

## 高速光流控成像研究进展(特邀)

肖廷辉<sup>1\*</sup>, 彭静<sup>1</sup>, 李柘黄<sup>2</sup>, 罗素霞<sup>2</sup>, 陈述<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>郑州大学物理学院, 河南 郑州 450001;<sup>2</sup>郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院, 河南 郑州 450003

**摘要** 高速光流控成像是融合了高速光学成像和微流控的新兴交叉技术,能够对高速复杂流体环境中的生物体进行高分辨率、高通量和多信息维度的成像和定量检测分析,在生物能源、食品科学、药物筛选、疾病诊断等领域展现出卓越的应用前景。对高速光流控成像的基本原理、关键技术和前沿进展进行综述,并对该技术未来的发展趋势和面临的挑战进行展望。

**关键词** 成像系统; 高速成像; 光流控; 微流控芯片

中图分类号 Q-334

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232322

## Research Progress of High-Speed Optofluidic Imaging (Invited)

Xiao Tinghui<sup>1\*</sup>, Peng Jing<sup>1</sup>, Li Zhehuang<sup>2</sup>, Luo Suxia<sup>2</sup>, Chen Shu<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>School of Physics and Microelectronics, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China;<sup>2</sup>Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China

**Abstract** High-speed optofluidic imaging is an emerging interdisciplinary technology that seamlessly integrates high-speed optical imaging and microfluidics, which is capable of realizing high-resolution, high-throughput, high-content imaging, and quantitative analysis of biological organisms in high-speed and complex fluid environments. High-speed optofluidic imaging has exhibited promising application potential in bioenergy, food science, drug screening, disease diagnosis, and many other fields. In this review, we introduce the basic principles, key techniques, and recent advances of high-speed optofluidic imaging. The future prospects and challenges of high-speed optofluidic imaging are also discussed.

**Key words** imaging system; high-speed imaging; optofluidics; microfluidic chip

## 1 引言

光学成像是一种捕捉和呈现物体空间信息的强大光学技术。它能够使人们直观地获得关于物体形状、结构、颜色、运动和相互关系等重要信息,分析和理解微观和宏观世界中的各种现象。例如,光学显微成像一直以来都是生物学研究和临床医学检测的重要工具,广泛应用于细胞生物学、神经科学、免疫学、药理学研究和临床病理诊断<sup>[1-5]</sup>。然而,传统光学显微镜受限于检测速度,需要耗费大量的人力进行观测并依靠经验分析,难以用具有统计学意义的方式对细胞等生物个体进行大规模、定量、多维度的分析,通常只能提供定性结果。

近年来,蓬勃发展的高速光学成像技术不仅为光

学成像技术在时间维度上的信息获取提供了前所未有的时间精度和时间分辨率,并且为实现对生物样品中大规模生物个体的空间信息的快速获取和定量分析提供了可能。高速光学成像技术所带来的高检测通量使人们得以研究生物样品内部的异质性,寻找和发现生物样品中大规模生物个体中的稀有个体,比如,池塘水样品中发生特定基因突变的眼虫藻细胞或是恶性肿瘤患者血液样品中稀少的循环肿瘤细胞等。然而,如何充分利用高速光学成像技术的高检测通量对处于液体环境中的大规模生物个体(如各种单细胞生物、血液细胞、生殖细胞等)实现逐一检测乃至分选是个问题,须借助在微观液体环境下能够对各类生物个体进行力学操控的微流控技术。

微流控技术是一种利用微米量级大小的片上流体

收稿日期: 2023-10-18; 修回日期: 2023-11-21; 录用日期: 2023-11-25; 网络首发日期: 2023-12-04

基金项目: 郑州大学引进人才科研启动项目(32340450)

通信作者: \*xiaoth@zzu.edu.cn; \*\*chenshu@zzu.edu.cn

通道实现对小体积液体流体力学操控的技术。合理的微流控芯片设计可以实现对液体生物样品中微米尺度生物个体的精准力学操控,使得各个生物个体能够快速、依次、有序地通过高速光学成像系统,完成空间信息的快速获取。微流控技术的运用一方面得以匹配高速光学成像系统的高检测通量和有限的视场大小,实现逐一检测,另一方面能够根据高速光学成像系统所获取的空间信息,反馈至生物个体的力学操控,例如对特定生物个体的分选和收集<sup>[6-8]</sup>。

以上两种技术的不断融合与发展创造了一项新兴的交叉技术,即高速光流控成像。它集成了高速光学成像和微流控技术,能够对高速流体环境中的大规模生物个体进行高通量、高信息量、定量、多维度的空间信息获取<sup>[9-15]</sup>,结合大数据图像处理和数据分析方法,可用于大规模单生物个体(如细胞、细菌等)的活性、形貌、组分、数量、浓度等分析,在生物能源、食品科学、药物筛选、疾病诊断等领域具有重要的应用价值。本文将介绍高速光流控成像的基础架构,然后分别介绍高速光流控成像中的成像技术、微流控技术、数据分析方法以及前沿应用,最后针对当前高速光流控成像技术所面临的挑战和发展前景进行展望。

## 2 高速光流控成像的基础架构

高速光流控成像系统由高速光学成像装置、微流控装置以及图像处理和数据分析装置3部分组成。其基础架构如图1所示。其中,高速光学成像装置是高速光流控成像的核心部件,主要功能是对流体中的微粒、细胞、组织等个体进行空间信息的快速获取,一般由光源、显微系统和成像器件组成。通过选择不同的高速成像原理,可以实现对不同流速中个体的明场、定量相位、荧光、非线性光学等的成像。成像系统的成像速度决定了可实现清晰成像的个体最高流速及成像检测通量。微流控装置主要通过微流控芯片的设计来实现对

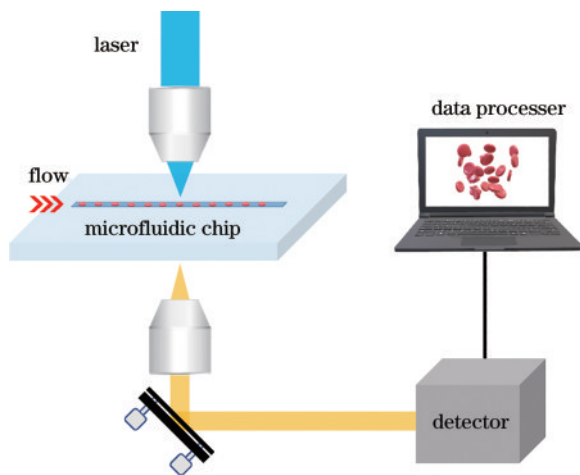


图1 高速光流控成像的基础架构示意图

Fig. 1 Schematic of high-speed optofluidic imaging

流体中的微粒、细胞等个体的操控,主要功能是控制个体通过高速成像系统的空间位置,包括成像系统视场中的位置和成像物面的位置,从而保证成像的高有效通量,避免离焦影响成像清晰度。此外,微流控装置也可根据图像处理和数据分析装置反馈的信息对流体中的特定微粒、细胞等个体进行选择性的分选或收集。微流控装置的力学操控稳定性决定了图像的质量。图像处理和数据分析装置主要对高速成像系统获取的空间信息进行数字整合、存储及大数据分析,主要包括对高信息量的图像数据进行处理,如对特定个体对象的框选、对特定图像信息的统计性分析。近年来,基于人工智能的图像处理工具已成功应用于高速光流控成像的大数据图像分析,从而使检测更加自动化和智能化<sup>[15-18]</sup>。

## 3 高速光流控成像中的成像技术

成像技术是高速光流控成像中的核心技术。不同的成像模式能够获取不同的个体信息,例如生物个体的生物物理和力学特性可以通过明场、定量相位成像方式获取,而生化特性则可以通过荧光成像、非线性光学成像等来揭示。下面将对高速光流控成像中常见的各种成像模式按照荧光成像、明场成像、定量相位成像、非线性光学成像进行分类,对具有代表性的各类成像技术及其新兴应用进行介绍。

