} \times 32.5 \text{ mm}$	20	500×500	GRIN lens
NIDA miniScope ^[30]	2.4	$12.5 \text{ mm} \times 14.45 \text{ mm} \times 18.24 \text{ mm}$	10	1100×1100	Aspherical lens

成像分辨率、视场、速度等是光学系统的常见性能指标,同时这也是应用学者关注和评价光学系统性能的重要维度,光学荧光显微系统的改进发展也是对各个性能参数进行优化的过程,通过技术的更新迭代来不断满足更多的研究需求。近些年,研究者们对上述性能参数不断进行技术突破,又涌现出一批单光子微型化系统,为神经科学领域研究提供更有力的工具。系统的实用性和功能性在实际应用中也非常重要,在满足基本的成像要求时,提升便携性和用户友好度,会进一步扩展系统应用场景。同时在神经科学领域,研究问题的多样化需求也推动多模态、多功能的微型化系统开发。因此在这部分总结了单光子微型显微系统在不同维度下的优化升级,帮助使用者了解并针对不同应用场景来选择适合的类型。

3.1 光学成像性能提升

3.1.1 成像视场

成像视场即系统能够拍摄的图像范围,可以直接反映系统收集成像目标结构数量的能力,因此在研究神经元群体或者神经网络动力学时需要采集到更多的神经细胞或可以拍摄到更多的脑区,这就要求光学成像系统具有大视场。视场通常可以分为横向视场(即二维平面下的成像视野)和轴向视场(即第三维度上系统能够收集的信息范围)。

3.1.1.1 轴向成像视场

虽然系统集成化和规范化越来越成熟,但是在单光子微型化荧光显微镜的早先设计中普遍缺少三维成像功能,在系统组装并安装在动物实验位置后,物镜与被观察的成像焦面之间位置和距离不变,这就导致实验时无法对除焦面外的其他深度位置成像,也就难以跨越不同区域追踪不同深度神经细胞的活动。通常实现 3D 成像主要有两种思路:一种利用机械方法或光学方法实时调整成像聚焦面,以获得不同焦层的荧光图像,可概括为 Z 轴变焦;另一种不通过扫描的方法,通过光路原理直接实现 3D 成像,类似于光场成像。由于单光子成像原理的固有属性,3D 成像的范围虽然会受到限制,但与基本设计相比已经有了显著的提升,足以满足体积成像的需求。

对于 Z 轴变焦,目前主要有机械和光学两种方案。机械变焦系统使用微型驱动器(例如超声马达)来驱动电机移动整个微型显微镜,改变光学成像焦面在 Z 轴

的位置来实现不同深度的成像,这种方式需要增加的系统结构较为简单,但所需要的微型驱动器往往尺寸较大且有一定的速度限制,导致稳定性不高、变焦速度慢等;或者将位置可调谐装置连接在 CMOS、物镜或光路结构中的其他具体元件上,需要改变焦面时,手动或者电动微调元件在轴向上的位置,实现变焦。Piyawattanametha 等^[31]于 2009 年在一套微型化系统成像面上引入聚焦快门模块,整个系统外壳由 PEEK 材料制成,允许手动粗略调节成像头在轴向上的位置,需要进行微调(精细聚焦)时,可以打开微型电动机来驱动聚焦快门。Barretto 等^[32]将光学系统中的显微物镜和微型内窥镜探头安装在一对级联聚焦电动机上,使显微物镜可以单独或者与探头一起移动。最近,Featherscope 和 Kiloscope 的设计也采用了机械焦点调节,它们使用压在 CMOS 印刷电路板(PCB)上的螺钉来实现焦面调整,轴向调节范围达到 $200 \mu\text{m}$ ^[33]。这种方式可以更为精准地控制调节模块,变焦稳定性较好,调节速度可控,但是单独结构的微调可能会对光路中的原本结构(如一些耦合模块)有微小改变,降低调制函数值,对成像质量有一定的影响。

光学变焦式与机械式不同,不存在系统主体或光学元件的位移,而是通过改变光学面性质来改变系统焦距,一般可以分为改变透镜材料折射率和改变透镜面曲率两种方式,都是由特殊材料或原理制成的透镜来实现的,3 种常用光学轴向变焦模块的工作原理如图 4 所示。液晶材料制成的透镜可以实现折射率的改变^[34],原理^[35]如图 4(a)所示,向液晶透镜施加小的电场,可以使其中的液晶分子以不均匀的方式重新排列,这样当光线穿过该透镜时,透射光的相位中会产生球形延迟,从而实现光线聚焦面的变化。Bagramyan 等^[35]将可电调液晶透镜(TLCL)与 GRIN 透镜结合,制成了焦距可调的光学成像探头,在恒定电压的驱动频率下对 TLCL 进行电控,能实现 $(74 \pm 3) \mu\text{m}$ 的焦点位移。之后,他们^[36]在自主开发的高分辨率轻型单光子微型化显微镜^[37]的光学探头前端加入 TLCL,在 $(100 \pm 10) \mu\text{m}$ 的变焦范围内能够实现横向 $(1.4 \pm 0.1) \mu\text{m}$ 、轴向 $(15 \pm 2) \mu\text{m}$ 的分辨率,整个装置的质量约 1.4 g,在自由活动小鼠进行行为任务时可以观察到深部脑区 3D 范围内的神经元精细结构的活性。液晶透镜结构小、质量轻且功率低,在系统集成化方面具有优势,但该

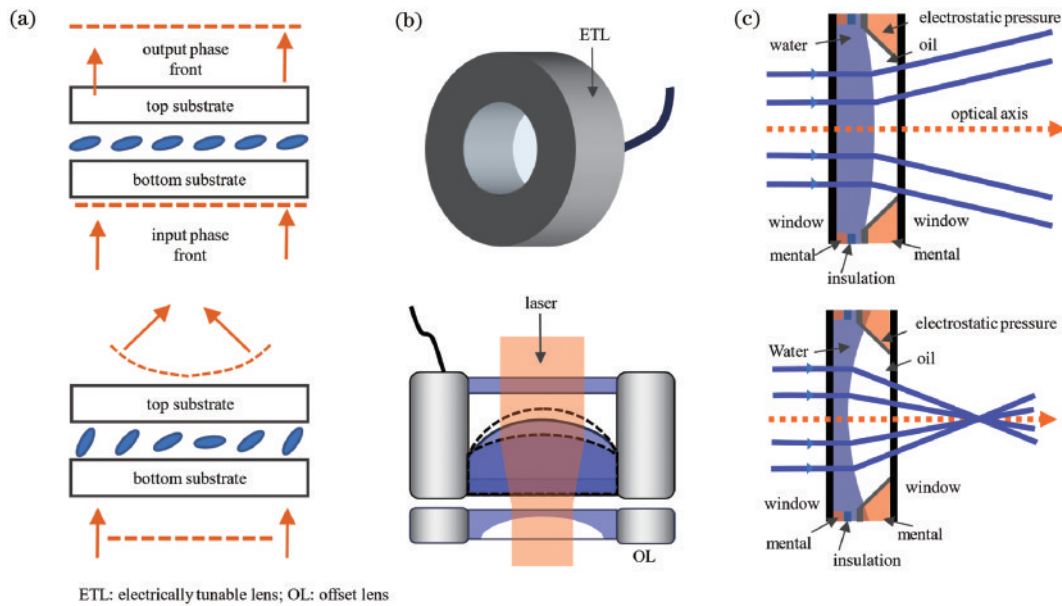


图4 轴向扫描模块的工作原理。(a)可电调液晶透镜^[35];(b)电动可调透镜^[39];(c)电湿润透镜

Fig. 4 Principle of axial scanning modules. (a) Tunable liquid crystal lens (TLCL)^[35]; (b) electrically tunable lens (ETL)^[39]; (c) electrowetting tunable lens (EWTL)

种透镜在结构中能够实现的变焦范围较小,基本在 $100\ \mu\text{m}$ 左右,轴向成像范围不大。

一种改变透镜曲率的方法是基于膜驱动原理^[38],使用电动可调透镜(ETL)这种装置。如图4(b)所示,其内部含有一个可弯曲的薄膜,通过外部施加电压来改变薄膜的半径,从而改变透镜对光的聚焦平面。电动变焦透镜中的薄膜结构被封装在两片盖玻璃之间^[39],或者透镜本身由两个光学元件组成,其中一个具有光学面,另一个具有自由面^[40]。这种装置能够实现快速变焦,通光孔径较大,因此相比液晶透镜,其获得的图像更加清晰锐利。ETL在台式双光子显微镜中已经得到应用,能够实现 $2.5\ \text{mm}$ 范围内的变焦,然而这种装置的尺寸相对较大,功耗也较高^[39]。另一种基于透镜面曲率改变的器件是电湿润透镜(EWTL),它是基于电湿润效应制成的,如图4(c)所示,这种透镜将一个绝缘液滴(例如油滴)封装在导电基板和导电液体之间,通过施加电压来改变绝缘液滴的形状,从而改变光学表面的曲率以实现变焦功能^[41]。电湿润透镜具有优良的光学质量,变焦速度快,尺寸小且功耗低,在医学成像内窥镜、眼科设备等领域得到广泛应用,并为微型化显微成像系统解决轴向变焦问题提供了新思路。2015年,Ozbyay等^[42]首次将EWTL应用于微型化显微镜,此基于共聚焦成像原理的光纤耦合微型显微镜能够实现约 $80\ \mu\text{m}$ 的轴向扫描范围和约 $12\ \mu\text{m}$ 的轴向分辨率。3年后,他们^[43]开发了一款双光子微型光纤耦合显微镜,其轴向聚焦范围进一步增至约 $180\ \mu\text{m}$ 。近些年来,越来越多的微型化系统引入了变焦功能, Hayashi等^[44]介绍了一款基于EWTL的低成本、易于构建且采集快速的3D微型化显微镜,由于不受光纤的

限制,它实现了更大范围的成像区域。Inscopix nVista 3.0和UCLA V4.0也采用EWTL元件,并分别能够实现约 $300\ \mu\text{m}$ 和约 $200\ \mu\text{m}$ 的焦距范围,具有更强的焦距调节能力。

