

三维拉曼显微成像技术研究进展(特邀)

冯巩¹, 行霆燕¹, 王楠^{1**}, 曾琦¹, 谢晖¹, 陈雪利^{1,2*}¹西安电子科技大学生命科学技术学院西安市跨尺度生命信息智能感知与调控重点实验室, 陕西 西安 710126;²西安电子科技大学广州研究院先进医学影像与智慧医疗创新中心, 广东 广州 510555

摘要 拉曼显微成像技术无需样本制备, 具有无损、无创、对水溶液不敏感的优点, 可在微米或纳米尺度下表征样本的生化组分及分布, 成为生命科学领域重要的研究工具。随着对复杂生物样本研究的不断深入, 拉曼显微成像也被期待能够实现生物样本中的分子组成与分布的动态立体观测。首先, 系统地梳理近年来三维拉曼显微成像技术的研究进展, 包括基于自发拉曼散射、相干拉曼散射、表面增强拉曼散射以及拉曼标签的不同三维成像方法的技术手段、改进策略与实验结果。然后, 总结了不同成像技术在细胞生物学、发育生物学等方面的应用进展。最后展望了不同三维拉曼显微成像技术在生物医学光学显微成像技术应用中所面临的挑战和发展前景。

关键词 三维显微成像; 拉曼显微成像; 自发拉曼散射; 相干拉曼散射; 表面增强拉曼散射; 拉曼标签

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232625

Research Progress of Three-Dimensional Raman Microscopic Imaging (Invited)

Feng Gong¹, Xing Tingyan¹, Wang Nan^{1**}, Zeng Qi¹, Xie Hui¹, Chen Xueli^{1,2*}¹Xi'an Key Laboratory of Intelligent Sensing and Regulation of Trans-Scale Life Information, School of Life Science and Technology, Xidian University, Xi'an 710126, Shaanxi, China;²Innovation Center for Advanced Medical Imaging and Intelligent Medicine, Guangzhou Institute of Technology, Xidian University, Guangzhou 510555, Guangdong, China

Abstract Raman microscopic imaging has emerged as an important research tool in life sciences because it does not require sample preparation and is non-destructive, non-invasive, and insensitive to aqueous solutions. It enables the characterization of biochemical components and sample distributions at a micrometer or nanometer scale. As the research on complex biological samples increases, Raman microscopic imaging holds potential for the dynamic stereoscopic observation of molecular composition and distribution in biological samples. This paper systematically examined recent advancements in 3D Raman microscopic imaging, including technical approaches, improvement strategies, and experimental results of various 3D imaging methods based on spontaneous Raman scattering, coherent Raman scattering, surface-enhanced Raman scattering, and Raman tags. Further, the progress of the applications of different imaging techniques in cell biology and developmental biology was summarized. Finally, the challenges and development prospects of different 3D Raman microscopic imaging techniques in the application of biomedical optical microscopic imaging technology were outlined.

Key words three-dimensional microscopic imaging; Raman microscopic imaging; spontaneous Raman scattering; coherent Raman scattering; surface-enhanced Raman scattering; Raman tag

1 引言

三维显微成像技术可以快速、定量、全局地测量细胞、组织或器官, 具有微米或者亚微米级别的分辨率,

对研究脑功能、发育生物学及细胞代谢具有重要价值, 如研究肿瘤细胞与其微环境之间的相互作用^[1]、细胞间相互作用对细胞间行为与细胞器功能的影响^[2]等。现阶段, 实现三维成像的主要技术包括共聚焦显微成

收稿日期: 2023-12-07; 修回日期: 2024-01-03; 录用日期: 2024-01-08; 网络首发日期: 2024-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(62275210, 62007026)、国家级青年人才项目、陕西省杰出青年科学基金(2020JC-27)、陕西省青年拔尖人才项目、陕西省重点研发计划重点产业创新链项目(2021ZDLSF04-05)、陕西省重点研发计划一般项目(2022GY-313)

通信作者: *xlchen@xidian.edu.cn; **wangnan@xidian.edu.cn

像技术^[3]、光片显微成像技术^[4]、双光子显微成像技术^[5]等,但是这些基于荧光的技术往往难以反映分子及其结构的特异性信息,且依赖于荧光标记,可能造成细胞毒性、光漂白以及不稳定的问题,影响实验结果的准确性与可重复性。而拉曼成像技术可以无标记方式提供样本化学键振动的独特指纹信息,具有非破坏性、高特异性及样本制备简单等优势,已广泛应用于生物样品的测量,如评估细胞分化过程中的成分变化,根据蛋白质、矿物质、无定性相含量的细微差异区分细胞类型,生物样本无标记三维化学成像等^[6]。然而,由于自发拉曼散射存在散射截面小、信号弱的问题,往往需要在积分时间与激发功率之间进行权衡,严重限制了其在三维成像中的实时性和图像质量。为了解决这一问题,快速扫描策略、相干拉曼散射成像、表面增强拉曼散射成像以及拉曼标签等方法被相继提出并得到不断优化,使得快速高分辨三维拉曼成像成为可能。基于此,本文将系统性地梳理近年来三维拉曼显微成像技术的研究进展,包括基于自发拉曼散射、相干拉曼散射、表面增强拉曼散射以及拉曼标签的不同三维成像方法的技术手段、改进策略以及实验结果。然后,详细论述不同策略的三维拉曼显微成像技术在细胞生物学、发育生物学等领域的应用进展,并展望该技术在未来面临的挑战和发展方向。

2 三维拉曼显微成像技术

2.1 基于自发拉曼散射的三维拉曼显微成像技术

自发拉曼散射是一种非弹性散射过程,包括斯托克斯拉曼散射与反斯托克斯拉曼散射,通过检测入射光子与散射光子的能量差异,可以获得有关样本振动能量与频率的信息。目前,基于自发拉曼散射的无标记三维成像方法大部分与光学扫描显微镜耦合来实

现,通过横向与轴向扫描获取整个样本的拉曼图谱,从而实现对本体的检测与分析^[7]。其中主要包括基于扫描机制的拉曼显微镜、基于光片的拉曼显微镜及基于投影断层的拉曼显微镜等,这些技术具有不同的成像机制。

2.1.1 基于扫描机制的三维拉曼显微成像技术

点扫描是扫描机制成像中最简单也最容易实现的,通过对样本上的焦斑进行光栅扫描,获取样本多位置的高光谱数据集^[8]。该技术可以从样本平面的任何记录点获取具有完整样本振动信息的三维图像,具有衍射极限分辨率。然而样本和外源分子的固有背景以及自发荧光很容易淹没样本拉曼信号,但是共聚焦拉曼显微镜可以提供固有的光学切片能力,能减少焦外信号的影响,提供样本高分辨图像。典型的共聚焦拉曼显微镜系统结构如图 1(a)所示,相比传统点扫描方式,其主要通过移动样本或者采用振镜扫描方式获取每个空间位置的拉曼散射信号,并利用放置在像方的针孔滤掉焦平面外的拉曼信号,从而获取高信噪比的二维或三维样本的拉曼光谱^[8-9]。同时,共聚焦拉曼显微镜能够实现毫秒级的光谱与分钟级的高光谱数据立方体^[7]。2017年, Kallepitis 等^[10]提出了一个基于共聚焦拉曼显微镜的无标记定量体积拉曼成像的计算框架,展示多种细胞的细胞形状、细胞质、细胞核、脂质体和细胞骨架结构的精细细节在三维中的可视化 and 量化,其计算框架与实验结果如图 1(b)所示。最近, Høget 等^[11]通过使用共聚焦拉曼光谱成像对从未标记的斑马鱼胚胎中提取的生物分子信息进行可视化和多元分析,生成了整个斑马鱼胚胎的三维图像,实验结果如图 1(c)所示。然而,受限于拉曼散射截面小,信号产率低,该技术难以适用于高通量和时间分辨成像的生物样品,基于光片式和投影断层式的三维拉曼显