### 3.1 荧光成像

荧光成像利用染色剂或荧光标记物实现生物样本的选择性成像,可以获得细胞或其他生物个体的数量、大小、形状以及内部结构和化学成分等信息,是一种具有高分辨率、高灵敏度和特异性的成像技术,在细胞和分子生物学研究中具有广泛的应用。已经发展成熟的荧光成像技术包括激光扫描共聚焦显微成像(LSCM)、荧光寿命显微成像(FILIM)和光片荧光显微成像(LSFM)等。

激光扫描共聚焦显微镜通过抑制焦平面以外的杂散光,能够实现对生物组织的三维层析成像,具有很高的成像分辨率和信噪比。近年来,激光扫描共聚焦显微成像与微流控系统的耦合在细胞成像中得到了广泛的应用。Pratt等<sup>[19]</sup>发明了结合激光扫描共聚焦显微镜的液滴微流控装置,用于研究单个微生物细胞的生理学特性,并能高通量地识别群体中细胞与细胞之间的生理差异。此外,Mandracchia等<sup>[20]</sup>发明了一种基于结构光的多焦点共聚焦显微镜,用于高分辨率的活细胞光流控成像,如图2(a)所示。结构光照明方式与共聚焦显微装置的结合提供了光学切片成像能力,并能够提高成像分辨率和信噪比。在照明光路中插入微透镜阵列,经物镜聚焦后在微流道内形成衍射受限的多焦点阵列网格,其与流体运动方向呈 $4^\circ$ 的倾角来保证细胞间的无缝扫描。整个样品流动用压力泵和流量传感器来控制,以达到最优采样速率,最后收集有效数据进行图像重建。该系统利用对流动样本的多焦点激

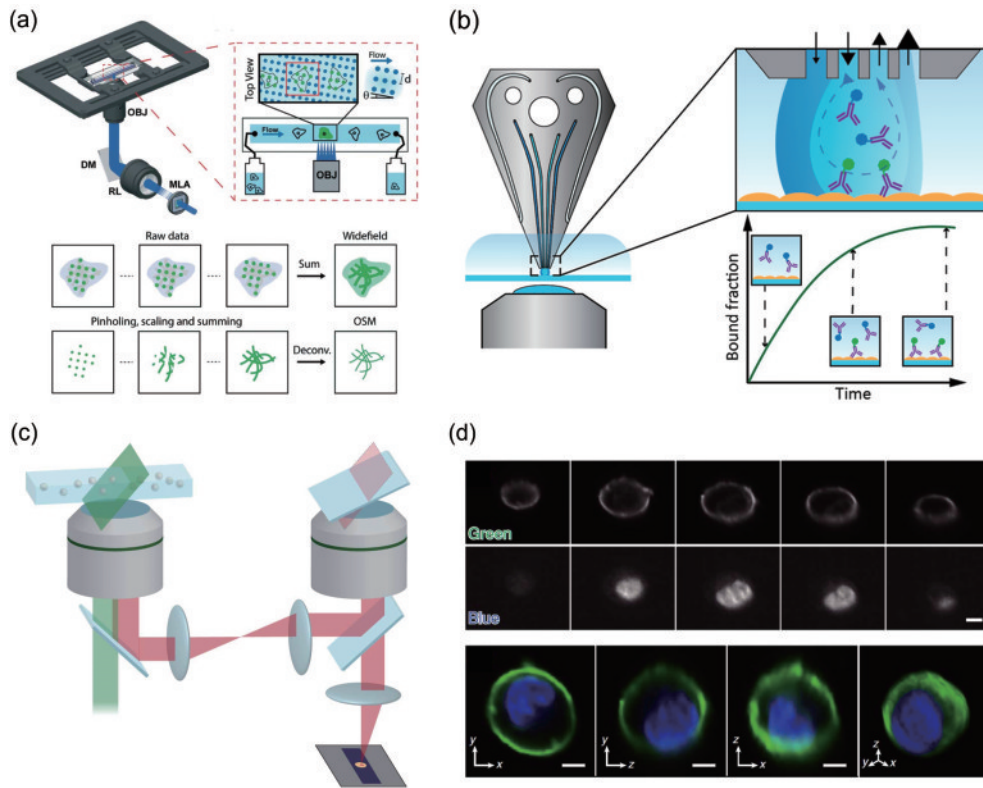


图 2 荧光成像技术。(a)一种基于结构光的多焦点共聚焦显微镜,用于高分辨率的活细胞光流控成像<sup>[20]</sup>; (b)基于荧光寿命显微的微流控成像原理<sup>[22]</sup>; (c)基于光片荧光显微的光流控成像原理<sup>[25]</sup>; (d)单个 K562 细胞经绿色和蓝色荧光染色后获得的光片显微微流控成像图片,标尺为  $5\ \mu\text{m}$ <sup>[25]</sup>

Fig. 2 Fluorescence imaging technologies. (a) A multi-focal confocal microscope based on structured light for high-resolution optofluidic imaging of living cells<sup>[20]</sup>; (b) schematic of microfluidic imaging based on fluorescence lifetime microscopy<sup>[22]</sup>; (c) schematic of optofluidic imaging based on light-sheet fluorescence microscopy<sup>[25]</sup>; (d) optofluidic images of a single K562 cell with green and blue fluorescent staining obtained by light-sheet fluorescence microscopy, scale bar is  $5\ \mu\text{m}$ <sup>[25]</sup>

发,不需要传统的机械扫描方式即可实现成像分辨率倍增和图像对比度增强,获得了 1 Hz 的超分辨图像采集率和每秒 1~10 个样品的成像通量。近年来,频分复用(FDM)技术的运用大大提升了共聚焦显微成像的速度,其基本原理是:将不同频率调制的多束激光分别聚焦在成像物面的不同位置形成多个焦点,从而同时激发多个荧光发射点。不同焦点处的荧光具有与激发光相同的调制频率,通过对光电倍增管检测到的荧光信号进行解调,并根据调制频率区分不同位置的荧光强度,从而实现多个共聚焦焦点的同时探测,倍增共聚焦荧光成像速度。基于此,Mikami 等<sup>[21]</sup>报道了一种基于频分复用技术的高速光流控共聚焦荧光显微系统,实现了 16000 frame/s 的超高成像帧率和每秒 10000 个细胞的高成像通量。

荧光寿命显微成像对荧光团本身的激发态寿命而非荧光强度或局部荧光团浓度进行成像。由于荧光团的激发态寿命依赖于其分子环境,因而荧光寿命显微成像通常可用于分析荧光团所处环境的温度、pH 值等信息。荧光寿命成像显微镜可以使用宽视场显微镜或激光扫描显微镜成像方式实现。Mathur 等<sup>[22]</sup>利用荧光寿命成像和开放空间的微流体装置对细胞和组织的

空间局域抗体结合动力学进行定量研究,如图 2(b)所示。该装置使用波长为  $(488 \pm 5)\ \text{nm}$ 、重复频率为 20 MHz 的皮秒脉冲二极管激光器(PDL-800D)作为激发光源,利用特制的微流控探针将样品限制在微流体中,并采用共聚焦扫描方式探测非结合与结合状态的抗体,最后由雪崩光电探测器测量两种状态的荧光衰减差异。此外, Lee 等<sup>[23]</sup>利用荧光寿命显微成像在微流控芯片上实现对血液中的单个白血病细胞的快速识别。首先采用微流控捕获阵列实现红细胞和白细胞分离,使用相量法和荧光寿命显微镜鉴定白血病细胞,进而观察游离和结合态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的变化,进而实现同步的过滤筛选和快速无标记成像。