除了使用变焦模块等来直接获取轴向多层次信息外,单光子微型显微系统与体成像技术结合为三维生物组织结构的研究提供了另一类有力工具。一种基于光场成像的显微镜MiniLFM在2018年由Skocek等^[45]开发,整个系统是基于传统的单光子微型显微镜设计的,加入一个微透镜阵列(MLA),能够将3D图像投射到CMOS上,并通过基于约束矩阵分解的计算策略(种子迭代分离法, SID)从2D信息中重建了3D图像。MiniLFM能够捕获尺寸为 $700\ \mu\text{m} \times 600\ \mu\text{m} \times 360\ \mu\text{m}$ 的图像,帮助分析自由移动小鼠海马中的神经网络活动,成像帧率为 $16\ \text{Hz}$ 。随后,2020年Chen等^[46]开发了Gali-MiniLFM,基于Finchscope和光片成像原理,同样使用MLA并优化了光学配置,实现了比MiniLFM更好的横向($\sim 5\ \mu\text{m}$)和轴向($\sim 21\ \mu\text{m}$)分辨率。不久之后, Yanny等^[47]报道了一种新颖的设计,移除了传统微型显微镜的成像筒镜(TL),并在物镜孔径上放置了一个经过优化的多焦相位掩模,这种配置显著减小了设备的尺寸,并以每秒40帧的速度实现 $900\ \mu\text{m} \times 700\ \mu\text{m} \times 390\ \mu\text{m}$ 的成像视场。Miniscope3D能够实现 $2.76\ \mu\text{m}$ 的横向分辨率和 $15\ \mu\text{m}$ 的轴向分辨率,与基于光场的系统相比,性能提高了约2倍,利用这个系统,该团队实现自由运动动物的体积神经活动以及动态样本的3D运动研究。图5展示了MiniLFM、Gali-MiniLFM及Miniscope3D的系统设计和成像原理。图5(b)中Gali-MiniLFM明显缩短了光程,大大提升了结构系统紧凑度,其中a、b、c分

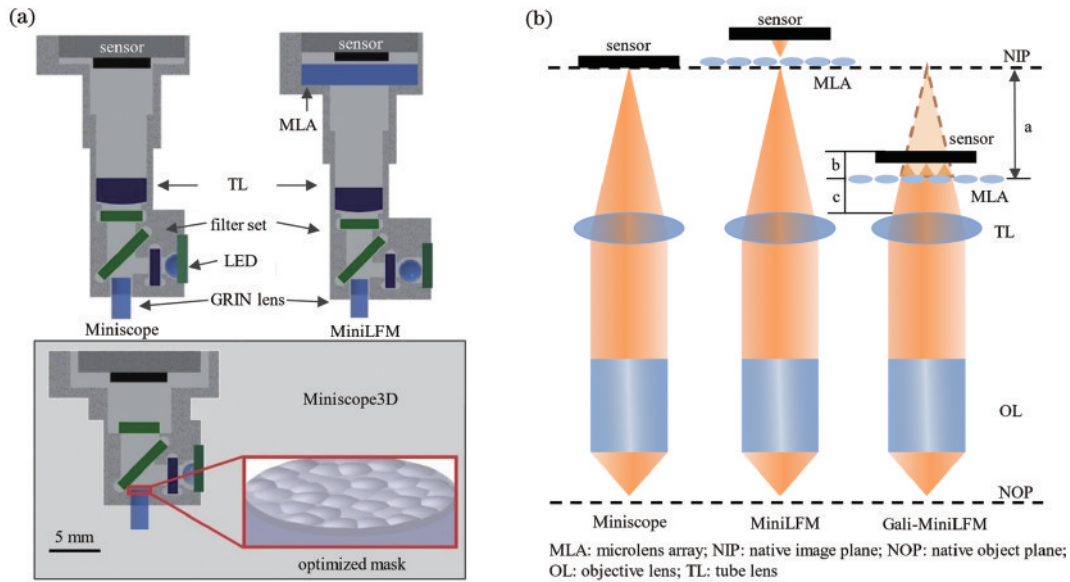


图 5 单光子三维成像微型显微系统。(a)传统系统、MiniLFM 及 Miniscope3D 的光路结构^[47]；(b)传统系统、MiniLFM 及 Gali-MiniLFM 的成像光路原理^[46]

Fig. 5 3D one-photon miniaturized microscopic systems. (a) Optical path design of miniscope, MiniLFM, and Miniscope3D^[47]; (b) imaging pathway of miniscope, MiniLFM, and Gali-MiniLFM^[46]

别代表了微透镜阵列和像平面、微透镜阵列和图像传感器、微透镜阵列和成像透镜之间的距离。凭借新颖的光学配置和这些光学元件的发展,基于单光子的微型显微镜不再局限于 2D 单层成像,这有助于推动神经科学领域的大规模研究。

3.1.1.2 横向成像视场

为了给不同脑区的神经网络动态研究提供更合适的工具,研究者还开发了具有较大视场的单光子微型化显微镜。根据不同的目的,有一些大视场成像系统仍然保持单细胞分辨率,以研究神经元活动,而另一些中尺度显微镜则用于较大范围的大脑皮层动态成像。

传统微型显微镜的物镜设计限制了视场,从而限制了可访问的神经元群体。如表 1 整理的典型系统,最大成像视场也仅达到 $1.1\text{ mm} \times 1.1\text{ mm}$ ^[30]。为了全面可视化整个大脑的活动或者不同区域之间的连接, Leman 等^[48]构建了一个保持单细胞分辨率的中尺度显微镜,该显微镜质量为 $4.2\sim 4.5\text{ g}$ 。一系列图 6(a)所示的 6 mm 直径的平凸透镜构成了主要的成像光路。该显微镜实现了更大视场($\sim 4\text{ mm} \times 3\text{ mm}$),并在视野中心达 $<5\ \mu\text{m}$ 的横向分辨率,如图 6(c)所示,仍能够分辨单细胞结构。他们通过记录自然气味实验中小鼠嗅觉动态以及海马 CA1 区域的群体活动来进一步验证该

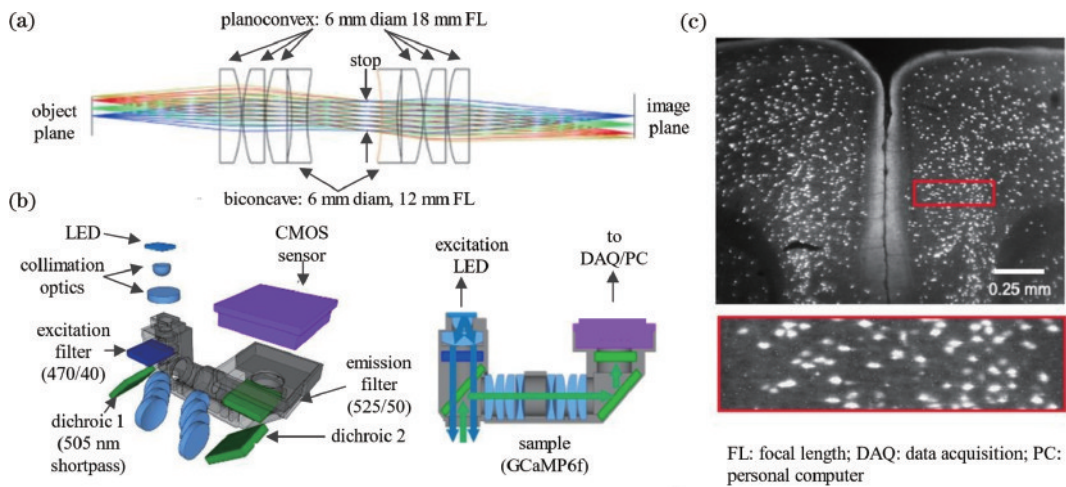


图 6 单细胞分辨介观微型显微镜光路设计和成像结果^[48]。(a)光路仿真设计；(b)左侧为系统组件爆炸结构,右侧为照明及成像光路示意图；(c)荧光标记大脑皮层中间神经元的单细胞分辨介观成像结果

Fig. 6 Mesoscope design and characterization at single-cell resolution^[48]. (a) Configuration of the optical pathway; (b) left is exploded view showing system components, right is schematic of the illumination and imaging pathway; (c) mesoscopic image of ZsGreen-labeled interneurons in cerebral cortex at single-cell resolution

系统。2023 年 Guo 等^[49]在 *Science Advances* 上正式发表 MiniLFOV, 其视场为 UCLA V3.0 的 30 倍, 为 UCLA V4.0 的 12 倍, 他们使用商用透镜, 并构建了两种具有不同工作距离的光路配置。MiniLFOV 能够实现至少 $3.1\text{ mm} \times 2.3\text{ mm}$ 的视场, 并记录了自由行为的大鼠 CA1 层中的 1000 多个神经元。为了进一步减轻质量和优化视场, Scherrer 等^[33]开发了名为 Kiloscope 的新型系统, 使用三星 Galaxy S9 智能手机后置摄像头模块中的非球面透镜, 系统仅重 1.4 g, $4.8\text{ mm} \times 3.6\text{ mm}$ 的视场中心分辨率高达 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。MiniLFOV 和 Kiloscope 都是开源且易于构建的, 此类具备单细胞分辨率的大视场微型化显微镜能够实现对广泛分布神经元活动模式的可视化, 并分析自由行为动物中不同行为的连接。

另一种具有更大视野的微型显微镜牺牲了光学分辨率, 获得了更大的成像视野, 通常被称为广域显微镜或介观显微镜。最早在 2018 年, Scott 等^[50]开发了名为 cScope 的头戴式介观显微镜, 该系统质量为 33 g, 光路由 6 片商业透镜组成, 实现了 $7.8\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的大视野范围, 在自由活动的大鼠中同时记录了脑部感觉和运动等协同区域, 结合钙成像指示剂 GCaMP6f 广域表达的 Thy-1 转基因大鼠品系, 他们为大鼠钙成像提供了先驱性技术, 并将微型显微镜的应用领域扩展到了大范围皮层动态研究。3 年后, Rynes 等^[51]开发了具有更大视场 ($8\text{ mm} \times 10\text{ mm}$) 和更轻巧 (3.8 g) 的 mini-mScope, 该系统设置三个角度的光源进行斜入射照明, 除滤光片外, 仅使用单个透镜将图像投射在 CMOS 表面上, 结合先前开发的透明聚合物颅骨^[52]将 mini-mScope 安装在小鼠脑部, 记录了感觉刺激、探索行为、社交行为及从清醒到睡眠过程中的介观尺度皮层钙活动, 以验证系统的可行性。整套解决方案已经开源, 系统主体仍可采用 3D 打印的方式制作, 所用器件易于购买和安装。受物理原理限制, 该设备获得更大视场的同时不可避免地会降低光学分辨率, 并且难以在轴向上进行 3D 成像, 因此一般用于获取大脑皮层区域的二维平面成像。