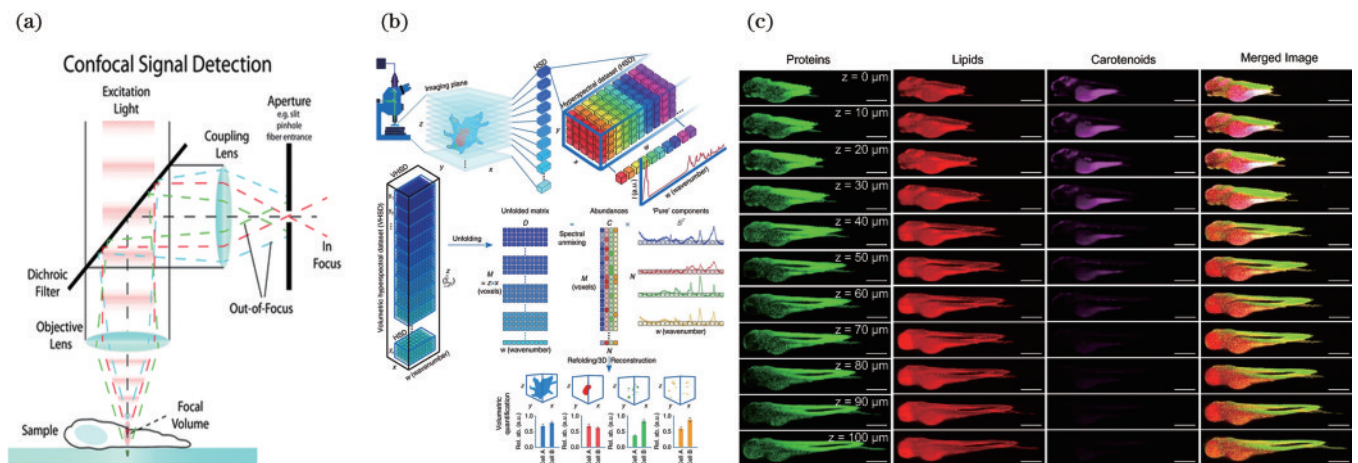


图 1 共聚焦拉曼显微系统及应用结果。(a)共聚焦拉曼显微系统结构示意图^[8]; (b)基于共聚焦拉曼显微镜的无标记定量体积拉曼成像的计算框架^[10]; (c)斑马鱼胚胎的体积共聚焦拉曼光谱成像^[11]
Fig. 1 Confocal Raman microscopic system and its application results. (a) Structure diagram of confocal Raman microscopic system^[8]; (b) computational framework for label-free quantitative volume Raman imaging based on confocal Raman microscope^[10]; (c) volumetric confocal Raman spectroscopic imaging of zebra fish embryos^[11]

微成像技术为此提供了新的解决方案。

2.1.2 基于光片式的三维拉曼显微成像技术

受光片显微成像在荧光三维成像中的快速成像和高对比度优势启发,许多研究致力于将宽场拉曼检测方案与光片照明方式相结合,提高三维拉曼成像的速度和灵敏度,增大图像对比度。典型的光片拉曼显微系统如图 2(a)所示,该技术通过将柱面透镜的激光光束压缩或采用振镜扫描激光束的方式提供薄片照明,其中,激发端与探测端正交耦合,有效消除焦平面外信号干扰,大大增大了图像的信噪比和对比度,实现拉曼信号高效采集,且具有更高的成像速度与轴向分辨率^[12]。2012年,Oshima等^[13]开发了一套光片激发宽场拉曼成像系统,通过对斑马鱼模型进行成像,首次证明了光片拉曼成像技术可对活体动物发育过程的分化机制进行成像。然而,受限于系统特征波段选择范围较宽,该系统难以获取样本完整的光谱信息,仅能实现对样本内单个分子的分布成像。基于此,Rocha-Mendoza等^[12]开发了一套基于光片扫描的自发拉曼显微成像系统,利用振镜扫描激光束的方式产生光片照明,并使用可调谐滤波器对检测信号进行光谱滤波,可以实现一次性对图像的光谱解析。同时通过对浸入琼

脂中的聚苯乙烯珠和脂滴的组合物进行成像,证明了该方法能够实现快速高分辨自发拉曼三维成像。Müller等^[14]提出了一种基于光片拉曼显微光谱的新技术,通过将光片照明与基于傅里叶变换的光谱成像方法结合,能够获取整个图像中每个像素点的全光谱信息,并通过采集斑马鱼眼睛的高光谱数据,经非负矩阵分解实现对斑马鱼眼睛中的多种生物分子三维分布的可视化。在光片显微拉曼成像中,无衍射光束也被用于提高三维拉曼成像的通量与采集图像的信噪比。Subedi等^[15]证明了数字扫描艾里光束创建的光片能够利用均匀且比高斯光束大 10 倍的视场进行自发拉曼成像,相比传统的光片显微镜,成像吞吐率提高了 1 个数量级左右,同时能够在每个平面以 300 ms 的积分时间实现对微粒的高对比度、高轴向分辨率(1 μm)的三维成像,且辐射密度比相干拉曼成像低几个数量级,其系统结构与实验结果如图 2(b)和图 2(c)所示。最近,该课题组^[16]针对大多数生物分子的超小散射截面需要较长的积分时间或较大的辐照度,限制了研究代谢反应中细胞动力学与细胞间代谢变异性的问题,提出了一种新的拉曼成像技术,通过将艾里光片与光子稀疏相结合,在每像素亚光子下进行图像采集和重建,得到