光片荧光显微成像采用与成像面平行的很薄的切片光场,只对焦平面的样品激发,而焦平面以外的样品不受影响,具备与共聚焦显微镜类似的光学切片功能,并且是一种面成像方式,因此具有高轴向分辨率、高信背比、低光毒性、大视野、快速等特点。光片荧光显微成像原理如图 2(c)所示。Son 等<sup>[24]</sup>发明了一种便携式光片荧光光流控成像技术,实现了  $2\sim 4\ \mu\text{m}$  的三维亚细胞分辨率和每秒约 1000 个细胞的高检测通量。Ugawa 等<sup>[25]</sup>通过在单物镜宽场光片显微镜下对多个

细胞进行一维声聚焦,实现了快速、高通量的并行光流扫描成像,成像速度达 720 frame/s, 通量达到每秒 2000 个细胞,如图 2(d)所示。Mikami 等<sup>[26]</sup>报道了一种虚拟冻结荧光光流控成像技术,通过引入多边形扫描仪控制光片激发光束以与流体流动相反的方向进行扫描,抵消相机上流体的运动,从而增加成像曝光时间,减小成像系统中的像差,实现了无模糊图像采集,并具有 1250 frame/s 的成像速度和每秒 10000 个细胞的高通量单细胞成像能力。

### 3.2 明场成像

基于荧光的高速光流控成像方法虽然具有高灵敏度、高特异性等优点,但存在光漂白、光毒性和样品处理繁琐等缺点,限制了其应用。近年来,基于无标记的明场成像技术的高速光流控成像方法在超高速、非破坏性、无化学毒性的大规模单细胞分析及生物学应用中展现了高可行性与实用性。

光学时间拉伸(OTS)成像方法是一种广泛应用于高速光流控成像的明场成像技术,它能够以每秒大于 1 亿帧的帧率快速、连续地获取明场图像。光学时间拉伸成像的核心概念是从一维时间数据流中的“时

间拉伸”光谱中检索空间信息,整个过程包括频率到空间的编码以及频率到时间的解码两个步骤。飞秒激光脉冲作为信号源,经过色散元件(如衍射光栅或棱镜)后,其频率分量分布到整个空间坐标,从而得到频率-空间映射;而后,通过色散光纤完成色散傅里叶变换,完成频率-时间映射。最终,结合以上两个步骤,完成空间-时间映射。2009 年,Godá 等<sup>[27]</sup>报道了首个光学时间拉伸成像技术,即串行时间编码放大显微镜(STEAM),并于 2012 年将其应用于高速光流控成像<sup>[28]</sup>。如图 3(a)所示,该系统主要由脉冲激光器、空间色散器、时间色散器、光电探测器和信号处理部分组成。2017 年,Jiang 等<sup>[29]</sup>利用基于光学时间拉伸的高速光流控明场成像技术和机器学习图像识别,实现了对单个血小板、白细胞和微血栓的成功分类,检测通量达每秒 10000 个细胞,如图 3(b)所示。2022 年,Deng 等<sup>[30]</sup>利用基于光学时间拉伸的光流控明场成像并模拟血管狭窄,获得了每秒 10000 个细胞的成像通量,并阐明了血管狭窄所造成的复杂流体力学环境对微血栓形成的影响以及与不同种类和浓度的激动剂的协同作用。

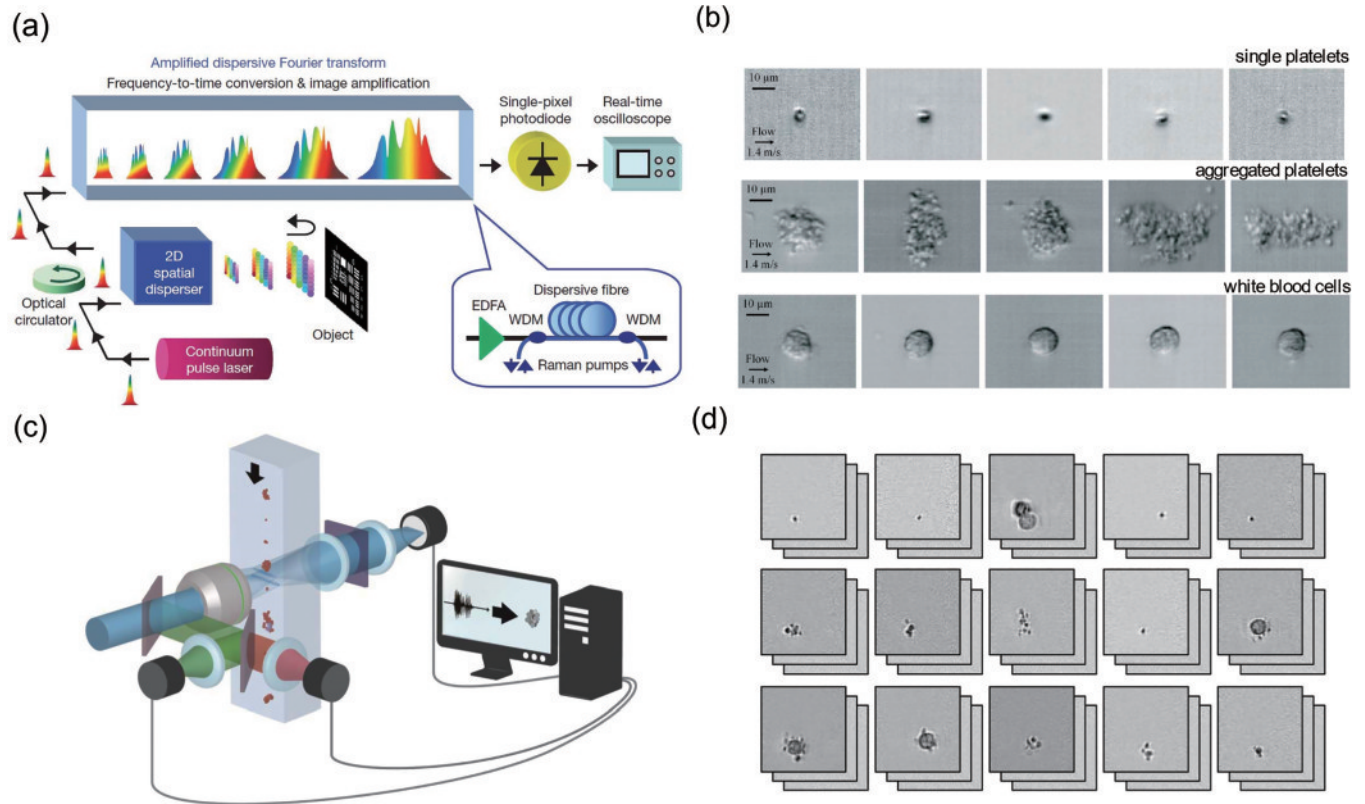


图 3 明场成像技术。(a)光学时间拉伸成像原理<sup>[27]</sup>; (b)基于光学时间拉伸的高速光流控成像所获得的单个血小板、微血栓和白细胞的明场图像<sup>[29]</sup>; (c)基于频分复用技术的高速明场成像原理<sup>[14]</sup>; (d)频分复用高速光流控成像获得的单个血小板和血小板聚集体的明场图像<sup>[14]</sup>

Fig. 3 Bright-field imaging technologies. (a) Schematic of optical time-stretch (OTS) imaging<sup>[27]</sup>; (b) bright-field images of single platelets, aggregated platelets, and white blood cells obtained by high-speed optofluidic OTS imaging<sup>[29]</sup>; (c) schematic of high-speed bright-field imaging based on frequency-division multiplexing (FDM)<sup>[14]</sup>; (d) bright-field images of single platelets and platelet aggregates obtained by high-speed optofluidic FDM imaging<sup>[14]</sup>