2020 年, Xue 等^[53]利用计算成像技术, 通过额外的元件和算法辅助增强传统光学设计, 提出了一种计算增强 3D 宽场中尺度微型显微镜 (CM^2)。它能够实现 $8.1\text{ mm} \times 7.3\text{ mm} \times 2.5\text{ mm}$ 的单次成像范围, 具有约 $7\text{ }\mu\text{m}$ 的横向分辨率和小于 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的轴向分辨率, 并具有高达 21.6 百万体素的信息吞吐量, 兼具了大视场和单细胞分辨的特点。两年后, 经过技术升级, 他们^[54]推出了 $\text{CM}^2\text{ V2}$, 相较于前一代斜入射的照明方式, $\text{CM}^2\text{ V2}$ 采用均匀照明, 对硬件系统进行了升级, 并开发了一种精确高效的三维线性位移变异 (LSV) 模型来表征空间变异的像差, 整体系统的光照效率和图像信噪比得到了提升, 实现了约 7 mm 的视场和约 $800\text{ }\mu\text{m}$ 的成像深度, 横向分辨率约为 $6\text{ }\mu\text{m}$, 轴向分辨

率约为 $25\text{ }\mu\text{m}$, 速度也提升了约 1400 倍。 CM^2 系列利用计算方法一定程度上克服传统光学设计中性能互相制约的问题, 将极大地促进对自由活动动物大规模三维荧光成像的研究。2023 年 Axel Nimmerjahn 团队^[55]又开发了一款可穿戴广域显微镜, 自主设计的全光学镜组使系统在保持视场范围 (7.9 mm^2) 的同时, 将分辨率提升至约 $3\sim 4\text{ }\mu\text{m}$, 整套系统质量小于 10 g, 研究者将该系统安装在小鼠背部, 研究了局部疼痛性刺激引发的多个脊髓节段中星形胶质细胞的兴奋性活动。

3.1.2 成像分辨率和对比度

分辨率是荧光显微成像领域另一个至关重要的系统参数, 它直接反映了系统能够观察到的结构的尺度级别, 包括中尺度、细胞尺度或者亚细胞尺度。成像对比度则是对图像中信号和噪声大小的量化, 更是直观反映了图像的质量和清晰度。在 3.1.1 节中, 单光子微型化显微镜在轴向上成像的问题虽然得以解决, 但因成像原理的固有特点, 系统对离焦信号的抑制能力有限, 图像会有较强的背景, 尤其在活体脑成像时, 严重的组织散射会导致成像信噪比大大降低。介绍单光子微型显微成像领域研究者在提升光学系统分辨率和对比度方面做出的努力, 以及对平衡分辨率提升和视场扩大的突破挑战。

传统设计的单光子荧光显微镜横向光学分辨率通常约为 $2\sim 4\text{ }\mu\text{m}$, 轴向分辨率要在几百微米, 但足以记录单细胞活动响应, 因此广泛用于视场范围内大量神经细胞随实验动物行为的响应追踪。为了实现更精细的结构成像, Bagramyan 等^[35-37]采用了不同的光路设计, 横向和轴向分辨率分别达 $(1.4 \pm 0.1)\text{ }\mu\text{m}$ 和 $(15 \pm 2)\text{ }\mu\text{m}$, 可以清晰观察到神经元树突棘等精细结构, 尽管系统成像视场仅约为 $(150 \pm 10)\text{ }\mu\text{m}$, 但也为神经科学成像领域研究细胞精细结构或亚细胞结构提供了有力工具和设计思路。

单光子微型显微镜成像图像对比度受限主要源于宽场成像原理, 聚焦面以外其他的荧光信号均会被系统收集而产生很强的背景光。为了克服这一挑战, Ozbay 等^[42]开发了微型纤维耦合共聚焦荧光显微镜, 头戴微型物镜耦合激光共聚焦成像系统, 实现 $1.8\text{ }\mu\text{m}$ 的横向分辨率, 在 $\sim 80\text{ }\mu\text{m}$ 的深度空间内轴向分辨率达 $\sim 12\text{ }\mu\text{m}$ 。Dussaux 等^[56]也开发了基于共聚焦成像原理的微型化显微镜, 其能够在直径为 $230\text{ }\mu\text{m}$ 的视场范围内实现 $10.5\text{ }\mu\text{m}$ 的轴向分辨率, 探测器可以 200 Hz 的速度采集无背景荧光图像。共聚焦原理光路设计和头戴部分结构如图 7(a) 所示, 商用显微物镜和光纤将外置系统与头戴微型物镜耦合, 因此外置系统不受微型化限制, 充分保持共聚焦的高分辨性能。Supekar 等^[57]则利用超分辨荧光显微成像思路, 开发了 SIMscope3D, 光纤 LED 经过数字微镜器件 (DMD) 生成特定相位分布的结构光, 如图 7(b) 左下角所示, 此结构光由多模光纤束导入微型显微系统主体, 经过算

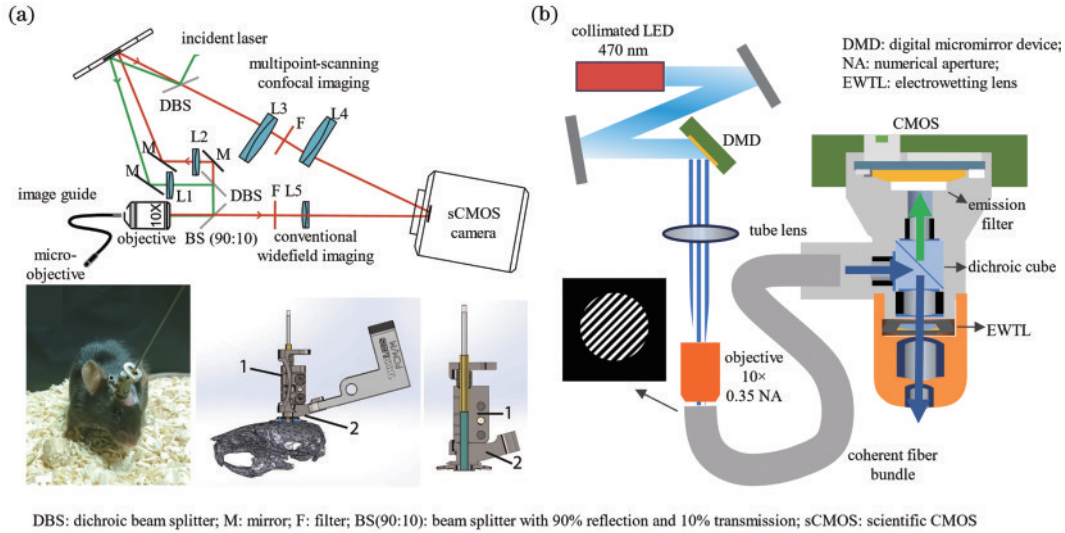


图7 分辨率和对比度提升技术路径。(a)基于共聚焦成像原理的单光子微型显微系统^[56],上图为共聚焦光路设计,下图为小鼠佩戴系统示意图及图像传导器固定方法,使用连接装置将图像传导器连接在1号GRIN镜头上,1号GRIN镜头使用2号金属板固定在颅骨上;(b)基于结构光照明成像原理的单光子微型显微系统^[57]

Fig. 7 Technical path of resolution and contrast improvement. (a) One-photon miniaturized microscopic system based on the confocal imaging principle^[56], top is design of confocal optical pathway, bottom is picture of an unrestrained (freely behaving) mouse in its cage with the fiberscope probe fixed on the skull, and fixation of the image guide. The image guide is attached to the GRIN lens using a connection device (piece 1), and the GRIN lens is fixed to the skull using a head plate (piece 2) that is positioned using a micromanipulator; (b) one-photon miniaturized microscopic system based on structured illumination microscopy^[57]

法重构的荧光图像抑制了焦平面之外的背景散射光,成像的轴向分辨率可达 $18\ \mu\text{m}$,实现了高分辨率体成像。2023年, Axel Nimmerjahn 团队^[58]除设计 macroscope 以外还设计了一款兼顾综合性能的单光子系统,其能够在 $911\ \mu\text{m} \times 703\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$ 的范围内实现横向约 $(0.68 \pm 0.01)\ \mu\text{m}$ 、轴向约 $(7.85 \pm 0.33)\ \mu\text{m}$ 的高分辨率,同时工作距离达 $2.365\ \text{mm}$,提高了使用灵活性,研究者可以用该系统对星胶细胞等要求系统高分辨率的结构进行成像和研究。

3.1.3 成像速度

CCD 因成像原理上的优势,获取的图像具有低噪声、高质量的特点,但它的电路设计结构复杂,体积庞大,信号读取速度较慢,耗电量是 CMOS 的 8~10 倍,制作工艺难度大,因此成本也比较高。CMOS 直接将采集到的光信号转换为电信号,数据读取简单快速,而且其电路结构所需的元器件可以在同一工序中集成,结构紧凑。因此从 2011 年的集成式微型显微镜开始,CMOS 逐渐成为单光子微型显微系统中的主流图像采集模块。

整体系统的图像采集速率主要决定于所用的芯片,通常一款 CMOS 在全画幅工作时采集速度最低,在可达到的最高帧率范围内,通过调整用于采集信号的画幅大小来达到较高的成像速度。大多数单光子微型化显微镜以 $\sim 30\ \text{frame/s}$ 的速率采集荧光图像,目前系统的速率最高能达 $200\ \text{frame/s}$,在常用的商业化设备中,UCLA V4.0 可以达 $120\ \text{frame/s}$ 的采集帧率,因

此,先前的系统足以对神经元毫秒级的 Ca^{2+} 动态进行时间上精确的记录。然而,对于许多其他神经科学应用,如瞬态检测或快速网络振荡研究,需要更高的记录速率,以捕获动态的尖锐响应。

GEVIs 的开发推动了神经科学领域的研究进展,它具有更精确的时间分辨率,能够在电生理时间尺度上匹配神经元活动尖峰,与 GECIs 一样,它还能提供非侵入性、基因特异性和稳定的指示和成像。为匹配 GEVIs 标记的神经活动的响应速度,单光子微型显微镜的采集帧率必须显著增加,至少要达 $200\ \text{frame/s}$ 。Juneau 等^[59]于 2020 年开发了 MiniFAST,提高了微型显微镜在高速成像和敏感信号分析方面的能力。该系统采用了 Sony CMOS (IMX290LLR),具有 213 万像素和高采样分辨率,它能够提供全画幅 (1920×1080 像素) $30\ \text{Hz}$ 的采集速率。他们通过限制成像区域来实现更高的帧率,例如在 1920×55 像素的区域上可达到 $500\ \text{Hz}$ 。因此,MiniFAST 不仅能够以 $30\ \text{Hz}$ 的帧率记录高分辨率的钙信号,还可以更高的速度解码电压活动,文中展示了 $500\ \text{Hz}$ 的体外和 $300\ \text{Hz}$ 的在体成像结果。尽管高速采集时视场较小,MiniFAST 仍然是一项突破性的技术,为微型荧光显微镜提供了更快速、更敏感的记录技术,具有良好的发展前景。