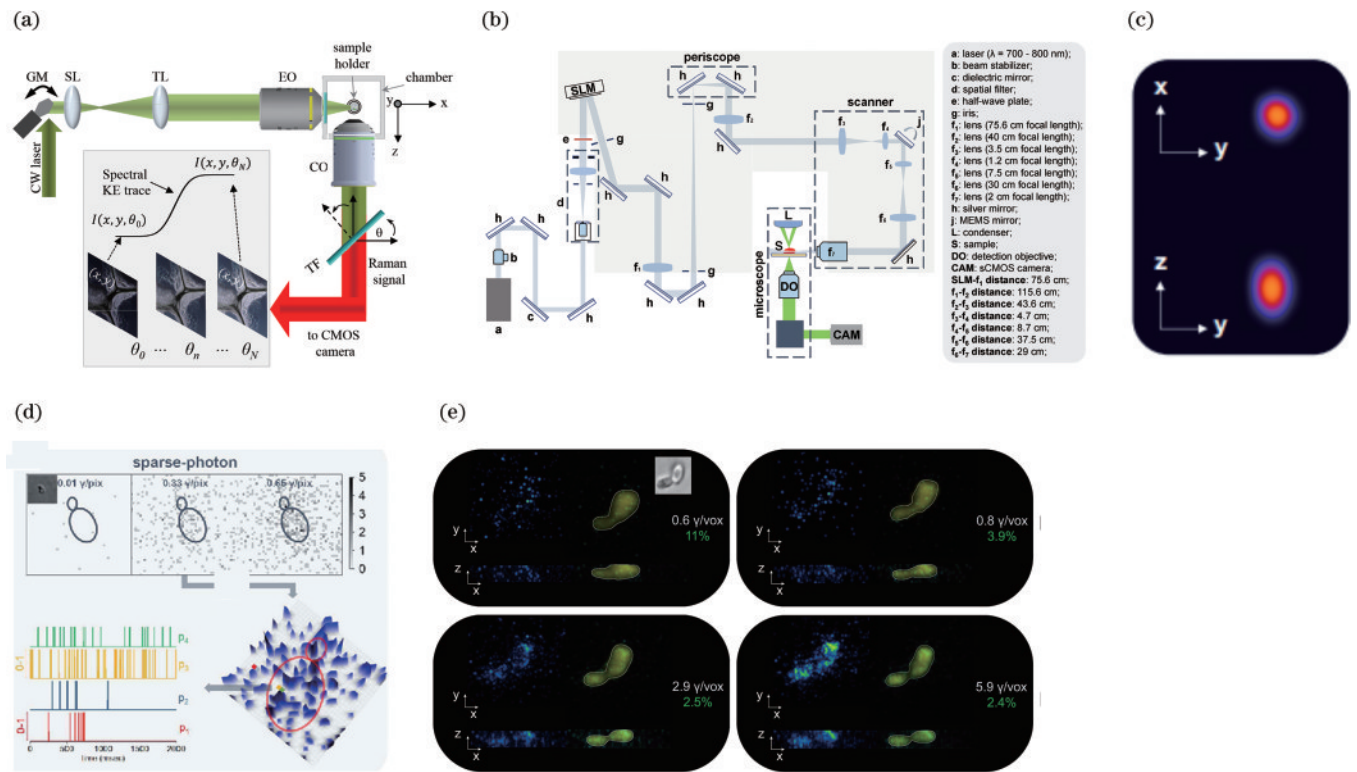


图 2 光片拉曼显微系统及应用结果。(a)光片拉曼显微系统结构示意图^[12]; (b)基于艾里光片成像的光学系统示意图^[15]; (c)聚苯乙烯微球的三维成像结果^[15]; (d)单个溶脂 Y. 细胞的稀疏光子图像及对应的三维放大图像和对对应像素的时间轨迹^[16]; (e)不同光子数量下的细胞三维脂质代谢活动成像结果^[16]

Fig. 2 Light-sheet Raman microscopic system and its application results. (a) System structure diagram of the light-sheet Raman microscopic system^[12]; (b) system diagram of Airy-light-sheet Raman microscopic imaging^[15]; (c) 3D imaging of polystyrene microspheres^[15]; (d) sparse photon image of a single liposolysaccharide Y. cell, and its corresponding 3D enlarged image and the time trajectory of the corresponding pixel^[16]; (e) 3D imaging results of lipid metabolism in cells under different photon numbers^[16]

光子稀疏信号,实现了仅毫秒积分的自发拉曼成像,进而通过对各种样本进行成像,包括单个微生物的三维代谢活性,证明了该技术的多功能性,其实验结果如图 2(d)和图 2(e)所示。

2.1.3 基于投影断层式的三维拉曼显微成像技术

投影断层成像是一种具有各向同性空间分辨率的快速体成像方法,例如计算机断层扫描^[17]、光学断层扫描^[18-19]等。这些技术通过记录穿过物体的准直光束的衰减或光束激发的荧光信号的产生,然后通过重建计算恢复光衰减或荧光信号发射源的空间分布^[20]。由于其能够实现快速三维成像以及提供各向同性的空间分辨率,目前已经成为从细胞、组织、动物到人体的跨尺度成像工具^[21-22]。然而,这些技术仅能实现对样本结构的成像或荧光标记样本的化学成像,难以在无标记方式下实现对样本组分的三维化学成像。因此,许多研究致力于将投影断层扫描的成像方式与自发拉曼显微镜相结合,利用样本旋转的策略以及求解近似扩散方程等算法实现无标记、快速拉曼三维成像。

2008 年, Schulmerich 等^[23]首次实现基于自发拉曼散射效应的扩散投影断层成像,通过将显微计算机断

层扫描与扩散光学断层扫描和拉曼光谱相结合,利用有限元模型求解耦合扩散方程,从离体的犬骨组织中恢复空间和成分信息,但是空间分辨率较低,实验结果如图 3(c)所示。基于此,该课题组^[24]利用平行光谱检测的多通道光学断层成像系统首次在组织模拟模型中展示了拉曼投影断层成像,在使用和不使用网格内部信息的情况下,该系统都可以获得具有高对比度、高背景比、精确空间分辨率的拉曼三维图像。Wang 等^[25]提出了一种双模态光学拉曼投影断层成像技术,该技术能够以免标记方式实现毫米级样本跨尺度级别的空间分辨率及优于 70 mmol/L 的脂类分子浓度检测能力。通过对斑马鱼、拟南芥、果蝇等模式生物的双模态三维成像的检测证明了其在发育生物学和分子生物学的应用潜力,其系统结构和实验结果如图 3(a)和图 3(b)所示。虽然将拉曼成像与投影断层的成像方式相结合可以实现对大尺度样品的快速、无标记三维拉曼成像,但是仍存在分辨率低和生物样品散射的问题。随着成像方式与深度学习方式的结合,可以进一步减少重建体积图像所需的投影图像的数量,从而提高成像的速度和重建图像的质量。

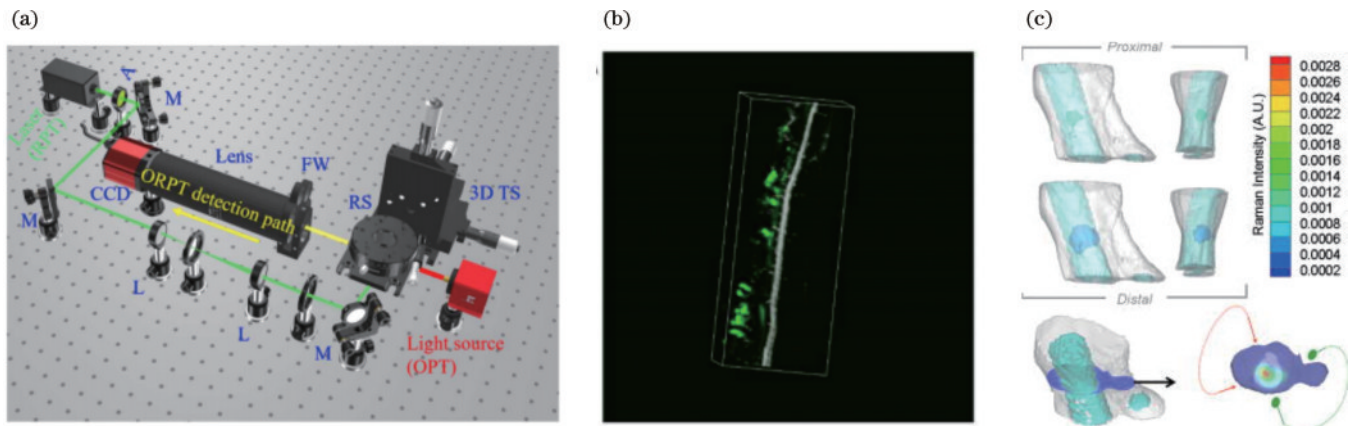


图 3 拉曼投影断层成像系统及应用结果。(a)双模态光学拉曼投影断层扫描系统结构示意图^[25]; (b)拟南芥茎的光学拉曼三维融合成像结果^[25]; (c)犬骨组织的拉曼断层扫描图像^[23]

Fig. 3 Raman projection tomographic system and its application results. (a) Structure diagram of dual-mode optical-Raman projection tomographic system^[25]; (b) optical-Raman 3D fusion imaging of Arabidopsis stems^[25]; (c) Raman tomographic image of dog bone tissue^[23]

当前,基于不同策略的自发拉曼三维成像技术适用于对成像速度、信号强度与分辨率要求不同的样本,正确选择采集模式是生成最强拉曼信号、最大限度地抑制背景、生成可解释和可再现数据的关键。同时,目前基于自发拉曼散射的三维拉曼成像技术虽然在成像速度和灵敏度方面不及相干拉曼散射成像,但是系统简单、易于使用,成为了实时三维成像的强有力工具,广泛应用于细胞、材料等样本的分析。