最近, Nishikawa 等<sup>[14]</sup>在微流控芯片上采用基于频分复用技术的高速明场显微成像, 对新冠患者血液样本中的大量单个血小板和血小板聚集体进行高通量、明场成像, 成像通量高达每秒 100~300 个事件, 如图 3(c) 和图 3(d) 所示。此方法能够精确分辨单个血小板、血小板-血小板聚集体、血小板-白细胞聚集体和其他成分(红细胞、白细胞和细胞碎片), 比传统的流式细胞术具有更高分辨率和计数精度。通过研究新冠病人血液中的微血栓浓度的时间演化与重症度的关联, 发现了近 90% 的新冠病人血液中存在微血栓异常增多。随后, 该团队<sup>[31]</sup>进一步研究了健康人在接种新冠疫苗前后血液中微血栓浓度的变化, 发现 mRNA 新冠疫苗的接种不会对血小板周转、血小板激活、血小板聚集和血小板-白细胞相互作用产生显著影响。

### 3.3 定量相位成像

定量相位成像(QPI)技术是一种针对弱散射和弱吸收样品的成像技术。通常, 诸如活细胞等光学薄样品几乎是透明的, 也称为相位物体, 成像对比度很低, 难以进行明场成像。定量相位成像技术通过将透

明样品的厚度和折射率信息加载在散射光中, 并利用全息技术获得样品的相位信息, 从而实现对细胞和组织的重要生物物理特性(如干质量密度、蛋白质分布等)的无创、无标记和定量化成像检测<sup>[32-33]</sup>。对于高速流体中的生物个体的测量, 以往的定量相位成像技术在同时获得亚细胞成像分辨率和高成像通量方面面临挑战, 通常以牺牲成像通量为代价来实现高分辨率, 限制了其在高速光流控成像中的应用。为了解决这一问题, Lee 等<sup>[34]</sup>提出了基于光学时间拉伸的定量相位成像技术, 并以超高通量(大于每秒 10000 个细胞)实时捕获亚细胞分辨率单细胞图像, 比经典定量相位成像大 2 个数量级。最近, Deng 等<sup>[35]</sup>利用基于光学时间拉伸的定量相位成像技术, 在体外 3D 狭窄微流控芯片中模拟血管狭窄的动脉粥样硬化流动环境, 对血小板的生物物理特性进行准确统计和高分辨率成像研究, 进而评估狭窄环境下抗血小板药物的疗效。图 4 显示了基于光学时间拉伸的定量相位成像技术原理以及单个血小板和血小板聚集体的典型相位图像。

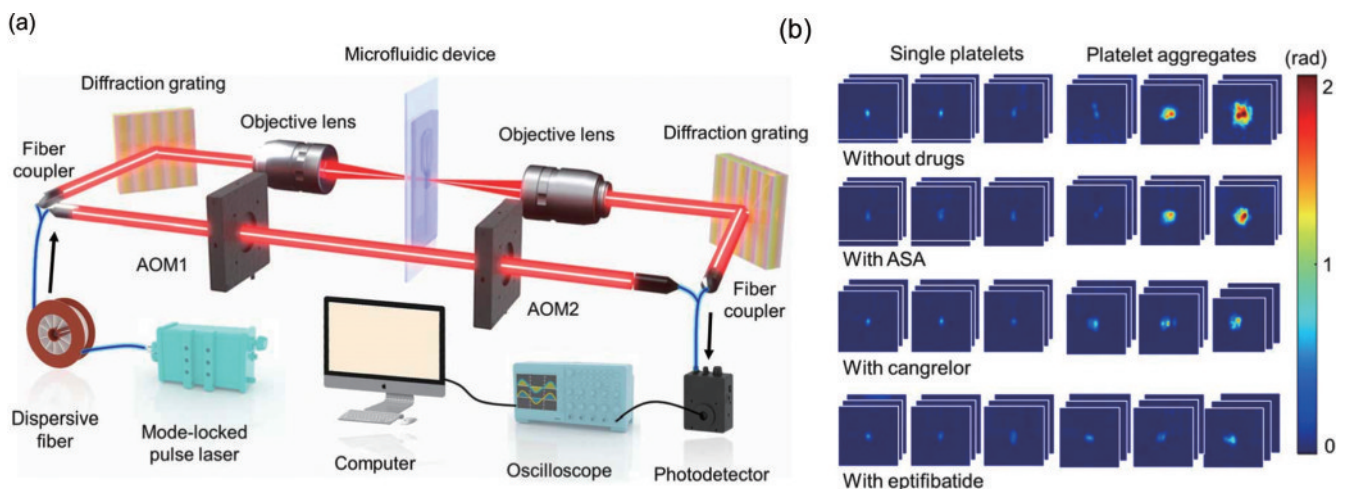


图 4 定量相位成像技术。(a) 基于光学时间拉伸的定量相位成像原理<sup>[35]</sup>; (b) 单个血小板和血小板聚集体的典型相位图像<sup>[35]</sup>  
Fig. 4 Quantitative phase imaging (QPI) technology. (a) Schematic of QPI based on OTS<sup>[35]</sup>. (b) typical phase images of single platelets and platelet aggregates<sup>[35]</sup>

### 3.4 非线性光学成像

非线性光学成像是利用光与物质相互作用的非线性光学效应进行成像的技术, 主要包括相干拉曼散射、二次谐波、三次谐波成像等。得益于非线性光学效应本身的特性, 非线性光学成像与其他无标记成像方法(如明场成像和定量相位成像)相比具有优秀的化学选择性和高空间分辨率。

相干拉曼散射成像是一种对研究个体的局域分子振动进行成像的技术。它通过非线性拉曼散射过程增强拉曼散射信号强度, 进而大大提高成像灵敏度和成像速率, 因而适用于高速光流控成像。相干拉曼散射成像能够实现亚微米级的化学特异性和无标记成像。根据不同的非线性光学过程, 相干拉曼散射可分为相

干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)。相干反斯托克斯拉曼散射显微成像一般采用两束不同频率的脉冲激光为光源, 通过调谐其中一束激光的频率以获得需要的拉曼频移。两束激光在样品处实现空间和时间上的重合, 在满足相位匹配的条件下激发相干反斯托克斯拉曼散射过程, 并分别产生向前和向后的反斯托克斯散射光信号, 进而对细胞或生物组织进行无标记、高分辨率、高速和高灵敏度的化学选择性成像, 并在临床上用于对脂质、蛋白质和肿瘤的研究。

受激拉曼散射成像与相干反斯托克斯拉曼散射成像相比具有无非共振背景干扰的优点, 所得拉曼光谱畸变小, 因而在光流控成像中的应用备受关注。

2019年, Suzuki等<sup>[36]</sup>报道了基于受激拉曼散射的无标记多色流式化学成像技术, 并利用卷积神经网络对微藻细胞和癌细胞进行高精度的无标记表征和分类。如图5(a)所示, 该技术采用一束790 nm的钛蓝宝石飞秒激光作为受激拉曼散射的泵浦光, 并将一束波长为1030 nm、脉宽为20 nm的Yb光纤激光利用衍射光栅分成4束不同波长的光作为斯托克斯光, 以

此获得4色受激拉曼散射信号。以2 cm/s的高流速和24000 line/s的高图像采集速度, 该技术实现通量高达每秒140个细胞的化学选择性成像, 如图5(b)所示。Lyu等<sup>[37]</sup>和Nitta等<sup>[38]</sup>进一步利用受激拉曼散射高速光流控成像技术对细胞实现了无标记的、基于化学选择性的分选, 最终实现了每秒约100个细胞的分选通量。