3.2 使用功能扩展

随着电路设计、集成硬件、数据传输等技术的发展,研究者在系统搭建和功能完善上不断做出努力,使单光子头戴式微型显微镜的结构进一步得到轻便化。

同时为满足神经生物领域更丰富的研究需求,近年来多功能性、多模态化微型显微镜也发展迅猛,光遗传学技术、荧光蛋白标记及电生理技术等相结合为解析更复杂、更深层、更具体的神经生物问题提供了有力的工具。

3.2.1 无线传输系统

最初微型化显微镜的设计有 3 个主要的组成部分,包括头部固定结构、数据获取模块(DAQ)和电脑。通常头戴部分通过一根同轴电线连接,接收控制信号并将 CMOS 采集到的数据传输到 DAQ 进行解码,DAQ 与电脑之间同样用数据线连接,实现软件对系统的控制和数据回传显示。此设计中头戴部分连接的同轴电线一般选用细线,以尽量减轻对动物自由活动时的影响,但长期佩戴时动物可能会啃咬损坏线缆,导致数据传输中断,或者对于大范围活动行为实验、多动物行为模式同时探究的复杂应用场景,有线设备一定程度上会造成干扰。

来自美国国家药物滥用研究所的团队^[30,60]设计了一种无线的单光子微型化显微镜,整个系统由一个质量为 3.8 g 的锂聚合物电池(180 mAh)供电,电池可以携带在动物的背部。他们将上位机通信接口、可编程门阵列(FPGA)以及微型存储卡(micro SD card)与 CMOS 集成在一起,实时数据可以存储在 micro SD card 中,支持连续 40 min 的数据记录。利用这套无线系统,他们对处在同一旷场内的两只小鼠皮层同时进行成像,记录了它们在相互作用时背侧纹状体数百个神经元的活动。Liberti 等^[28]设计的无线系统具有不同范式,他们采用一款功率为 100 mW 的发射器(BOSCAM, TX24019)来实现数据实时传输,解决了存储卡无法实时观察的弊端。根据研究动物的质量可以选择电池的大小,小型电池(50 mAh)质量为 1 g,可以维持 30 min 的使用,而质量约为 3 g 的大型电池可以维持 1 h 的记录。这款无线设备已经应用于鸣禽和蝙蝠,能够以约 2.37 GHz 的频率传播数据,研究者监测了蝙蝠在飞行时海马区 CA1 神经元的活动,并发现了稳定的神经编码对导航功能起到的作用^[61]。2023 年,另一款轻便的无线微型显微镜 wScope^[62]被开发,它采用了频率调制技术(FM)来传输高质量信号,并实现了实时预览功能,设备灵活度非常高,能够同时对 8 只小鼠进行成像,因此在建立复杂的行为研究模型方面具有更大的便利性。

值得一提的是,无线微型显微镜已经在小鼠空间功能相关研究上有较好的应用,并且得到了可靠的生物结论。2020 年发表的一篇工作应用 UCLA 无线版本系统,研究者着眼于颞叶癫痫导致空间记忆障碍的机制,发现从癫痫发生的第 6 周左右开始的神经元重新映射所造成的海马同步紊乱是造成空间处理能力降低的重要因素^[63]。无线功能的开发使得同时对多只小鼠进行研究成为可能,扩展了模型种类,也允许长期纵向追踪小鼠的神经编码网络发生变化,为长时间复杂神经编码问题的研究提供了设备基础。

3.2.2 光遗传系统

光遗传技术也是神经科学研究领域非常重要的技术之一,其结合了光学和遗传基因工程学等,利用特定波长的光脉冲实现对神经元活动的精准调控,在对大脑神经活动进行成像研究、对应行为机制探索的基础之上,利用光遗传技术,可以有针对性地实现对神经元的刺激或抑制,从而实现对生物体行为等的调控,为神经疾病的干预治疗提供研究基础^[64]。光遗传技术和荧光成像可以相互结合,同时实现在体光遗传刺激和神经元活动记录,通常双光子荧光显微成像系统可以实现上述功能,但整体设备庞大昂贵,同样不具备生物体自由活动行为下的实验条件^[65-66];光纤适合应用于自由活动动物,且具有双向传输功能,除成像外也可参与调控,但同样会受限精度和机械结构;单光子微型化显微镜能很好地解决这一问题,将光遗传技术结合到具有基本荧光成像功能的系统中,实现了在体神经元活动记录及同步刺激。Stamatakis 等^[67]在单光子微型化荧光成像系统的照明光路中引入光遗传刺激光源,EX-LED(激发光源)波长为 435~460 nm,以观察绿色钙指示剂,OG-LED(光遗传光源)波长为 590~650 nm,能够抑制红移视蛋白,它们形成一套能够实现单细胞层面钙信号记录及神经调控的系统,解决了光纤方式实现钙成像与神经调控的视场受限、无法单细胞分辨的问题,这也是 Inscopix 公司 nVoke 系统的前身。Srinivasan 等^[68]改造了 UCLA 系统的光源部分,利用一面全反射镜将光纤耦合双激光器光束传送到系统中,450 nm 蓝光用于激发荧光,590 nm 黄光用于激光调制,能够周期性触发调控光,实现对自由活动小鼠的海马 CA1 区细胞同时成像及活动抑制。近年,Zhang 等^[69]开发了一个配备了全光模式刺激和成像功能的微型显微镜(MAPSI),激光调控光斑能够达到~10 μm 的精度,并利用 DMD 实现了对单光子微型显微镜视场范围(~250 μm)内任一细胞的刺激,在完成钙成像的同时应用不同时空模式光进行调控,帮助进一步理解大脑神经元活动和行为之间的关系。图 8(a)为 MAPSI 系统内部光路示意图。

3.2.3 双色通道系统

随着基因编码荧光探针技术的不断发展,光谱可分离的靶向探针能够使不同类型的细胞群体可以得到同时成像,但目前的微型显微镜仅限于采集单一光谱的荧光信号。波士顿大学研究团队^[70]在芝加哥举办的第 49 届年度神经科学学会会议上展示了单光子双色(1P2C)微型化显微镜系统,由传感器驱动的信号能够在交替帧采集时触发单个 LED 光源,再对双通道采集的信号进行融合实现对两种荧光指示剂标记细胞的同时记录。双色记录系统的开发难点在于色差的控制和荧光串扰的校正。蓝凯秋等^[71]提出了一款双色荧光成像微型化显微镜(DCFIMM),设计了一款微型消色差镜头来代替梯度折射率透镜作为物镜,并使用

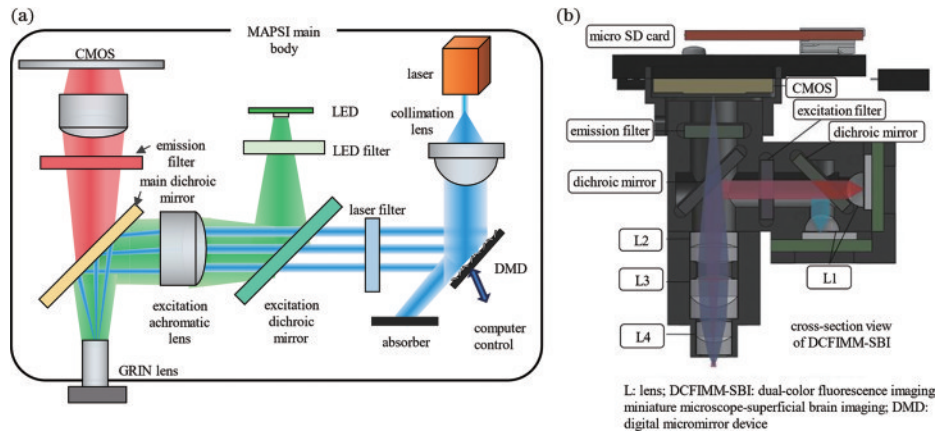


图 8 功能扩展技术方案。(a)全光学刺激和成像微型显微系统的光路设计^[69];(b)微型双色荧光成像系统设计^[71]

Fig. 8 Technical path of functionality expansion. (a) Optical design of miniscope with all-optical patterned stimulation and imaging (MAPSI)^[69]; (b) design of dual-color fluorescence imaging miniature microscope (DCFIMM)^[71]

GCaMP6s 和近红外钙离子荧光指示剂标记神经元,选用双波段滤光片组,荧光发射波段重叠区域较小,并利用算法对荧光串扰进行校正,实现了双色荧光成像。根据不同的成像深度应用,该团队设计了分别用于大脑皮层成像 (DCFIMM-SBI) 以及深层成像 (DCFIMM-DBI) 的两套系统,主要区别在于物镜设计,但双色成像的基本原理相同,以 DCFIMM-SBI 为例,图 8(b)展示了双色成像系统的光路原理。最近,由 Shekhtmeyster 等^[58]设计的高分辨率微型显微镜还可以实现双色成像,他们创新开发的定制微透镜使得单一图像传感器能以高速 (45 frame/s) 和高分辨率 (约 $1.5 \mu\text{m}$) 记录至少 3 种颜色。他们在绿色染料 (GFAP) 和红色染料 (NeuN) 分别标记的星形胶质细胞和神经元的 $20 \mu\text{m}$ 厚小鼠脊髓切片上验证了系统的双色高分辨成像能力,并成功对自由活动小鼠脊髓后角中的两类细胞实现在体成像,探究了疼痛机制下的星形胶质细胞和神经元的活动及功能。多色荧光成像技术的进步成功使得同时获取脑部不同神经细胞群体在行为下产生的信号反应得以实现,为探索神经功能和细胞之间的深层次关系提供了更有利的技术。

3.2.4 多模态系统

在体电生理也是脑科学领域研究神经元活细胞活动的重要手段之一,它能够以亚毫秒的高时间分辨率来记录神经元活动^[72],然而其空间分辨率大大受限,光学成像与电生理技术的结合就可以充分发挥各自优势,实现对大脑神经元活动的高时空分辨率记录。2021 年, Wu 等^[73]自制电极探针,其可贴附在直径为 1.8 mm 的微型显微镜物镜 (GRIN lens H18-S0250-063-NC, GoFoton 公司) 上。该电极由微机电系统工艺制作,主要包含头部、颈部、翼部及尾部。头部是直径为 1.8 mm 的圆形,用防水透明胶粘在 GRIN 透镜底部表面,4 个直径为 $30 \mu\text{m}$ 的圆形电极分布在成像区域的周围,用于记录局部电场电位;颈部可以弯曲 90° 使翼部贴在 GRIN 透镜的侧面,剩余电极的尾部连接到