2.2 基于相干拉曼散射的三维拉曼显微成像技术

在过去的几十年里,基于自发拉曼散射效应的三维拉曼显微成像技术已经用于生物与材料等多个领域,但是与荧光成像模式相比,仍存在信号强度低、采

集时间长的问题,极大限制在复杂环境下对样本的检测。飞秒激光的发展促使人们能够观察到许多非线性过程,促进了相干拉曼散射成像的进步,为实现快速、高分辨三维拉曼成像提供了新的方法^[26]。

相干拉曼散射成像作为一种非线性光学过程,主要使用两个同步脉冲激光束,一束光被称为泵浦光束,另一束光被称为斯托克斯光束,当两束光之间的频率差对应于目标样品的化学键振动频率时,会发生相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和包括受激损耗和受激增益的受激拉曼散射(SRS)^[27-28]。在传统的相干拉曼散射显微镜中,两束激光在空间和时间上重叠,并在样品内部共线聚焦成衍射极限光斑,在紧密的显微镜聚

焦下,刺激因子可以达到数十个数量级左右,使其具有接近散粒噪声限制的灵敏度以及高横向与轴向分辨率^[27, 29]。为了实现三维容积化学成像,相干拉曼散射显微镜需要通过在焦平面上横向扫描光束,然后改变焦平面的位置或沿轴向扫描样本以获得图像堆栈,最后重建三维体积。对于复杂样本的三维容积化学成像及分析,传统的相干拉曼散射显微镜可能无法进一步满足需求,所以许多研究致力于从系统、算法及样本处理上提高三维容积化学成像的速度、灵敏度、分辨率,从而更好地理解生物体发育活动等不同作用机制。

2.2.1 基于相干拉曼散射的快速超分辨三维拉曼显微成像技术

通过受激发射或四波混频的过程实现拉曼信号增强,相干拉曼散射显微镜可以实现与共聚焦荧光显微镜相当的成像速度。但是传统相干拉曼散射显微镜采

集时间为每帧 0.1~10 s,像素驻留时间为 1~100 μs ,在采集样本的三维化学信息时仍需要很长的时间。基于此,Saar 等^[30]分析 SRS 成像的信号产生机制,通过显著增强对后向散射信号的收集,将成像速度提高到传统方法的 3 个数量级左右,并通过对皮肤中的水、脂质和蛋白质进行成像验证该系统的优势。虽然该方法极大提高了 SRS 显微镜的成像速度,但是实现 SRS 体积成像依然还是需要物镜的压电扫描,这通常会干扰样品并提供低的轴向扫描速率。基于此,Lin 等^[31]开发了一种基于可变形镜的远程聚焦 SRS 显微镜,通过在物镜光瞳平面的远程傅里叶平面上设计入射光束的波前来控制焦点的位置,可以在无需机械扫描物镜的情况下实现高质量的体积化学成像,而且还能同时校正系统像差,其系统结构如图 4(a)所示。

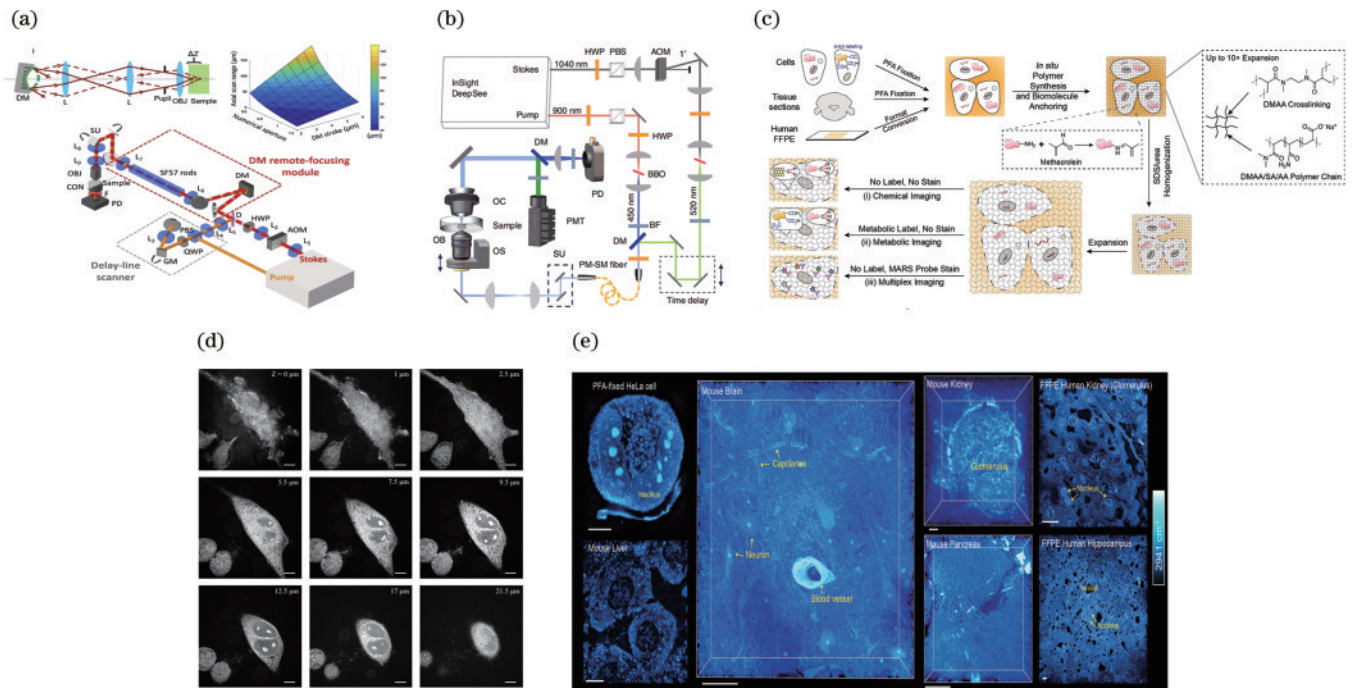


图 4 相干拉曼散射显微系统及应用结果。(a)远程聚焦 SRS 显微镜示意图^[31]; (b)可见光受激拉曼散射显微镜系统结构示意图^[32]; (c)MAGNIFIERS 的工作流程以及 MAGNIFY 的凝胶化学示意图^[36]; (d)可见光受激拉曼散射显微镜对 HeLa 细胞重建的三维图像^[32]; (e)PFA 固定的 HeLa 细胞、小鼠脑、肝、肾和胰腺组织以及 FFPE 固定的人肾和脑海马组织在 2941 cm^{-1} 处的 3D 渲染 SRS 图像^[36]

Fig. 4 Coherent Raman scattering microscope and its application results. (a) Schematic of a remote-focusing SRS microscope^[31]; (b) schematic of the system structure of visible light SRS microscope^[32]; (c) workflow of MAGNIFIERS and gel chemistry of MAGNIFY^[36]; (d) 3D reconstruction of HeLa cells by visible light SRS microscope^[32]; (e) 3D-rendered SRS images of PFA-fixed HeLa cells, mouse brain, liver, kidney, and pancreas tissue, FFPE-fixed human kidney and brain horse tissue at 2941 cm^{-1} ^[36]

目前相干拉曼散射显微镜能够提供亚微米的横向空间分辨率和约 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的轴向切片能力。为了研究亚细胞结构、细胞器内化学物质的分配和细胞功能活性,需要更高的成像分辨率。基于此,2018 年,Bi 等^[32]通过将飞秒激光的波长减小到可见光区域,实现了横向分辨率接近 130 nm 的无标记受激拉曼散射显微镜,同时通过对单细胞三维结构的高分辨率成像和对大规模