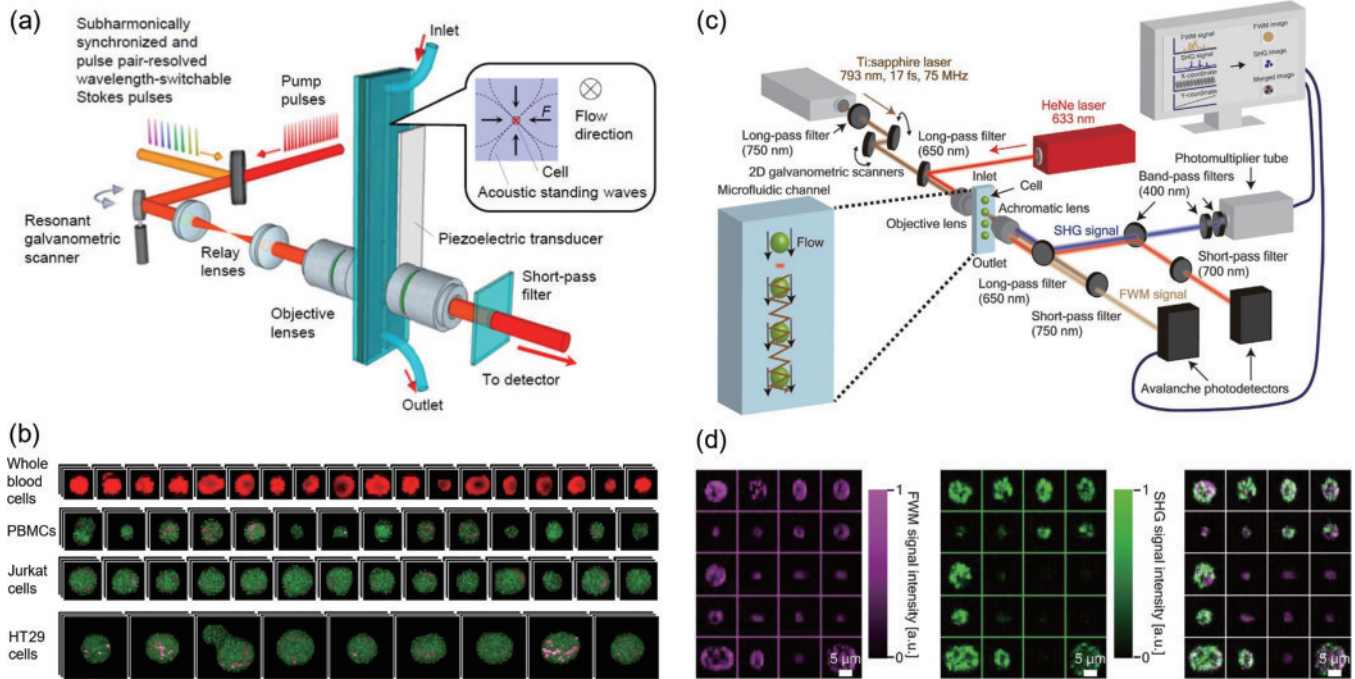


图5 非线性光学成像技术。(a)基于受激拉曼散射的光流控成像原理<sup>[36]</sup>; (b)全血细胞、外周血单个核细胞(PBMCs)、Jurkat细胞和HT29细胞的受激拉曼散射光流控成像图像<sup>[36]</sup>; (c)一种基于四波混频和二次谐波产生的高速光流控成像原理<sup>[39]</sup>; (d) C. Zofingiensis活细胞的四波混频成像图像(左)、二次谐波成像图像(中)及两种成像的合并图像(右)<sup>[39]</sup>

Fig. 5 Nonlinear optical imaging technologies. (a) Schematic of optofluidic imaging based on stimulated Raman scattering (SRS)<sup>[36]</sup>; (b) SRS optofluidic images of whole blood cells, PBMCs, Jurkat cells, and HT29 cells<sup>[36]</sup>; (c) schematic of high-speed optofluidic imaging based on four-wave mixing (FWM) and second harmonic generation (SHG)<sup>[39]</sup>; (d) FWM (left), SHG (middle), and merged (right) images of *C. Zofingiensis* cells<sup>[39]</sup>

此外, 基于传统二阶和三阶非线性光学效应的高速光流控成像也引起了人们的关注。2023年Kinegawa等<sup>[39]</sup>开发了一种基于四波混频(FWM)和二次谐波产生(SHG)两种非线性效应的高速光流控成像技术, 如图5(c)所示。图5(d)展示了该技术对C. Zofingiensis活细胞中的淀粉和胶原蛋白进行成像的结果, 以每秒4到5个细胞的高通量获得了500 nm的空间分辨率和50 μm × 50 μm的成像视场。

#### 4 高速光流控成像中的微流控技术

微流控是高速光流控成像中的重要技术。利用适当的方式聚焦样品, 使核心流中的细胞以单列的形式排列而不相互接触, 并以稳定的速度将其传送到成像系统进行数据收集, 这对高效稳定的高速光流控成像至关重要<sup>[40]</sup>。高速光流控成像中常用的微流控聚焦技术主要包括流体动力学聚焦、介电泳聚焦和声学聚焦。

流体动力学聚焦是传统流式细胞术中最常用的样品聚焦技术, 通过使用鞘液或空气将流体聚焦到直径几微米的范围内来实现聚焦, 如图6(a)所示。流体动力学聚焦包含二维和三维聚焦方式。二维聚焦将样品缩小到通道的中心平面上, 但由于缺乏对样品在垂直方向上位置的控制, 限制了聚焦成像的稳定性, 可能会使部分图像出现脱焦的问题。三维聚焦在水平和垂直方向上都限制了样品的流动, 因此能够提供更稳定清晰的图像<sup>[41]</sup>。然而, 由于微流控芯片普遍采用平面制造工艺, 实现片上三维聚焦比二维聚焦需要更复杂的制备工艺。一般采用多层微芯片设计实现三维流体动力学聚焦。比如, Fu等<sup>[42]</sup>在通道底部采用微堰结构设计, 利用流体动力实现三维聚焦, 该设计可在垂直方向上实现对不同直径微珠的有效分离。

介电泳是中性质子非均匀电场中由于极化作用而受力并发生运动的现象。介电泳力的大小主要取决

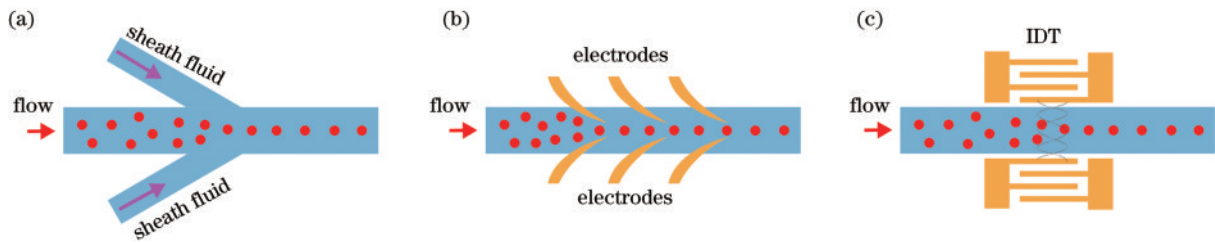


图 6 高速光流控成像中常用的微流控聚焦技术。(a)流体动力学聚焦;(b)介电泳聚焦;(c)声学聚焦

Fig. 6 Microfluidic focusing technologies commonly used in high-speed optofluidic imaging. (a) Hydrodynamic focusing; (b) dielectrophoresis (DEP)-based focusing; (c) acoustic focusing

于粒子的尺寸、粒子和周围介质的电学特性、电场的频率。由于生物细胞具有不同的介电特性,介电泳可用于操纵、运输、分离和分类不同类型的细胞<sup>[43-45]</sup>。负的介电泳力通常用于基于电极的介电泳二维聚焦,如图 6(b)所示,通过与其他聚焦技术结合,能够实现三维对焦。例如, Lin 等<sup>[46]</sup>设计了一个结合流体动力学聚焦和垂直施加负介电泳力的三维聚焦技术,并在聚苯乙烯微珠和稀释的人体红细胞中验证了其实用性。