PCB 上。电极整体尺寸微小,可紧密地集成在系统中,不会对体积、重量和植入带来影响,此改良系统实现了对自由活动小鼠的海马 CA1 脑区钙信号和局部场电位信号的同时记录。

de Groot 等^[74]于 2020 年发表的工作中介绍了 NINscope,该系统能够同时实现多脑区探究及光遗传调控,整体设计尺寸小,质量仅为 1.6 g ,因此他们将两台设备同时佩戴在小鼠大脑皮层和小脑上,记录两个区域的神经元活动,并分析小鼠运动与两个区域的细胞活动的相关程度,同时系统配合外置的 LED 探针光源,可以对小脑部位进行光遗传刺激,并观察响应皮层活动神经元的数量变化。Xue 等^[75]在近期开发了 TINscope,实现了同步多脑区成像,通过优化电路和光机械设计,整体质量仅 0.43 g ,可同时为小鼠佩戴 4 台设备,实现 4 个脑区神经元活动的同步记录,对 4 个海马亚区记录上千个神经元,并揭示了跨区域神经元并行活动模式。该系统灵活度高,可以集成光遗传学、电刺激和局部场电位记录等技术,实现多模块功能和多模态实验设计,为单细胞尺度解析多脑区神经元活动提供支持。

综上所述,神经科学领域的研究目标和应用需求促使微型显微镜的诞生,GRIN 透镜、CMOS、EWTL 等光学元件的发展以及荧光探针的使用和更新换代推动了微型化光学显微镜的优化改进和功能扩展。单光子微型成像和功能增强系统具有极大的应用前景和价值,在将来定能够成为研究活体动物自由移动下的神经活动机制以及探究精神疾病机制的关键工具。

4 多光子微型化显微系统的改进提升

4.1 激发光源模块

单模光纤由于材料色散和非线性效应会使飞秒激光脉冲展宽,输出的激发光质量会受到影响,为减少光源损失,研究者逐渐采用空心光子晶体光纤 (PCF) 将激发光传导至系统,脉冲几乎完全在空气中传播,非线性效应很小。另外空心光纤的传输特性不随光纤移动和

色散补偿而改变,因此它能够以高质量实现高能量飞秒脉冲的传输^[76]。例如 2008 年,Engelbrecht 等^[77]开发的超小型的光纤双光子显微镜就采用型号为 HC-800-01/-02 (Crystal Fibre A/S, Denmark) 的空心光子晶体光纤,超快钛宝石激光器发出的激光经过扩束和准直后传导至 PCF,最终传输率达 30%~40%,样品处的最大平均激光功率约为 300 mW。北京大学程和平院士团队的 Zong 等^[78]在 2017 年开发的第一代快速高分辨率微型化双光子系统 FHIRM-TPM 中,采用自制的空心光子晶体光纤 (HC-920),其能够传输几百毫瓦的 920 nm 飞秒激光脉冲,非线性展宽极小,散射系数仅约 $75 \text{ ps} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}$,能够高效激发 GFP 和 GCaMP-6f 信号。

除了使用低色散的传导光纤,Ozbay 等^[43]想到提前补偿的方式,保持输出超短脉冲的宽度,他们研发的双光子光纤耦合显微镜 2P-FCM 利用保偏光纤和基于光栅对的展宽器对脉冲进行光谱展宽和预啁啾,再使用柔性相干光纤束 (CFB) 传导激光,能够在 CFB 输出端恢复 ~100 fs 的脉冲宽度。另外值得一提的是,这套双光子微型系统在主体成像光路中加入 EWTL 变焦模块,在 450 μm 的穿透深度基础上能够实现 180 μm 的动态轴向变焦。Li 等^[79]则利用自制的光栅棱镜模块 (GRISM) 同时对材料群速度色散和三阶色散进行补偿,优化 920 nm 激发光的质量,约 50% 的吞吐量使成像信号值提升至先前系统^[80]的 2 倍。

4.2 激光扫描模块

激光扫描模块往往会增加多光子系统的复杂性,常用的扫描装置可以分为近端和远端,近端扫描器位于光纤上游的照明光路中,与光纤束配合使用,而远端扫描器则位于光源远端的光纤侧,常用的扫描装置有一维和二维扫描仪、反射镜、柱透镜等^[12]。早期使用微型压电驱动模块控制光纤末端进行扫描,解决了微型化系统的集成问题,但扫描过慢,限制了成像速度。近些年,传感器件得到快速发展,微电机系统 (MEMS) 扫描器被广泛使用^[78, 81-82],它的尺寸很小,且扫描速度和精度很高,能够提供快速、精准的自由线扫描。例如 FHIRM-TPM 采用的定制二维 MEMS 扫描镜的直径仅有 0.8 mm,包装起来后尺寸为 9 mm \times 9 mm,其第一谐振频率约 6 kHz,最大光学扫描范围为 $\pm 10^\circ$,扫描速度不会限制成像速度,最终该系统在 256 \times 256 画幅下成像帧率达 40 Hz,对应最大视场为 130 μm \times 130 μm ^[78]。着重成像速率性能的 MINI2P-F 采用一种低 Q 值的 MEMS 扫描器,优化了扫描频率和角度,410 μm \times 410 μm 的视场下能够实现 40 Hz 的成像帧率^[82]。

Engelbrecht 等^[77]开发的系统也证实了在微型内窥镜系统中的微型光纤扫描仪也是可行的,他们应用的是一款超薄的螺旋形光纤扫描仪,共振频率达到 5 kHz,在 x 、 y 方向上施加驱动信号后,可以使光纤产生循环螺旋运动,达到扫描的目的。另外一种解决方法是将扫描模块分离在系统外端,由振镜来实现激光

扫描,同时使用相干光纤束将扫描激光导入系统,但这种方法在一定程度上会损失空间分辨率和灵敏度^[43]。

4.3 信号收集模块

为减小头戴部分的体积、质量和复杂度,现多光子微型显微系统通常将灵敏探测器置于系统主体之外,利用光纤或光纤束对荧光信号进行收集和传导。与激发光不同,对用于荧光信号收集的光纤和光纤束的要求不会太高。Sawinski 等^[83]开发的多光子头戴式光纤显微镜 (fiberscope) 采用大芯径、高数值孔径的多模光纤收集发射荧光。Zong 等^[78, 81]先后开发的 FHIRM-TPM 和 FHIRM-TPM 2.0 则采用一种自制的柔软光纤束 (SFB)。与多模光纤相比,SFB 具有更高的收集效率,且比塑料光纤或融合型光纤束更加灵活,对发射波长的探测范围也更广。SFB 收集的发射荧光经过聚焦透镜、滤波器、聚光器等投射到砷化镓磷光电倍增管 (GaAsP PMT) 上形成图像。在 SFB 和聚焦透镜之间,他们加入了轴承和电动旋转关节,这样的设计可以防止小鼠在自由运动时线缆缠绕,提高了系统在小鼠进行剧烈活动时的成像稳定性。2022 年他们的另一篇工作^[82]提出了熔融拉锥光纤束 (TFB),在维持收集效率的前提下将直径缩减至 0.7 mm,减少了光纤线缆对小鼠运动的限制。

4.4 其他性能和功能

与单光子微型显微系统相比,多光子系统具有分辨率高、穿透深度深等成像优势,成像深度通常可以达到 ~250 μm ^[26],横向和纵向分辨率分别能达 1 μm 和 10 μm 以下^[77-78],但成像速度和视场会受扫描机制的限制,帧率一般不会超过 40 frame/s,而视野不大于 200 μm 。

为进一步扩大成像视野,FHIRM-TPM 2.0 配合了兼容性扫描镜,视场可以达 420 μm \times 420 μm ,同时这套系统也加入了 ETL,与一对中继透镜和微电机扫描器件构成 4f 系统,可以实现轴向 180 μm 范围的成像^[81]。2022 年程和平院士团队^[82]进一步优化视场,开发了 MINI2P,其中版本 MINI2P-L 使用一个焦距更长的扫描镜,能够实现更大的成像视场 (500 μm \times 500 μm),MINI2P 系列还采用 μTlens 轴向扫描模块,轴向范围提升至 240 μm 。该团队从系统 MEMS 扫描仪、扫描透镜以及有限物镜的几何光学关系出发,推导出决定成像视场大小的因素,通过减小横向放大倍率来实现最终成像面的扩大,大视野扫描镜头和低倍物镜组合实现了 1.2 mm 大小的 FOV,单镜头和双胶合镜片的组合校正了视野内像差,在 1 mm 视场内没有出现激光能量渐晕现象。这个质量为 2.5 g 的微型化双光子显微镜 (m2PM) 能够实现 1000 μm \times 788 μm 的毫米级成像视野,可以与单光子微型显微镜相媲美,同时能够对神经元、树突以及树突棘进行精细记录。根据理论计算,减小物镜的横向放大率可以提升轴向扫描范围,该团队利用中继透镜

将质量为 1.2 g 的 ETL 与 MEMS 相结合,改变 ETL 光焦度能够实现轴向焦平面 500 μm 的移动,最终集成 3.7 g 的 m2PM 可采集大脑皮层 $1000 \times 788 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ 的神经元体积成像^[84]。

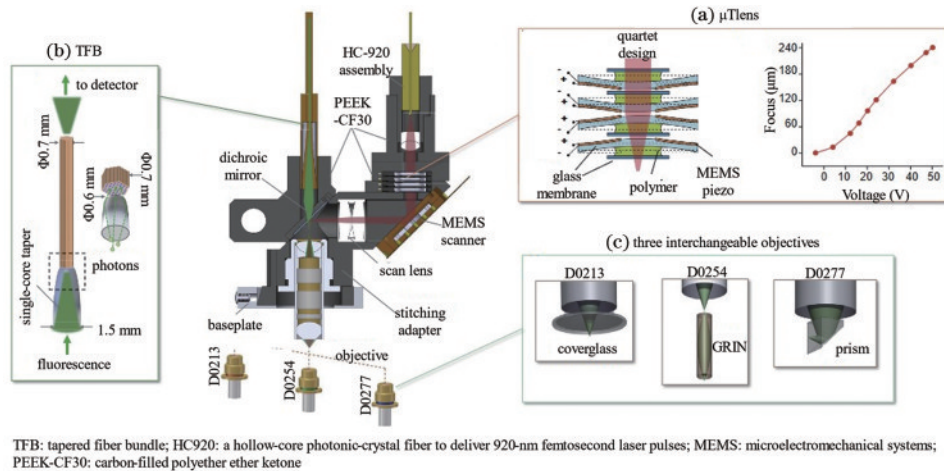
Ozbay 等^[43]设计的双光子微型显微镜还具有双色成像功能,单一波长下能够激发不同的荧光团并分离发射光谱,例如常用的 GFP 和 tdTomato,二者的有效激发波长在 900 nm 左右,发射波长可以区分为绿色和红色,实现双色成像。与大型双光子系统相比,该显微镜能够为研究者探索某些标记物共定位和丰富的生理特征提供灵活的工具。