完整小鼠脑组织的高分辨率原位映射证实了该系统在空间分辨率上的优势,其系统结构与实验结果如图 4(b)和图 4(d)所示。2020 年,Gong 等^[33]搭建一种高阶相干反斯托克斯显微镜,相比传统 CARS 显微镜,能够提供固有的高共振与非共振背景比,从而打破无标记、超分辨振动成像的衍射极限,为实现生物和生物医学系统中无标记超分辨率生物分子三维成像提供新

的工具。虽然上述方法能够显著提高相干拉曼散射显微镜在三维成像中的分辨率,但是空间分辨率依然受到成像物镜的数值孔径和分子散射截面的限制。基于此,Jang 等^[34]开发了一种反褶积算法,即基于自适应矩估计优化的点反褶积,通过使用自适应矩阵估计(Adam)方法来优化寻找每个发射器位置的过程,相比常用的卷积算法,该方法能够以更高的空间分辨率对图像进行重建,并将其应用于 SRS 成像,生成了一系列哺乳动物细胞、组织以及果蝇脑组织的三维超分辨图像,从而证明了算法的有效性。

在基于相干拉曼散射的三维拉曼显微成像技术中,除了在系统与算法上进行改进外,样本膨胀以及样本清除的方法也被用来提高三维成像的分辨率和成像深度。2021 年,Qian 等^[35]报道了一种通用的样本扩展振动成像策略,该策略将 SRS 显微镜与最近的样品处理创新相结合,能够以低至 78 nm 的分辨率实现对富含蛋白质的生物结构进行可扩展的无标记高分辨成像,并通过对内源性蛋白质的最佳保留、对各向同性样品的扩展和对散射脂质的剥夺,实现高分辨率的三维图像重建,避免在荧光成像中的一些问题。基于此方案,Shi 等^[36]提出了一种分子锚定凝胶的荧光纳米成像和受激拉曼散射显微镜的新方法,该方法利用生物分子含量的优异保留率和跨多种组织类型的一般样品兼容性以及新的 Exm 固定方法,相比原始样本,提供了高达 7.2 倍的可逆线性扩展,从而能够实现约 41 nm 的横向分辨率与 194 nm 的轴向分辨率,并通过对小鼠脑组织的多色三维成像验证该方法的多功能性,其方法与实验结果如图 4(c)和图 4(e)所示。但目前上述方法在对生物组织成像时往往受到光学散射的影响,极大限制成像的深度。最近,出现了一系列组织清除技术,以允许荧光成像的显著深度扩展。受此启发,Wei 等^[37]开发了一种基于组织清除的三维化学成像技术,该技术将拉曼定制的组织清除与受激拉曼散射显微镜相结合,与标准 SRS 相比,实现了超过 10 倍的深度成像,并进一步开发了一种用于多光谱 SRS 图像的 3D 聚类和分割的体积相量分析,实现对肿瘤球体、小鼠脑组织和肿瘤异种移植等复杂三维组织的结构、组成与功能分析。

2.2.2 基于相干拉曼散射的多色三维拉曼显微成像技术

拉曼散射本质上是一个宽带过程,它包含了样品的整个振动谱,具有丰富的化学信息。目前使用两个窄带皮秒激光器的单波段相干拉曼散射显微镜已经普遍用于对已知分量与高分辨拉曼频率的样品的三维成像,但是不能够同时绘制样本中多种生物分子的空间分布^[29]。为了获取完整的化学信息,需要在较宽的拉曼范围内进行多模激发。目前常用的方法是通过扫描激光波长,来获取样本的高光谱数据,但是该方法从记录图像堆栈到进行重建仍需几秒到几分钟的时间,不

足以在没有光谱失真的情况下对生物样本中的动力学进行三维可视化^[27, 38-39]。因此,许多研究致力于并行多模激励的相干拉曼散射显微镜的开发,实现在每个像素都能够瞬间记录光谱,从而极大缩短信号采集时间。2012 年,Fu 等^[40]提出了一种基于 SRS 的调制复用的方法,该方法允许使用快速傅里叶变换实时检测多种物质,并通过对离体小鼠皮肤组织中血液、脂质和蛋白质分布的三维多色高分辨率成像验证该方法的成像潜力,其实验结果如图 5(e)所示。2014 年,Camp Jr 等^[41]提出一种基于宽带相干反斯托克斯拉曼散射的成像平台(BCARS),该平台使用脉冲内三色激发在典型的弱指纹区域内有效地刺激拉曼跃迁,并利用非共振背景外差来放大固有的弱指纹信号。相比之前的方法,该方法能够实现每像素几毫秒量级的光谱采集,并通过对健康小鼠肝脏和胰腺组织的二维和三维成像,证明了该方法的快速多色成像的能力,其系统结构与实验结果如图 5(a)和图 5(c)所示。然而,由于样本内物质的光谱特征可能重叠,难以区分样本中的多种成分。基于此,Ozeki 等^[42]使用波长可调的受激拉曼散射显微镜对组织进行无标记成像,并通过修改的主成分分析对光谱图像进行处理,从而提取光谱特征的微小差异,生成细胞等样本的不同成分的三维多色图像。

2.2.3 基于相干拉曼散射的多模态融合三维拉曼显微成像技术

虽然上述方法从不同角度提高三维容积化学成像的速度、分辨率以及成像深度,但是在对大体积样本进行成像时,依然需要在信号采集时间与图像质量之间进行权衡。因此,许多研究致力于将相干拉曼散射显微镜与其他成像模式相融合,改善在大体积样本中快速点扫描方法导致的速度慢、信号弱以及可能带来的光损伤问题,从而实现快速、高分辨的三维容积化学成像。基于此,Shi 等^[43]开发一种利用 CARS 全息技术进行非扫描相干反斯托克斯拉曼散射成像的新方法,通过将一层均匀的非线性介质放在成像样本前面,利用四波混频形成的参考波干扰样本产生 CARS 信号,从而产生在线全息图。结果表明,CARS 全息图具有良好的化学选择性,可以通过数字传输技术实现样本的三维成像。2021 年,Heuke 等^[44]将傅里叶断层扫描应用于相干反斯托克斯成像,并通过合成数据证明方法能够从有限的宽场 CARS 图像重建复杂的三阶磁化率。最近,Fantuzzi 等^[45]通过将随机照明显微镜、相干反斯托克斯显微镜与和频生成对比相结合,开发了一种具有鲁棒性的宽视场非线性显微镜,其能够从不同散斑照明下获得的多幅图像的二阶统计量中对样本进行超分辨重建与光学切片。相比传统的 CARS 点扫描方法,该方法实现了具有 3 μm 轴向切片能力和 300 nm 横向分辨率的宽场非线性成像,有效降低了样品的峰值强度,并通过对珠子、未染色的人体乳腺组织和化合物混合物进行成像,证明了该显微镜在二维和三维空