利用声场可以对微流控装置中的样品产生很大的力,通过激活压电材料上的一系列叉指换能器,在其共振频率下可以驱动颗粒在微流体通道内迁移<sup>[47-48]</sup>。基于表面声波的共振频率可达 GHz,能够实现对微米尺寸颗粒和细胞的精准操控。声学聚焦技术如图 6(c)所示。基于声学的聚焦系统已经成功地应用于多种生物样品的光流控成像。进一步,结合流体动力学和声学的混合聚焦方法能够有效提高聚焦性能并减少器件制备过程。Chen 等<sup>[49]</sup>开发了一种基于驻表面声波的光流控成像技术,样品通过双叉指换能器(IDT)形成的三维聚焦场得到聚焦,可以实现对荧光标记的人早幼粒细胞白血病细胞 HL-60 的高质量成像。此外, Huang 团队<sup>[50-52]</sup>开发了一系列结合流体动力学和声学的混合聚焦方法,以提高聚焦性能并减少制造过程。声学聚焦技术具有非接触、无损伤、高通量和高灵敏度的优点,但为了满足压电换能器的特定需求可能会带来更高的成本和系统复杂性。

## 5 高速光流控成像中的数据分析方法

高速光流控成像中的数据分析方法主要依赖于传统的统计学方法和基于人工智能的图像分析方法。高速光流控成像获得包含大量细胞信息(如大小、形状、结构、成分等)的图像,利用传统的统计学手段对如此大规模的数据进行分析需要耗费巨大的人力和时间。近年来,以深度学习为核心的人工智能技术逐渐应用于图像处理与分析,展现出传统统计学方法难以比拟的高效性、准确性和智能化<sup>[53-55]</sup>。

深度学习是数据驱动式的统计推断工具,能够实现鲁棒和高质量的图像处理和分析<sup>[56-61]</sup>。高速光流控成像所生成的大规模图像信息满足深度学习对训练数据的质与量的要求,因此能够充分发挥深度学习的优

势<sup>[15]</sup>。深度学习用于高速光流控成像中的图像处理和图像分析主要包括图像复原、图像重建、图像增强、图像分割、图像分类等。在图像复原方面,采用卷积神经网络来调整并训练数据变量,使用监督或自监督的方式将模糊或失真的图像转为高质量图像;在图像重建方面,通过数据驱动的方法来进行逆向图像重建,尤其在 3D 和超分辨率光流控成像中具有独特的优势;在图像增强方面,通过学习一种成像模态的图像来推断另一种模态的图像,从而揭示细胞的多维度信息;在图像分割方面,通常利用卷积神经网络在样品背景、细胞内部和边界进行像素分类,进行图像分割后能够更好地监测细胞运动状态;在图像分类方面,通过分析细胞的潜在特征对细胞进行分类,进而实现更好的筛查和诊断。目前已有包括卷积神经网络(CNN)、循环神经网络(RNN)、生成对抗网络(GAN)等深度学习模型被报道用于高速光流控成像中的图像去模糊化、成像分辨率提升、细胞分选等<sup>[62-65]</sup>。

图 7(a)展示了 Zhang 等<sup>[63]</sup>建立并优化的一个带有残差网络(ResNet)结构的两阶段卷积神经网络,他们使用光学时间拉伸显微镜作为明场成像流式细胞仪,获得了 K562 细胞的模糊和未模糊图像,并对其进行了智能去模糊处理。该网络显著提高了模糊细胞图像中细胞详细结构的可见性,为解决细胞成像模糊问题提供了一个有希望的解决方案。Heo 等<sup>[64]</sup>构建了一个基于卷积神经网络的图像识别系统,通过对显微镜和 CMOS 相机获得的图像序列进行图像处理和机器学习,可以获取单细胞图像并进行实时分析。如图 7(b)所示,该系统使用多目标跟踪算法对细胞进行计数,并获得每个单个细胞的图像,然后使用监督机器学习算法对单个细胞图像进行分析,以实现无标签分类。由于该系统的计算成本低,因此可以进行实时( $< 2$  ms)的单细胞图像采集和分析,无须将大量采集的图像保存在内存中进行后处理,提供了高通量实时细胞分析的可能性。Zhang 等<sup>[31]</sup>训练了一个卷积神经网络来区分单个血小板、血小板聚集体和白细胞,如图 7(c)所示,进一步分别对每个亚群进行图像分析,进而说明新冠患者和非新冠患者血液中血栓的形成差异。整个分析过程仅需几秒钟,检测准确率达 75%,因此该网络有望用于实时诊断。Huang 等<sup>[17]</sup>基于虚拟冷冻荧光微

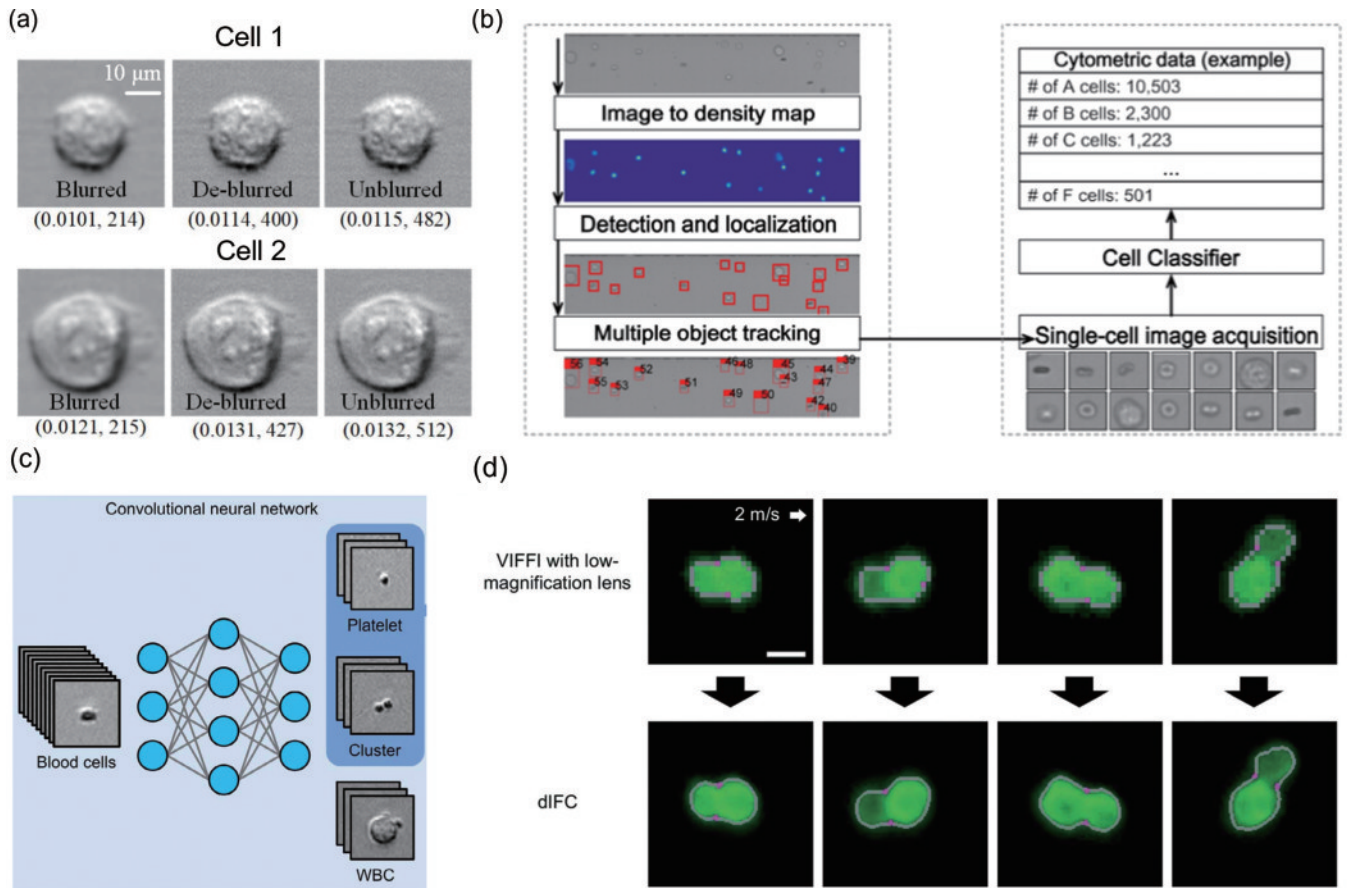


图 7 深度学习在高速光流控成像中的应用。(a)利用卷积神经网络对 K562 细胞图像进行去模糊处理<sup>[63]</sup>；(b)利用卷积神经网络进行实时单细胞图像采集和分类<sup>[64]</sup>；(c)利用卷积神经网络对单个血小板、血小板聚集体和白细胞进行分类识别<sup>[31]</sup>；(d)利用生成对抗网络处理低分辨率 Jurkat 细胞图像,以获得高分辨率图像<sup>[17]</sup>