除双光子微型化显微系统外,为进一步提升成像深度,Klioutchnikov 等^[85]曾在 2020 年开发了一款可穿戴三光子微型化荧光显微镜,他们使用空心光子带隙晶体光纤引入 1320 nm 激发光,对 GCaMP6 指示剂进行三光子激发,实现对大脑皮层以下 1120 μm 区域的神经元和树突的观察,能够对第 5 层神经元活动进行 >1 h 的稳定成像。北京大学程和平院士团队的 Zhao 等^[86]在 2023 年也报道了关于三光子微型化系统的工作,质量为 2.17 g 的三光子显微镜(m3PM)进一步突破极限,通过全新的光学结构设计,光路可以穿透

整个小鼠大脑皮层和胼胝体,实现对小鼠海马 CA1 亚区的直接观测,神经元钙信号最大成像深度可达 1.2 mm,血管成像深度可达 1.4 mm。

多光子头戴式显微系统需要光纤及扫描仪驱动,因此无法避免线缆,较粗的系绳会影响动物的运动,限制自由旋转和行走的范围和灵活度。Li 等^[79]在 2021 年开发了第一个可自由旋转的双光子光纤系统,在系统主体和线缆之间加入光电换向器(OEC)。它具有优异的光耦合稳定性(旋转过程中波动 $< \pm 1\%$)和极高的力矩灵敏度 ($< 8 \text{ mN} \cdot \text{m}$),主动旋转跟踪和补偿能力使该双光子荧光(TPF)光纤成像系统能够灵活跟随小鼠并实现神经活动增强型记录。

与单光子微型显微镜不同,多光子微型化成像系统对上述 3 个方面的改进会影响系统的整体结构设计,除光源和信号探测模块通常置于头戴部分以外,扫描器件根据体积和性能可考虑集成,因此多光子微型化成像系统具有多样性。以 MINI2P 为例,展示目前较为成熟的系统结构,图 9 完整表示了头戴部分的主要设计^[82],包括激发模块所用光纤、MEMS 扫描装置、变焦模块原理及高效率收集光纤束,它们在多光子微型化系统结构中具有典型性和先进性。



TFB: tapered fiber bundle; HC920: a hollow-core photonic-crystal fiber to deliver 920-nm femtosecond laser pulses; MEMS: microelectromechanical systems; PEEK-CF30: carbon-filled polyether ether ketone

图 9 双光子微型化显微系统的关键组件及设计^[82]。(a)由 4 片叠层压点薄膜透镜组成的轴向变焦模块;(b)用于信号收集的锥形光纤束结构;(c)针对三种不同成像应用的定制物镜

Fig. 9 Schematic of MINI2P with key components^[82]. (a) Quartet design of μTlens consisting of four stacked piezo-membrane lenses; (b) structure of tapered fiber bundle (TFB) for signal collection; (c) customized objectives for three different imaging applications

近些年多光子微型显微系统在激发光源、激光扫描及信号收集模块优化提升后不断突破成像精度、深度及灵敏度,同时配合轴向扫描技术,可实现大范围视野的体成像,精巧的机械结构设计能够优化头戴部分的灵活度,不断提升多光子微型化系统的综合性能和使用功能。

5 深部脑区成像技术

神经科学领域中对深部脑区的研究需求也愈发广泛,这些重要的深部脑区,包括纹状体、丘脑、杏仁核、

下丘脑和脑干,共同调节运动控制、学习、感觉信息传递、情感处理、内分泌调节、自主神经系统和基本生命功能^[24, 87-88],如下丘脑的深度可以达到 5.6 mm,延髓则位于 4.6 mm 左右。传统宽场荧光显微镜和双光子荧光显微镜的穿透深度基本约为 50~100 μm 和 500~700 μm ,微型化三光子系统目前最大穿透深度也不超过 2 mm,支持海马 CA1 脑区的成像^[63, 89],使用场景也受限。因此,为探究自由活动下深部核团的响应及相互联系,需要配合特殊工具和技术,目前大多数研究采用中继透镜(常用 GRIN 透镜)进行深部皮层或脑区的

观测。

GRIN 透镜应用场景非常广泛,也促进了微创内窥探头的发展,它具有特殊的折射率分布,除类似普通镜片能进行成像外,还具有光学图像传递功能。根据材料特性进行加工和切割,可得到多种长度和直径的 GRIN 透镜,如图 10 所示,低数值孔径和高数值孔径的 GRIN 透镜还可以相互连接^[32],组合成不同放大率及几何尺寸的探头^[90-93],形状类似细玻璃针,可以植入动物大脑目标成像区域上方提供“中继窗口”。其将底部接收的图像信号传递至另一端,通常位于颅骨表面上

方区域,进一步配合活体成像系统,以单细胞分辨率实现对深脑区域的实时、原位成像和记录^[94]。此外,值得一提的是,一种梯度折射率透镜前端连接有“棱镜探针”的特殊结构,它由一个固定在圆柱形梯度折射率透镜底部的棱镜组成,如图 10(c)所示,由于棱镜切面上镀有反射膜,因此可以利用这种透镜来实现侧向视场成像^[95-96]。植入式 GRIN 透镜直径通常不超过 1 mm,对动物脑部伤害较小,可以根据研究目标区域和实验要求,权衡成像视场和手术难易程度,选择特定尺寸的透镜,目前此项技术及手术操作已经较为成熟^[29-30]。

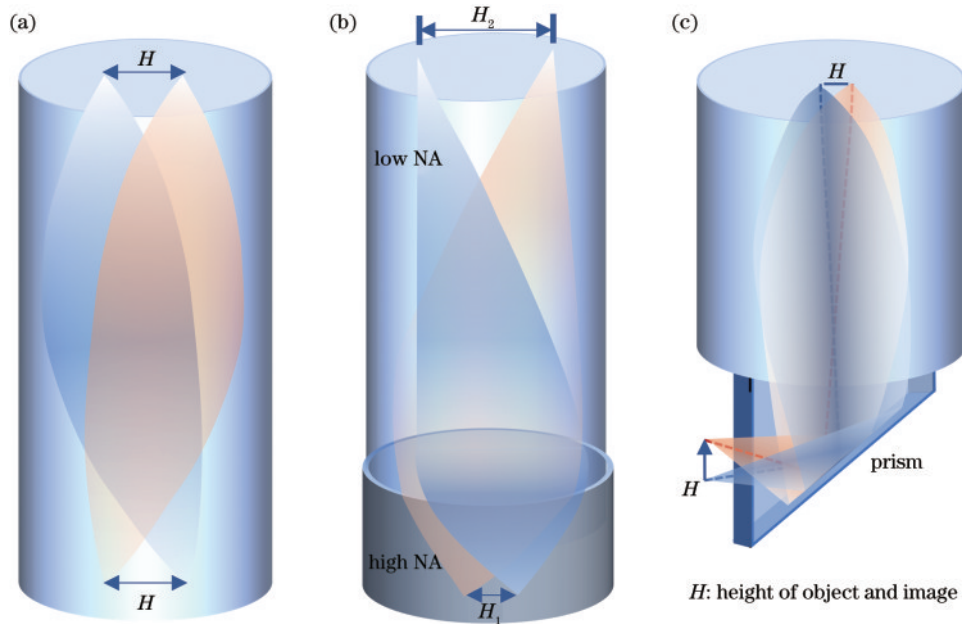


图 10 植入式渐变折射率透镜成像原理。(a) 中继透镜图像传导,物像大小一致;(b) 低数值孔径及高数值孔径配合形成中继透镜,物像具有缩放关系;(c) 带棱镜式中继透镜

Fig. 10 Imaging principle of implantable GRIN lens. (a) Basic relay lens, maintaining consistent object and image sizes; (b) combined low NA and high NA relay lenses, establishing a scaling relationship between object and image; (c) relay lens with prism

微型化显微镜同样可以搭配植入式梯度折射率透镜进行成像,研究者已经观察到了小鼠背侧纹状体的神经元活动^[30]、前边缘皮质^[97]及更深的脑区,如杏仁核^[98]、下丘脑^[99]、中脑^[100-101]、延髓^[102],实现了在动物自由活动下探究深层脑区活动。2015年 Jennings 等^[99]聚焦于解析外侧下丘脑伽马氨基丁酸(GABA)能神经元在食欲和消化行为中的编码方式,他们利用植入 GRIN 透镜技术实现对自由行为小鼠的深部脑区钙的成像,记录了数百个细胞的动力学,发现外侧下丘脑 GABA 能神经元不同亚群显示出独立的食欲和消化编码网络,这一结果为深刻理解神经元在复杂行为调控中的时空动态提供了关键见解。

6 总结与展望

实时追踪活体神经细胞的活动对理解神经网络机制、大脑功能等至关重要,尤其对于依赖自由活动模式动物的神经科学研究,轻量化、高性能、多功能、低成本

的集成化荧光显微镜的开发具有重要意义。随着微型光学和电子元件的不断发展,LED、ETL、MEMS、DMD、GRIN 透镜性能的优化提升,单光子、多光子机制荧光显微系统也不断在成像参数、系统性能、应用功能上进行突破,以适应神经科学领域更高要求、更广范围的应用场景。纵观微型化显微成像系统的发展历程,以下几个方面具有潜在的研究方向,可能会在未来取得重大突破。

成像分辨率和灵敏度的提升是单光子微型显微系统未来发展的关键方向之一。胶质细胞相较神经元有特殊的结构和分布特点,尽管已有许多胶质细胞活动的研究工作,但星胶细胞钙活动变化较为缓慢,导致图像信噪比较低^[55, 103-104]。神经递质和神经调制介导的细胞间信息传递至关重要,乙酰胆碱、多巴胺、血清素等均有参与到感知、学习、情绪、社交等多方面行为,神经传递的失调将会导致多种神经疾病的发生。配合神经递质指示剂^[105],荧光显微镜可以实现神经递质释放

的可视化,而纳米级分辨率提升的微型化系统可直接观察神经元的互作,进一步解析在体神经调制传递的突触特性^[106],为揭示神经化学物质调节神经环路的机制提供巨大推力^[107-110]。