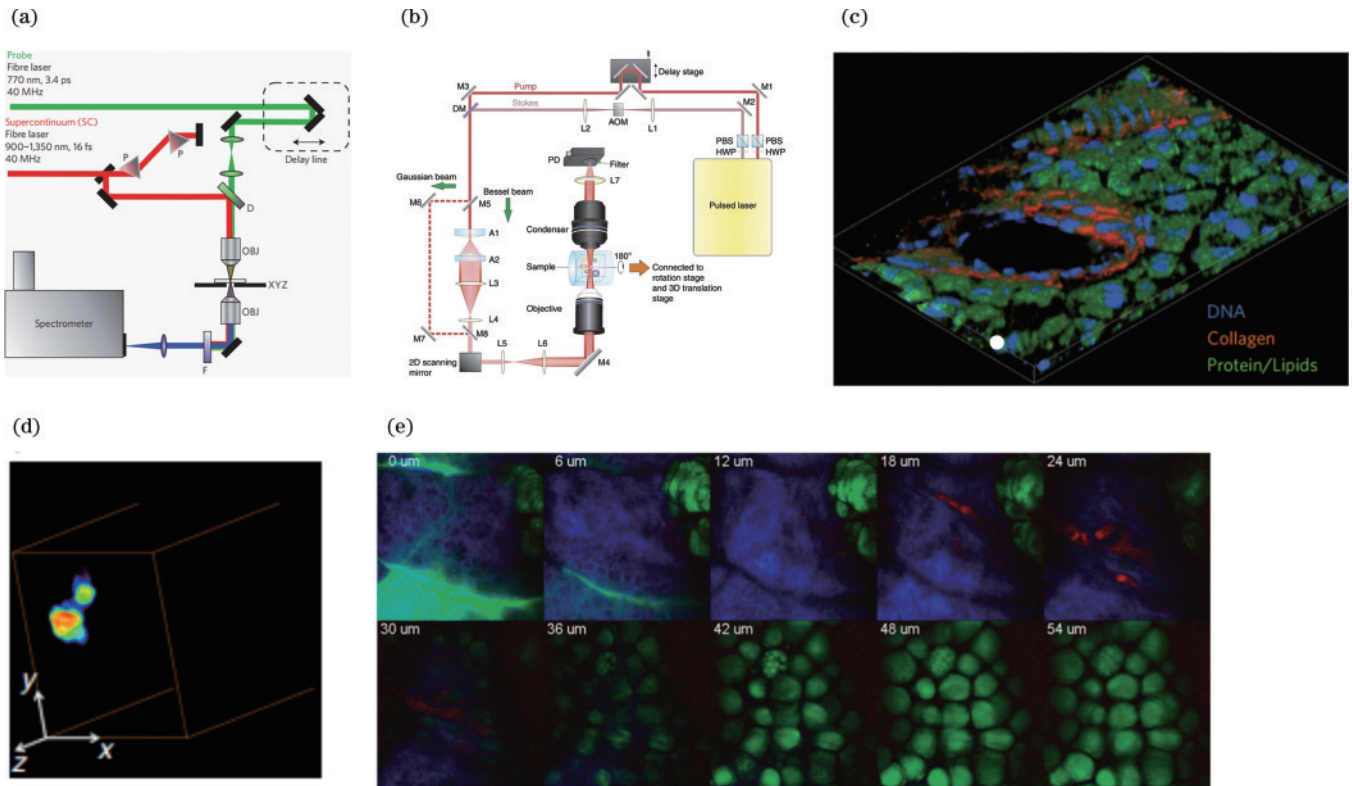


图5 相干拉曼散射显微系统及应用结果。(a)BCARS CRI系统结构示意图^[41];(b)基于贝塞尔光束的受激拉曼投影显微镜结构示意图^[46];(c) BCARS重建的胰腺导管三维图像^[41];(d)基于贝塞尔光束的受激拉曼投影显微镜对3T3-L1细胞的重建三维图像^[46];(e)多色受激拉曼显微镜对小鼠耳朵皮肤组织的不同轴向成像结果^[40]

Fig. 5 Coherent Raman scattering microscope and its application results. (a) Schematic of BCARS CRI system^[41]; (b) structure diagram of stimulated Raman projection microscope based on Bessel beam^[46]; (c) 3D image of pancreatic ducts reconstructed by BCARS^[41]; (d) reconstructed 3D image of 3T3-L1 cells by Bessel beam-based stimulated Raman projection microscope^[46]; (e) different coaxial imaging results of mouse ear skin tissue by multi-color stimulated Raman microscope^[40]

间中的无标记、高对比度化学成像潜力。

在基于相干拉曼散射的三维成像技术中,无衍射光束以及光学投影断层扫描方法也被用于提高SRS三维容积化学成像的速度和成像深度。2017年,Chen等^[46]报道了基于贝塞尔光束的受激拉曼投影断层显微技术(SRPT),能够实现对三维样本的容积化学成像,全面了解三维复杂分子组分的信息。此外,结合SRP和样品旋转断层策略,通过对聚合物颗粒进行成像证明了SRP层析成像可以比基于高斯光束的受激拉曼散射切片成像更高的成像速度重建化学成分的三维分布,其系统结构与实验结果如图5(b)和图5(d)所示。此外,该课题组^[47]基于稀疏采样策略对投影断层成像的重建算法进行了加速,提出了基于稀疏采样原理的迭代重建方法和基于深度学习网络的稀疏重建算法,在保证图像质量的前提下,两种算法重建图像时所需的投影数量分别可降为30个和10个以内,从而将SRP断层扫描成像的速度提升1个数量级以上。但是目前SRP仍需要机械旋转样品台或入射光束,限制了其在一些生物样本中的应用。基于此,Gong等^[48]提出了一种新的无需 \approx 轴扫描的受激拉曼散射显微断层扫描技术,它通过使用与非衍射零阶贝塞尔光束相关的

光学拍频技术,在不需要对样品或物镜进行机械扫描的情况下,能够实现具有亚细胞分辨率、更深穿透能力的无标记容积化学成像。

综上所述,相比基于自发拉曼散射的三维拉曼显微成像技术,基于相干拉曼散射的三维拉曼显微成像技术能够极大提高成像速度、灵敏度以及分辨率。并且基于不同机理的相干拉曼三维成像方法适用于对成像速度、信号强度与分辨率要求不同的样本,所以选择合适的方式对于样本的检测与分析至关重要。然而,目前依然存在仪器复杂和昂贵的问题,所以极大限制了该技术在生物学以及医学的应用,相信随着探测器与激光器技术的发展,相干拉曼散射显微镜能够应用到更多的领域。

2.3 其他新兴的三维拉曼显微成像技术

2.3.1 基于表面增强拉曼散射的三维拉曼显微成像技术

由于自发拉曼散射通常是一个较弱的过程,大约每 10^8 个光子中有一个光子自发地经历拉曼散射,这种固有的弱点对可获得拉曼信号强度造成了限制。目前已经使用了各种方法来增强实验中拉曼信号的强度,如增加激光功率和使用显微镜物镜将激光束紧密

聚焦到小区域,以及使用相干拉曼散射显微镜等^[9],然而,仍存在一些问题,如光漂白、小分子检测灵敏度低等。最近,随着表面增强拉曼散射(SERS)的发展,它能够拉曼信号强度增加数个数量级左右,从而极大提高检测信号的速度和灵敏度。并且通过将表面增强拉曼散射与拉曼光谱仪器相结合,可以收集到关于生物样本分子的拉曼光谱,经多元分析方法处理后,可以很容易地阐明样本之间复杂而微妙的变化,但是大部分工作仍然局限于二维图像分析,忽视了 z 轴上的信息。

最近,研究人员努力从微观到宏观水平改进基于SERS的三维成像,实现对生物样本形态生物分子分布的三维可视化,从而为研究与跟踪生物体内的分子变化提供新的方法。2013年,McAughtrie等^[49]首次将三维拉曼和SERS成像相结合,用于同时确认细胞包涵体和SERS纳米标签的多组分检测,同时通过多变量分析实现对细胞核内生物分子的三维可视化。2016年,Vantasin等^[50]开发了以高度对称的3D银纳米颗粒作为SERS基底的三维表面增强拉曼散射成像技术,通过检测聚合物中混合物在空间中的均匀性,验证该基底相比其他基底具有更高的轴向分辨率。为了同时实现对单细胞捕获与三维细胞表面分子表达的多路