Fig. 7 Applications of deep learning in high-speed optofluidic imaging. (a) Images deblurring of K562 cell using convolutional neural network (CNN)<sup>[63]</sup>; (b) real-time single cell image acquisition and classification using CNN<sup>[64]</sup>; (c) classification of single platelet, platelet aggregates, and white blood cells using CNN<sup>[31]</sup>; (d) generation of high-resolution images of Jurkat cells from the low-resolution images using generative adversarial network (GAN)<sup>[17]</sup>

流控成像平台训练并开发了包含两个生成对抗网络架构的高分辨图像生成器,在不牺牲灵敏度和空间分辨率的情况下实现了更高的通量。首先用低倍透镜获取在微流体通道中流动的细胞的图像,然后使用基于深度学习的高分辨图像生成器生成“虚拟”高分辨图像,即使细胞以 2 m/s 高速流动,也能提供与高倍透镜图像相当的高分辨率,如图 7(d)所示。当使用生成的高分辨图像代替原始低分辨图像时,能够显著提高 Jurkat 细胞荧光原位杂交计数和酵母细胞颈部宽度测量的准确性。

## 6 总结与展望

高速光流控成像凭借高分辨率、高通量和高灵敏度的特点,为大规模、定量和多维度的生化检测分析提供了强大的平台。当先进的成像技术与微流控技术以及人工智能相结合时,生物医学研究迎来了前所未有的时空分辨率。本文综述了近年来高速光流控成像的核心技术和最新应用进展。作为融合光学成像、微流

控和人工智能的新兴跨领域技术,未来高速光流控成像的发展趋势将朝着多模态、智能化和集成化的即时检测和临床医学应用方向发展。

首先,三维成像是高速光流控成像未来发展的重要方向之一。目前的高速光流控成像大多基于二维成像技术,然而,高速流体中的许多生物个体如细胞、细胞聚集等实际上都是三维个体。发展高速光流控三维成像技术将弥补二维成像技术对三维个体成像信息缺失的缺陷,能够更加准确地对成像个体的大小、形态、结构、生化成分等特征进行测量和分析。然而,三维成像的发展将对成像速度和图像数据传输、处理和分析速度提出更高的要求。它的发展将有赖于新的高速三维成像原理和机制以及图像信息采集与处理软硬件的协同进步。

其次,在体的高速光流控成像技术也是未来发展的重要方向之一。目前的高速光流控成像大多需要将待测样品注入到人工设计的微流控芯片进行成像,然而针对即时检测和临床医学等方面的应用,实现在体、



无创的人体血管中血液细胞的快速检测具有重要的应用价值。虽然目前针对在体的高速光流控成像技术已有报道,但受限于成像分辨率和成像信噪比,细胞分辨(如:五种白细胞的识别)以及形貌和亚细胞结构分析仍然面临巨大挑战。它的发展有赖于深组织成像原理和技术的突破,以解决生物组织导致的多重散射和像差影响。

另外,更大程度地发挥基于人工智能的图像处理和分析技术在高速光流控成像中的作用也是未来发展的重要方向之一。例如,通过深度学习训练模型实现虚拟荧光标记,由输入的明场图像生成输出对应的荧光图像,可大大降低样品制备难度、提高成像速度和检测通量。另外,利用深度学习的信息作为自适应反馈控制,将深度学习模型的输出(例如检测到的细胞/组织区域及时空信息)用于成像和对微流控装置的实时调节,并持续优化成像性能,协调整个光流控实验过程,使智能化的高速光流控成像成为可能。

高速光流控成像的发展为生物能源、食品科学、药物筛选、疾病诊断等领域的应用提供了无可比拟的大数据采集和分析工具。随着先进的光学成像、微流控芯片和深度学习等不同领域的技术革新与融合,高速光流控成像技术将进一步加快其在以上领域的产业化进程。

### 参 考 文 献

- [1] 卫奥尼, 秦成兵, 董帅, 等. 超分辨荧光显微成像的若干研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2023, 60(11): 1106012.  
Wei A N, Qin C B, Dong S, et al. Research progress of super-resolution fluorescence microscopy[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2023, 60(11): 1106012.
- [2] 曹怡涛, 王雪, 路鑫超, 等. 无标记光学显微成像技术及其在生物医学的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617012.  
Cao Y T, Wang X, Lu X C, et al. Label-free optical microscopy technique and its biomedical applications[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617012.
- [3] 方娜, 吴赞艺, 王行富, 等. 多光子技术可视化血管型脑膜瘤[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617025.  
Fang N, Wu Z Y, Wang X F, et al. Multiphoton technique for visualization of angiomatous meningiomas [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617025.
- [4] Ávila F J, Gambín A, Artal P, et al. *In vivo* two-photon microscopy of the human eye[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 10121.
- [5] Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy[J]. Nature Methods, 2018, 15(3): 173-182.
- [6] Sachdeva S, Davis R W, Saha A K. Microfluidic point-of-care testing: commercial landscape and future directions [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 8: 602659.
- [7] Berlanda S F, Breitfeld M, Dietsche C L, et al. Recent advances in microfluidic technology for bioanalysis and diagnostics[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(1): 311-331.
- [8] Yeo L Y, Chang H C, Chan P P Y, et al. Microfluidic devices for bioapplications[J]. Small, 2011, 7(1): 12-48.
- [9] Zhao Y H, Stratton Z S, Guo F, et al. Optofluidic imaging: now and beyond[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(1): 17-24.
- [10] Minzioni P, Osellame R, Sada C, et al. Roadmap for optofluidics[J]. Journal of Optics, 2017, 19(9): 093003.
- [11] Zhu J M, Zhu X Q, Zuo Y F, et al. Optofluidics: the interaction between light and flowing liquids in integrated devices[J]. Opto-Electronic Advances, 2019, 2(11): 190007.
- [12] Chen S H, Hao R, Zhang Y, et al. Optofluidics in bio-imaging applications[J]. Photonics Research, 2019, 7(5): 532-542.
- [13] Tang J K, Qiu G Y, Wang J. Recent development of optofluidics for imaging and sensing applications[J]. Chemosensors, 2022, 10(1): 15.
- [14] Nishikawa M, Kanno H, Zhou Y Q, et al. Massive image-based single-cell profiling reveals high levels of circulating platelet aggregates in patients with COVID-19 [J]. Nature Communications, 2021, 12: 7135.
- [15] Siu D M D, Lee K C M, Chung B M F, et al. Optofluidic imaging meets deep learning: from merging to emerging[J]. Lab on a Chip, 2023, 23(5): 1011-1033.
- [16] Zare Harofte S, Soltani M, Siavashy S, et al. Recent advances of utilizing artificial intelligence in lab on a chip for diagnosis and treatment[J]. Small, 2022, 18(42): 2203169.
- [17] Huang K R, Matsumura H, Zhao Y Q, et al. Deep imaging flow cytometry[J]. Lab on a Chip, 2022, 22(5): 876-889.
- [18] Isozaki A, Harmon J, Zhou Y Q, et al. AI on a chip[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(17): 3074-3090.
- [19] Pratt S L, Zath G K, Akiyama T, et al. DropSOAC: stabilizing microfluidic drops for time-lapse quantification of single-cell bacterial physiology[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2112.
- [20] Mandracchia B, Son J, Jia S. Super-resolution optofluidic scanning microscopy[J]. Lab on a Chip, 2021, 21(3): 489-493.
- [21] Mikami H, Harmon J, Kobayashi H, et al. Ultrafast confocal fluorescence microscopy beyond the fluorescence lifetime limit[J]. Optica, 2018, 5(2): 117-126.
- [22] Mathur P, Fomitcheva Khartchenko A, Stavarakis S, et al. Quantifying antibody binding kinetics on fixed cells and tissues *via* fluorescence lifetime imaging[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(31): 10967-10975.
- [23] Lee D H, Li X, Ma N, et al. Rapid and label-free identification of single leukemia cells from blood in a high-density microfluidic trapping array by fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Lab on a Chip, 2018, 18(9): 1349-1358.
- [24] Son J, Mandracchia B, Silva Trenkle A D, et al.