微型显微成像系统与光遗传的结合一定程度上实现了闭环研究,但以单细胞精度调制来实现细胞特异性刺激仍然存在难点,主要在于控制光刺激的空间位置和范围,要求综合考虑激发光源、空间调制器的选型、光路设计及系统集成多方面,实现在体自由活动下神经元图案化刺激及响应活动记录。多通道功能系统在离体样本中的应用较为广泛,受成像色差和数据采集的限制,活体应用方案还不成熟,如果未来在荧光探针、色差校正及激发采集方案上有进一步的突破,将会为微型化系统的应用打开更广阔的空间,解决目标细胞或分子定位、定量、互作、突出重塑等一系列问题^[55, 71]。

多光子微型化系统在成像分辨率和穿透深度方面独具优势,给探究自由行为活动下深部脑区神经元精细结构和功能变化提供了有力技术。随着研究者的不断探索,多光子微型系统也逐步在性能、功能方面向单光子系统靠拢,不断突破成像范围和速度,但其系统结构普遍复杂,构建比较困难,使用的飞秒激光器庞大且昂贵,除头戴部分外,通常配有外置结构,因此成本控制和集成成为重中之重。另外与光遗传技术有望深度融合,实现精准光遗传刺激和成像,拓展模式动物的行为学研究范围。随着高质量数据传输方案的优化,可以预见,无线快速传输多光子系统将被开发并得到广泛应用。

近年来计算成像研究热度不断升高,这种新兴的成像方式对传统光学衍射极限的突破、探测器工艺的改善、功耗成本的限制具有巨大潜力^[111],解决传统光学设计各种性能、功能的相互制约。对于单光子系统,有望在维持大视野、高速率的模式下实现超高分辨率成像,在多光子系统中可以采用时空复用和点扩散函数工程等策略提高成像速度和吞吐量^[16, 112]。不仅如此,随着信号提取、深度学习等方法不断优化,大规模数据的分析及处理将会更加高效,有望在实验过程中结合自动数据分析,大幅提高实验效率。

微型化显微成像系统的开发和优化集合光学、机械、电学、神经生物以及计算机等多学科,伴随国家脑计划的最新部署和前沿突破,未来将会有更多的学科领域参与其中,并不断推进相关技术的优化和应用。相关产业力量的注入给我国在核心技术上的研究和转化提供强大支持,全面推动技术落地,为神经科学领域提供高性能、高性价比的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Feigin V L, Vos T, Nichols E, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy [J]. *The Lancet. Neurology*, 2020, 19(3): 255-265.
- [2] Luo L Q. Architectures of neuronal circuits[J]. *Science*, 2021, 373(6559): eabg7285.
- [3] Poo M M, Du J L, Ip N Y, et al. China brain project: basic neuroscience, brain diseases, and brain-inspired computing[J]. *Neuron*, 2016, 92(3): 591-596.
- [4] Lin M Z, Schnitzer M J. Genetically encoded indicators of neuronal activity[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(9): 1142-1153.
- [5] Siciliano C A, Tye K M. Leveraging calcium imaging to illuminate circuit dysfunction in addiction[J]. *Alcohol*, 2019, 74: 47-63.
- [6] Chen W, Natan R G, Yang Y H, et al. *In vivo* volumetric imaging of calcium and glutamate activity at synapses with high spatiotemporal resolution[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 6630.
- [7] Ghosh K K, Burns L D, Cocker E D, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 871-878.
- [8] Dombeck D A, Harvey C D, Tian L, et al. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(11): 1433-1440.
- [9] Aronov D, Tank D W. Engagement of neural circuits underlying 2D spatial navigation in a rodent virtual reality system[J]. *Neuron*, 2014, 84(2): 442-456.
- [10] Thurley K, Ayaz A. Virtual reality systems for rodents [J]. *Current Zoology*, 2017, 63(1): 109-119.
- [11] Sych Y, Chernysheva M, Sumanovski L T, et al. High-density multi-fiber photometry for studying large-scale brain circuit dynamics[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 553-560.
- [12] Flusberg B A, Cocker E D, Piyawattanametha W, et al. Fiber-optic fluorescence imaging[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 941-950.
- [13] Doronina-Amitonova L V, Fedotov I V, Ivashkina O I, et al. Implantable fiber-optic interface for parallel multisite long-term optical dynamic brain interrogation in freely moving mice[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3265.
- [14] Adelsberger H, Grienberger C, Stroth A, et al. *In vivo* calcium recordings and channelrhodopsin-2 activation through an optical fiber[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014, 2014(10): pdb.prot084145.
- [15] Aharoni D, Hoogland T M. Circuit investigations with open-source miniaturized microscopes: past, present and future[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 141.
- [16] Chen K P, Tian Z S, Kong L J. Advances of optical miniscopes for in vivo imaging of neural activity in freely moving animals[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2022, 16: 994079.
- [17] Jacques S L. Optical properties of biological tissues: a review[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2013, 58(11): R37-R61.
- [18] Guo C L, Wang A M, Cheng H P, et al. New imaging instrument in animal models: two-photon miniature microscope and large field of view miniature microscope for freely behaving animals[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2023, 164(3): 270-283.
- [19] Flusberg B A, Nimmerjahn A, Cocker E D, et al. High-

- speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(11): 935-938.
- [20] Barbera G, Liang B, Zhang L F, et al. Spatially compact neural clusters in the dorsal striatum encode locomotion relevant information[J]. *Neuron*, 2016, 92(1): 202-213.
- [21] Shen J, Yao P T, Ge S Y, et al. Dentate Granule cells encode auditory decisions after reinforcement learning in rats[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 14360.
- [22] He L J, Caudill M S, Jing J Z, et al. A weakened recurrent circuit in the hippocampus of Rett syndrome mice disrupts long-term memory representations[J]. *Neuron*, 2022, 110(10): 1689-1699.
- [23] Rizzi G, Li Z L, Hogrefe N, et al. Lateral ventral tegmental area GABAergic and glutamatergic modulation of conditioned learning[J]. *Cell Reports*, 2021, 34(11): 108867.
- [24] Liang B, Zhang L F, Barbera G, et al. Distinct and dynamic ON and OFF neural ensembles in the prefrontal cortex code social exploration[J]. *Neuron*, 2018, 100(3): 700-714.
- [25] Kingsbury L, Huang S, Raam T, et al. Cortical representations of conspecific sex shape social behavior [J]. *Neuron*, 2020, 107(5): 941-953.
- [26] Helmchen F, Fee M, Tank D, et al. A miniature head-mounted two-photon microscope high-resolution brain imaging in freely moving animals[J]. *Neuron*, 2001, 31: 903-912.
- [27] Cai D J, Aharoni D, Shuman T, et al. A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time[J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 115-118.
- [28] Liberti W A, Perkins L N, Leman D P, et al. An open source, wireless capable miniature microscope system[J]. *Journal of Neural Engineering*, 2017, 14(4): 045001.
- [29] Jacob A D, Ramsaran A I, Mocle A J, et al. A compact head-mounted endoscope for *in vivo* calcium imaging in freely behaving mice[J]. *Current Protocols in Neuroscience*, 2018, 84(1): e51.
- [30] Zhang L F, Liang B, Barbera G, et al. Miniscope GRIN lens system for calcium imaging of neuronal activity from deep brain structures in behaving animals[J]. *Current Protocols in Neuroscience*, 2019, 86(1): e56.
- [31] Piyawattanametha W, Cocker E D, Burns L D, et al. *In vivo* brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(15): 2309-2311.
- [32] Barretto R P J, Schnitzer M J. *In vivo* optical microendoscopy for imaging cells lying deep within live tissue[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 2012(10): pdb.top071464.
- [33] Scherrer J R, Lynch G F, Zhang J J, et al. An optical design enabling lightweight and large field-of-view head-mounted microscopes[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(4): 546-549.
- [34] Ren H W, Fan Y H, Gauza S, et al. Tunable-focus flat liquid crystal spherical lens[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 84(23): 4789-4791.
- [35] Bagramyan A, Galstian T, Saghatelian A. Motion-free endoscopic system for brain imaging at variable focal depth using liquid crystal lenses[J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(6/7): 762-774.
- [36] Bagramyan A, Tabourin L, Rastqar A, et al. Focus-tunable microscope for imaging small neuronal processes in freely moving animals[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(7): 1300.
- [37] Bagramyan A. Lightweight 1-photon miniscope for imaging in freely behaving animals at subcellular resolution [J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2020, 32(15): 909-912.
- [38] Lohmann A W. A new class of varifocal lenses[J]. *Applied Optics*, 1970, 9(7): 1669-1671.
- [39] Grewe B F, Voigt F F, van't Hoff M, et al. Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(7): 2035-2046.
- [40] Zou Y C, Zhang W, Chau F S, et al. Miniature adjustable-focus endoscope with a solid electrically tunable lens[J]. *Optics Express*, 2015, 23(16): 20582-20592.
- [41] Kuiper S. Electrowetting-based liquid lenses for endoscopy[J]. *Proceedings of SPIE*, 2011, 7930: 793008.
- [42] Ozbay B N, Losacco J T, Cormack R, et al. Miniaturized fiber-coupled confocal fluorescence microscope with an electrowetting variable focus lens using no moving parts[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(11): 2553-2556.
- [43] Ozbay B N, Futia G L, Ma M, et al. Three dimensional two-photon brain imaging in freely moving mice using a miniature fiber coupled microscope with active axial-scanning[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8108.
- [44] Hayashi Y, Kobayakawa K, Kobayakawa R. Large-scale calcium imaging with a head-mounted axial scanning 3D fluorescence microscope[EB/OL]. [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1101/2021.01.20.427512>.
- [45] Skocek O, Nöbauer T, Weilguny L, et al. High-speed volumetric imaging of neuronal activity in freely moving rodents[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 429-432.
- [46] Chen Y Q, Xiong B, Xue Y J, et al. Design of a high-resolution light field miniscope for volumetric imaging in scattering tissue[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(3): 1662-1678.
- [47] Yanny K, Antipa N, Liberti W, et al. Miniscope3D: optimized single-shot miniature 3D fluorescence microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 171.
- [48] Leman D P, Chen I A, Bolding K A, et al. Large-scale cellular-resolution imaging of neural activity in freely behaving mice[EB/OL]. [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426462>.
- [49] Guo C L, Blair G J, Sehgal M, et al. Miniscope-LFOV: a large-field-of-view, single-cell-resolution, miniature microscope for wired and wire-free imaging of neural dynamics in freely behaving animals[J]. *Science Advances*, 2023, 9(16): eadg3918.
- [50] Scott B B, Thiberge S Y, Guo C Y, et al. Imaging cortical dynamics in GCaMP transgenic rats with a head-mounted widefield macroscope[J]. *Neuron*, 2018, 100(5): 1045-1058.
- [51] Rynes M L, Surinach D A, Linn S, et al. Miniaturized