非干扰测量,Jin等^[51]报道了一种机械陷阱表面增强拉曼散射成像技术(MTSERS),该技术利用等离子金纳米星对机械陷阱内的表面功能化以及对细胞膜的保形接触,实现样本信号的增强,允许对单细胞表面的脂质和蛋白质等进行三维成像分析,在生物学的定量检测和动态分析等方面具有较大的潜力,方法如图6(a)所示。在基于表面增强拉曼散射的三维成像中,SERS纳米粒子也被用于复杂的体外细胞模型的拉曼三维成像。2020年,Jimenez de Aberasturi等^[52]设计了一种表面覆盖面积近 1 cm^2 的可控三维细胞培养模型。该结构由含有SERS编码的纳米颗粒的成纤维细胞组成,排列成交替的层状结构,在 z 轴检测SERS信号,实现在复杂、密集组织中对SERS标记的不同细胞的区分。最近,该课题组^[53]设计了一种具有生物相容性和高度稳定的SERS pH探针,并通过三维SERS成像获得活细胞内的pH图谱,从而可视化单个细胞内的动态pH分布变化,其方法以及实验结果如图6(c)所示。

综上所述,通过将SERS与拉曼成像相结合,极大提高检测的灵敏度与成像速度,为对生物样本中生物分子的空间分布与检测提供新的解决方案。然而,SERS可能由于粒子合成以及样本制作等方面原因,还未能能在三维拉曼成像中得到广泛应用,相信随着

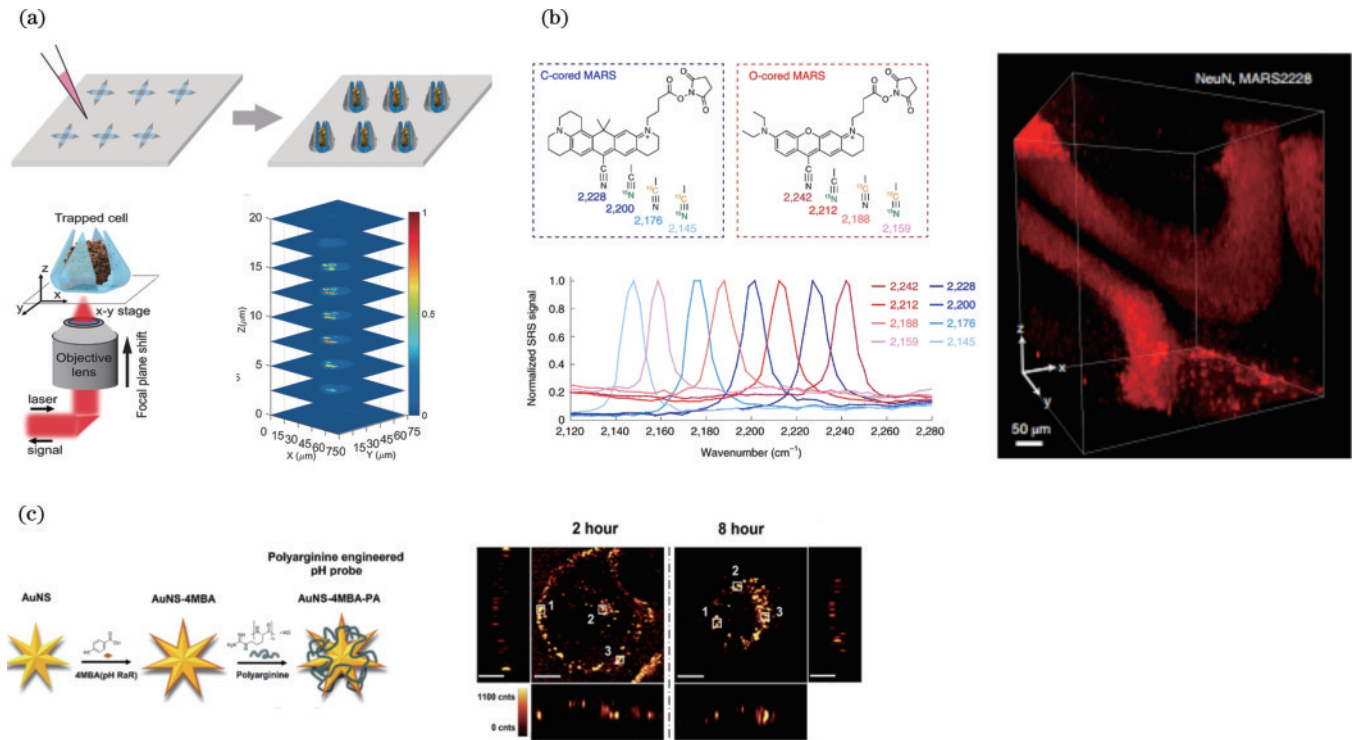


图 6 基于表面增强拉曼散射与拉曼标签的三维拉曼显微成像技术。(a) MTSERS用于单个活细胞的三维表面分子图谱的方法示意图^[51]; (b) RADIANT中MARS探针的结构与Epr-SRS光谱以及经uDISCO清除的体积免疫Epr-SRS成像^[58]; (c) SERS pH探针合成以及三维SERS图像^[53]

Fig. 6 3D Raman microscopic imaging technology based on surface-enhanced Raman scattering and Raman tags. (a) Schematic for 3D surface molecular mapping of a single living cell by using MTSERS^[51]; (b) structure and Epr-SRS spectra of MARS probe in RADIANT and volumetric immune Epr-SRS imaging cleared by uDISCO^[58]; (c) SERS pH probe synthesis and 3D SERS images^[53]

技术的进步,未来能够应用到更多的领域中。

2.3.2 基于拉曼标签的三维拉曼显微成像技术

细胞的生物学功能是由具有生物活性的小分子的作用调节的。因此,生物活性小分子的分布是阐明其功能机制的重要信息。然而,由于小分子的拉曼信号和来自本征生物分子的背景拉曼信号的重叠,在生物体内小分子的特定拉曼检测一直具有挑战性^[6]。为了解决这个问题,增强检测小分子物质的特异性与灵敏度,研究人员为生物系统的拉曼成像设计了各种振动标签,包括氘、腈、炔、超多重拉曼染料等。而这些标签具有共同的特征,首先在细胞中几乎不存在,其次是一种微小的结构,可以最大程度减少标记分子性质的改变。最后这些探针主要基于细胞拉曼静默光谱窗口(1800~2700 cm^{-1})中具有特征振动频率的化学键,从而可以提供理想的检测特异性和灵敏度,并且具有更大的拉曼散射截面以产生强信号^[6,29],目前已经广泛用于在生理和病理条件下对细胞、组织和生物体中蛋白质、脂质、DNA、胆固醇等物质的三维可视化^[54]。

目前已经有许多同位素与基于三键的标签被相继开发,用于拉曼成像。其中,这些外源性标签除了能够实现标记生物分子的空间分布外,还可以揭示标记物种在细胞代谢中的周转,提供额外的时间信息,这些在传统的拉曼显微镜中是无法实现的。2014年,Wei等^[55]通过利用受激拉曼散射显微镜的高灵敏度追踪小鼠组织中携带炔标记的药物,药物经代谢掺入炔标记的小前体,可视化DNA、RNA、蛋白质、磷脂和甘油三酯的从头合成,证明该技术的可行性。最近,Horgan等^[56]提出了一种基于拉曼光谱和代谢标记的2D和3D细胞外囊泡(EVs)的同时定量体外成像和分子表征的新策略,通过多种氘标记分子与EVs代谢的结合,实现体外EVs分布的同时定量拉曼光谱可视化,以及溶液和体外EVs的全面分子表征。除了实现对单个分子的体积可视化外,同时以高空间分辨率与时间分辨率可视化大量分子,允许对复杂系统的结构、功能和动力学进行系统的理解,但是由于荧光光谱固有的较宽线宽以及无特征性,将能够分辨颜色的数量限制到2~5种,所以在生物条件下以高选择性和灵敏度对多种分子进行成像仍然具有挑战性^[57,29]。最近,许多研究小组通过利用SRS显微镜的高灵敏度,以及拉曼散射成像的窄带宽以及特异性,开发多重拉曼染料,从而打破荧光显微镜的颜色屏障,实现对细胞与组织中数10种物质的直接成像。Shi等^[58]利用拉曼光谱的窄光谱的优势,通过将拉曼染料与组织清除方法相结合(RADIANT),在电子预共振SRS显微镜中可以实现一次性在毫米厚的大脑切片中对多达11个目标的成像,与之前的多重蛋白质成像方法相比,成像深度扩展了10~100倍,并进一步证明该方法在小脑发育过程中提取系统信息的实用性,包括区域分割、空间相