- Portable light-sheet optofluidic microscopy for 3D fluorescence imaging flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(4): 624-630.
- [25] Ugawa M, Ota S. High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging flow cytometry[J]. *Small Science*, 2022, 2(7): 2100126.
- [26] Mikami H, Kawaguchi M, Huang C J, et al. Virtual-freezing fluorescence imaging flow cytometry[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1162.
- [27] Goda K, Tsia K K, Jalali B. Serial time-encoded amplified imaging for real-time observation of fast dynamic phenomena[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1145-1149.
- [28] Goda K, Ayazi A, Gossett D R, et al. High-throughput single-microparticle imaging flow analyzer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(29): 11630-11635.
- [29] Jiang Y Y, Lei C, Yasumoto A, et al. Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(14): 2426-2434.
- [30] Deng Y J, Duque J A, Su C X, et al. Understanding stenosis-induced platelet aggregation on a chip by high-speed optical imaging[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 356: 131318.
- [31] Zhang C Q, Herbig M, Zhou Y Q, et al. Real-time intelligent classification of COVID-19 and thrombosis via massive image-based analysis of platelet aggregates[J]. *Cytometry Part A*, 2023, 103(6): 492-499.
- [32] Park Y, Depeursinge C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(10): 578-589.
- [33] Aknoun S, Yonnet M, Djabari Z, et al. Quantitative phase microscopy for non-invasive live cell population monitoring[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 4409.
- [34] Lee K C M, Lau A K S, Tang A H L, et al. Multi-ATOM: ultrahigh-throughput single-cell quantitative phase imaging with subcellular resolution[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(7): e201800479.
- [35] Deng Y J, Tay H M, Zhou Y Q, et al. Studying the efficacy of antiplatelet drugs on atherosclerosis by optofluidic imaging on a chip[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(3): 410-420.
- [36] 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.
- [37] Lyu Y K, Yuan X F, Glidle A, et al. Automated Raman based cell sorting with 3D microfluidics[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(22): 4235-4245.
- [38] Nitta N, Iino T, Isozaki A, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3452.
- [39] Kinegawa R, Gala de Pablo J, Wang Y, et al. Label-free multiphoton imaging flow cytometry[J]. *Cytometry. Part A*, 2023, 103(7): 584-592.
- [40] Zhang T L, Hong Z Y, Tang S Y, et al. Focusing of sub-micrometer particles in microfluidic devices[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(1): 35-53.
- [41] Yan S, Yuan D. Continuous microfluidic 3D focusing enabling microflow cytometry for single-cell analysis[J]. *Talanta*, 2021, 221: 121401.
- [42] Fu L M, Hong T F, Wen C Y, et al. Electrokinetic instability effects in microchannels with and without nanofilm coatings[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(24): 4871-4879.
- [43] Chou W P, Wang H M, Chang J H, et al. The utilization of optically-induced-dielectrophoresis (ODEP)-based virtual cell filters in a microfluidic system for continuous isolation and purification of circulating tumour cells (CTCs) based on their size characteristics[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 241: 245-254.
- [44] Sadeghian H, Hojjat Y, Soleimani M. Interdigitated electrode design and optimization for dielectrophoresis cell separation actuators[J]. *Journal of Electrostatics*, 2017, 86: 41-49.
- [45] Salari A, Thompson M. Recent advances in AC electrokinetic sample enrichment techniques for biosensor development[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 3601-3615.
- [46] Lin C H, Lee G B, Fu L M, et al. Vertical focusing device utilizing dielectrophoretic force and its application on microflow cytometer[J]. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2004, 13(6): 923-932.
- [47] Leibacher I, Reichert P, Dual J. Microfluidic droplet handling by bulk acoustic wave (BAW) acoustophoresis [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(13): 2896-2905.
- [48] Fakhfoury A, Devendran C, Albrecht T, et al. Surface acoustic wave diffraction driven mechanisms in microfluidic systems[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(15): 2214-2224.
- [49] Chen Y C, Nawaz A A, Zhao Y H, et al. Standing surface acoustic wave (SSAW) -based microfluidic cytometer[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(5): 916-923.
- [50] Wu M X, Chen K J, Yang S J, et al. High-throughput cell focusing and separation via acoustofluidic tweezers [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(19): 3003-3010.
- [51] Nawaz A A, Zhang X J, Mao X L, et al. Sub-micrometer-precision, three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing via "microfluidic drifting" [J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(2): 415-423.
- [52] Mao X L, Nawaz A A, Lin S C S, et al. An integrated, multiparametric flow cytometry chip using "microfluidic drifting" based three-dimensional hydrodynamic focusing [J]. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(2): 24113-241139.
- [53] Shah P, Kendall F, Khozin S, et al. Artificial intelligence and machine learning in clinical development: a translational perspective[J]. *NPJ Digital Medicine*, 2019, 2: 69.
- [54] Rivenson Y, Wang H D, Wei Z S, et al. Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, 3(6): 466-477.
- [55] Bai B J, Yang X L, Li Y Z, et al. Deep learning-enabled

- virtual histological staining of biological samples[J]. *Light, Science & Applications*, 2023, 12(1): 57.
- [56] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning[J]. *Nature*, 2015, 521(7553): 436-444.
- [57] Feng S J, Xiao Y L, Yin W, et al. Fringe-pattern analysis with ensemble deep learning[J]. *Advanced Photonics Nexus*, 2023, 2(3): 036010.
- [58] Yang J G, Choi S, Kim J, et al. Recent advances in deep-learning-enhanced photoacoustic imaging[J]. *Advanced Photonics Nexus*, 2023, 2(5): 054001.
- [59] Wang J Y, Fan J C, Zhou B, et al. Hybrid reconstruction of the physical model with the deep learning that improves structured illumination microscopy [J]. *Advanced Photonics Nexus*, 2023, 2(1): 016012.
- [60] He Y Z, Yao J, et al. Self-supervised deep-learning two-photon microscopy[J]. *Photonics Research*, 2022, 11(1): 1-11.
- [61] Wang W H, Zhao X, Jiang Z X, et al. Deep learning-based scattering removal of light field imaging[J]. *Chinese Optics Letters*, 2022, 20(4): 041101.
- [62] Riordon J, Sovilj D, Sanner S, et al. Deep learning with microfluidics for biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(3): 310-324.
- [63] Zhang F Z, Lei C, Huang C J, et al. Intelligent image de-blurring for imaging flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(5): 549-554.
- [64] Heo Y J, Lee D, Kang J S, et al. Real-time image processing for microscopy-based label-free imaging flow cytometry in a microfluidic chip[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11651.
- [65] Siu D M D, Lee K C M, Lo M C K, et al. Deep-learning-assisted biophysical imaging cytometry at massive throughput delineates cell population heterogeneity [J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(20): 3696-3708.