- head-mounted microscope for whole-cortex mesoscale imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(4): 417-425.
- [52] Ghanbari L, Carter R E, Rynes M L, et al. Cortex-wide neural interfacing via transparent polymer skulls[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1500.
- [53] Xue Y J, Davison I G, Boas D A, et al. Single-shot 3D wide-field fluorescence imaging with a Computational Miniature Mesoscope[J]. *Science Advances*, 2020, 6(43): eabb7508.
- [54] Xue Y J, Yang Q W, Hu G R, et al. Deep-learning-augmented computational miniature mesoscope[J]. *Optica*, 2022, 9(9): 1009-1021.
- [55] Shekhtmeyster P, Duarte D, Carey E M, et al. Trans-segmental imaging in the spinal cord of behaving mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(12): 1729-1733.
- [56] Dussaux C, Szabo V, Chastagnier Y, et al. Fast confocal fluorescence imaging in freely behaving mice[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16262.
- [57] Supekar O D, Sias A, Hansen S R, et al. Miniature structured illumination microscope for *in vivo* 3D imaging of brain structures with optical sectioning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2530-2541.
- [58] Shekhtmeyster P, Carey E M, Duarte D, et al. Multiplex translaminar imaging in the spinal cord of behaving mice[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1427.
- [59] Juneau J, Duret G, Chu J P, et al. MiniFAST: a sensitive and fast miniaturized microscope for *in vivo* neural recording[EB/OL]. [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.367466>.
- [60] Barbera G, Liang B, Zhang L F, et al. A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 323: 56-60.
- [61] Liberti W A, Schmid T A, Forli A, et al. A stable hippocampal code in freely flying bats[J]. *Nature*, 2022, 604(7904): 98-103.
- [62] Wang Y Z, Ma Z T, Li W Z, et al. Cable-free brain imaging for multiple free-moving animals with miniature wireless microscopes[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2023, 28(2): 026503.
- [63] Shuman T, Aharoni D, Cai D J, et al. Breakdown of spatial coding and interneuron synchronization in epileptic mice[J]. *Nature Neuroscience*, 2020, 23(2): 229-238.
- [64] Karl D. Optogenetics[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 26-29.
- [65] Packer A M, Russell L E, Dalgleish H W P, et al. Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution *in vivo*[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(2): 140-146.
- [66] Packer A M, Peterka D S, Hirtz J J, et al. Two-photon optogenetics of dendritic spines and neural circuits[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(12): 1202-1205.
- [67] Stamatakis A M, Schachter M J, Gulati S, et al. Simultaneous optogenetics and cellular resolution calcium imaging during active behavior using a miniaturized microscope[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2018, 12: 496.
- [68] Srinivasan S, Hosokawa T, Vergara P, et al. Miniaturized microscope with flexible light source input for neuronal imaging and manipulation in freely behaving animals[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 517(3): 520-524.
- [69] Zhang J Y, Hughes R N, Kim N, et al. A one-photon endoscope for simultaneous patterned optogenetic stimulation and calcium imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 7(4): 499-510.
- [70] Yen W W, Leman D P, Clevenger J R, et al. 1P2C: a miniscope for multiplexed single-photon imaging of two spectrally distinct fluorescent reporters in freely-behaving animals[C]//Conference Poster of Neuroscience Conference, October 23, 2019, Chicago, United States. [S.l.: s.n.], 2019.
- [71] 蓝凯秋, 杨西斌, 徐宝腾, 等. 双色荧光成像在体微型显微镜[J]. *光子学报*, 2022, 51(6): 0618001.
- Lan K Q, Yang X B, Xu B T, et al. *In vivo*, dual-color fluorescent imaging miniature microscope[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2022, 51(6): 0618001.
- [72] Fekete Z, Pongrácz A. Multifunctional soft implants to monitor and control neural activity in the central and peripheral nervous system: a review[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 243: 1214-1223.
- [73] Wu X T, Yang X Y, Song L L, et al. A modified miniscope system for simultaneous electrophysiology and calcium imaging *in vivo*[J]. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 2021, 15: 682019.
- [74] de Groot A, van den Boom B J, van Genderen R M, et al. NINscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations[J]. *eLife*, 2020, 9: 49987.
- [75] Xue F, Li F, Zhang K M, et al. Multi-region calcium imaging in freely behaving mice with ultra-compact head-mounted fluorescence microscopes[J]. *National Science Review*, 2023: nwad294.
- [76] Göbel W, Nimmerjahn A, Helmchen F. Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber [J]. *Optics Letters*, 2004, 29(11): 1285-1287.
- [77] Engelbrecht C J, Johnston R S, Seibel E J, et al. Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging *in vivo*[J]. *Optics Express*, 2008, 16(8): 5556-5564.
- [78] Zong W J, Wu R L, Li M L, et al. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 713-719.
- [79] Li A, Guan H H, Park H C, et al. Twist-free ultralight two-photon fiberscope enabling neuroimaging on freely rotating/walking mice[J]. *Optica*, 2021, 8(6): 870-879.
- [80] Liang W X, Hall G, Li X D. Spectro-temporal dispersion management of femtosecond pulses for fiber-optic two-photon endomicroscopy[J]. *Optics Express*, 2018, 26(18): 22877-22893.
- [81] Zong W J, Wu R L, Chen S Y, et al. Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(2): 46-49.
- [82] Zong W J, Obenaus H A, Skytøen E R, et al. Large-

- scale two-photon calcium imaging in freely moving mice [J]. *Cell*, 2022, 185(7): 1240-1256.
- [83] Sawinski J, Wallace D J, Greenberg D S, et al. Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(46): 19557-19562.
- [84] Zhao C Z, Zhu Y F, Zhang D, et al. Millimeter field-of-view miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely moving mice[J]. *Optics Express*, 2023, 31(20): 32925-32934.
- [85] Klioutchnikov A, Wallace D J, Frosz M H, et al. Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(5): 509-513.
- [86] Zhao C Z, Chen S Y, Zhang L F, et al. Miniature three-photon microscopy maximized for scattered fluorescence collection[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(4): 617-622.
- [87] Zhang Y, Denman A J, Liang B, et al. Detailed mapping of behavior reveals the formation of prelimbic neural ensembles across operant learning[J]. *Neuron*, 2022, 110(4): 674-685.
- [88] Kingsbury L, Huang S, Wang J, et al. Correlated neural activity and encoding of behavior across brains of socially interacting animals[J]. *Cell*, 2019, 178(2): 429-446.
- [89] Goto A, Bota A, Ken M Y, et al. Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation[J]. *Science*, 2021, 374(6569): 857-863.
- [90] Murayama M, Larkum M E. Enhanced dendritic activity in awake rats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20482-20486.
- [91] Murayama M, Larkum M E. *In vivo* dendritic calcium imaging with a fiberoptic periscope system[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(10): 1551-1559.
- [92] Osanai M, Suzuki T, Tamura A, et al. Development of a micro-imaging probe for functional brain imaging[J]. *Neuroscience Research*, 2013, 75(1): 46-52.
- [93] Miyamoto D, Murayama M. The fiber-optic imaging and manipulation of neural activity during animal behavior[J]. *Neuroscience Research*, 2016, 103: 1-9.
- [94] Barretto R P J, Messerschmidt B, Schnitzer M J. *In vivo* fluorescence imaging with high-resolution microlenses[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(7): 511-512.
- [95] Wei B W, Wang C M, Cheng Z Y, et al. Clear optically matched panoramic access channel technique (COMPACT) for large-volume deep brain imaging[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(8): 959-964.
- [96] Engelbrecht C J, Voigt F, Helmchen F. Miniaturized selective plane illumination microscopy for high-contrast *in vivo* fluorescence imaging[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(9): 1413-1415.
- [97] Pinto L, Dan Y. Cell-type-specific activity in prefrontal cortex during goal-directed behavior[J]. *Neuron*, 2015, 87(2): 437-450.
- [98] Li X J, Cao V Y, Zhang W Y, et al. Skin suturing and cortical surface viral infusion improves imaging of neuronal ensemble activity with head-mounted miniature microscopes[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2017, 291: 238-248.
- [99] Jennings J H, Ung R L, Resendez S L, et al. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors[J]. *Cell*, 2015, 160(3): 516-527.
- [100] Grove J C R, Gray L A, La Santa Medina N, et al. Dopamine subsystems that track internal states[J]. *Nature*, 2022, 608(7922): 374-380.
- [101] Lyu C F, Yu C C, Sun G L, et al. Deconstruction of vermal cerebellum in ramp locomotion in mice[J]. *Advanced Science*, 2022, 10(1): e2203665.
- [102] Teng S S, Zhen F H, Wang L, et al. Control of non-REM sleep by ventrolateral medulla glutamatergic neurons projecting to the preoptic area[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 4748.
- [103] Ingiosi A M, Hayworth C R, Harvey D O, et al. A role for astroglial calcium in mammalian sleep and sleep regulation[J]. *Current Biology*, 2020, 30(22): 4373-4383.
- [104] Peng H R, Zhang Y K, Zhou J W. The structure and function of glial networks: beyond the neuronal connections [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2023, 39(3): 531-540.
- [105] Wu Z F, Lin D Y, Li Y L. Pushing the frontiers: tools for monitoring neurotransmitters and neuromodulators[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2022, 23(5): 257-274.
- [106] Liu C L, Goel P, Kaeser P S. Spatial and temporal scales of dopamine transmission[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2021, 22(6): 345-358.
- [107] Oettl L L, Ravi N, Schneider M, et al. Oxytocin enhances social recognition by modulating cortical control of early olfactory processing[J]. *Neuron*, 2016, 90(3): 609-621.
- [108] Hörnberg H, Pérez-García E, Schreiner D, et al. Rescue of oxytocin response and social behaviour in a mouse model of autism[J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 252-256.
- [109] Yu X D, Zhu Y, Sun Q X, et al. Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety[J]. *Nature Neuroscience*, 2022, 25(12): 1651-1663.
- [110] Jeong H, Taylor A, Floeder J R, et al. Mesolimbic dopamine release conveys causal associations[J]. *Science*, 2022, 378(6626): eabq6740.
- [111] 左超, 陈钱. 计算光学成像: 何来, 何处, 何去, 何从?[J]. *红外与激光工程*, 2022, 51(2): 20220110. Zuo C, Chen Q. Computational optical imaging: an overview[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2022, 51(2): 20220110.
- [112] Jin C, Kong L J, Dana H, et al. Advances in point spread function engineering for functional imaging of neural circuits *in vivo*[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2020, 53(38): 383001.