关性、细胞组成、3D距离和网络拓扑,其方法以及实验结果如图6(b)所示。

综上所述,拉曼标签与SRS的结合已经成为研究生命科学的一个重要工具,可以为疾病诊断等提供新的理解。相信随着拉曼标签的发展,以及仪器与算法的进步,其能够进一步提高灵敏度、特异性及多路复用能力,应用到更多小分子检测的领域中。

3 三维拉曼显微成像技术应用

目前基于不同技术的三维拉曼显微成像已用于生物学及其他各个领域,相比于传统的二维拉曼显微成像技术,能够更加系统、全面地理解生物样本的动态活动以及样本的分子组成,在细胞生物学、发育生物学、药理学等领域具有广阔的应用。

3.1 在细胞生物学中的应用

在生物学相关的三维细胞培养环境中同时对多种生物分子成像的能力将大大有助于理解复杂的细胞机制和细胞与材料的相互作用。传统的方法是利用共聚焦荧光方法,但需要进行标记,这可能严重影响细胞功能与细胞内化过程。而基于振动光谱的拉曼显微成像能够在没有标记的情况下进行研究,并且不需要对样本进行精细的预处理步骤,因此可以在自然状态下研究细胞,避免对细胞的影响。Kallepitis等^[60]提出了一个无标记定量体积拉曼成像的计算框架,通过对人类多能干细胞及其心脏衍生物、常规细胞培养系统中的单核细胞和单核细胞衍生的巨噬细胞,提供三维细胞培养环境的仿生水凝胶中的间充质干细胞进行成像,展示了细胞形状、细胞质、细胞核、脂质体和细胞骨架结构的精细细节在三维中的可视化和量化,结果表明该框架具有极好的生物分子特异性,其实验结果如图7(a)所示。Kim等^[59]利用共聚焦拉曼散射显微镜分析球体中三维细胞的分化,发现含有各种营养物质和分化因子的培养基的扩散对确定干细胞球体三维分化的变化至关重要。最近,随着SRS显微镜和拉曼标签的发展,可视化小分子在细胞中的分布成为可能,如DNA与蛋白质等物质的代谢与动力学。Lu等^[60]展示了一种使用受激拉曼散射显微镜的无标记DNA成像方法,该方法能够以亚细胞分辨率对动物和完整新鲜人类组织中的细胞核进行成像,并揭示了细胞周期不同阶段的染色体动力学,其实验结果如图7(b)所示。除了利用SRS显微镜的固有灵敏性外,Hu等^[61]通过利用超多重Carbow探针,在活体HeLa细胞中证明了亚细胞结构的10色成像,包括线粒体、溶酶体、内质网、脂滴、质膜、高尔基体、微管、肌动蛋白和细胞核,该技术可以促进对生理和疾病条件下细胞器间接触和相互作用的研究。

3.2 在发育生物学中的应用

生物体的发展涉及活跃的新陈代谢和增强的生物合成,对理解代谢疾病至关重要。目前已经开发了多种三维拉曼成像的方法和成像探针,用于研究生物发

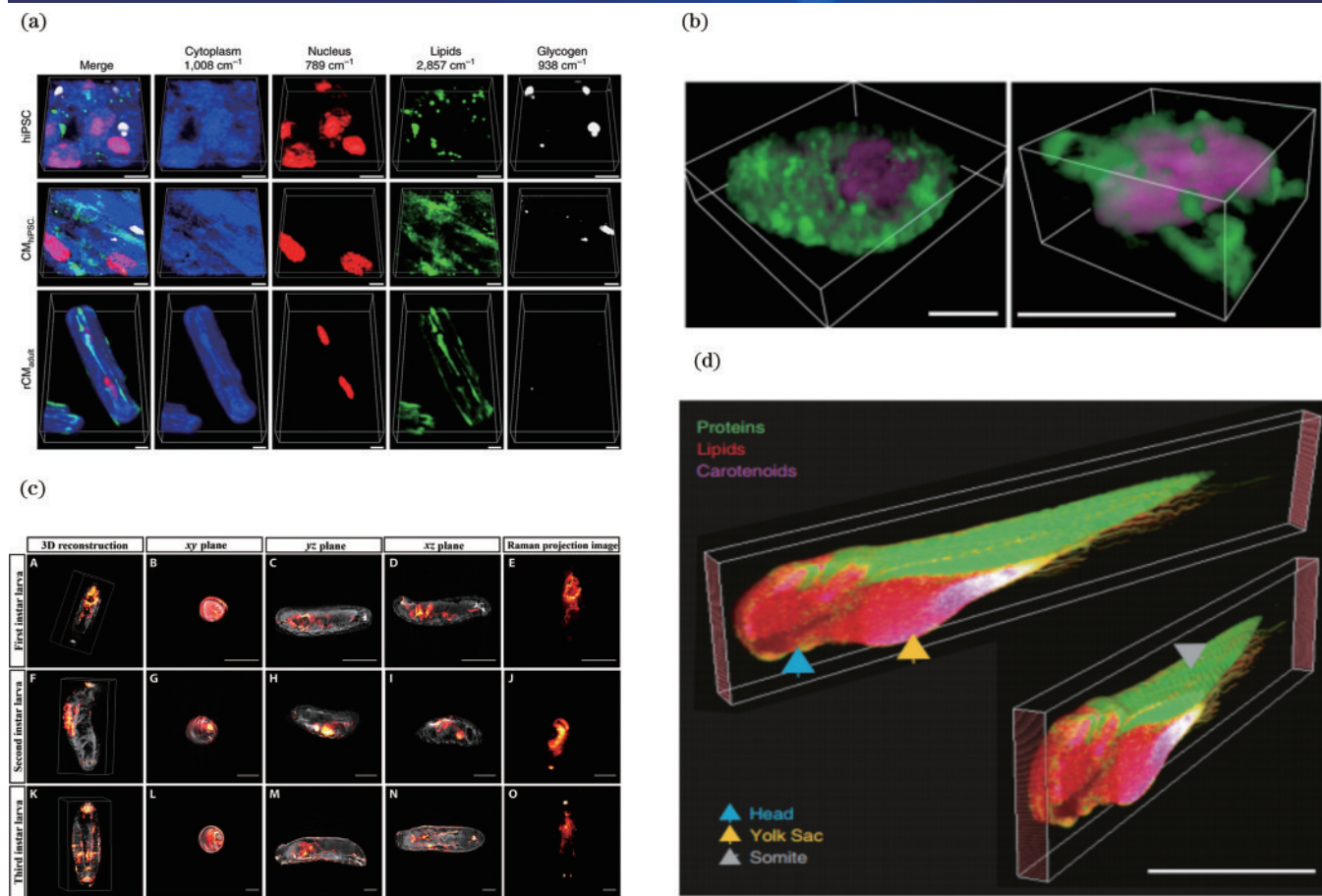


图7 在细胞学与发育生物学中的应用。(a) hiPSC 以及衍射 CMs 细胞不同成分的三维成像结果^[10]；(b) 细胞和组织中 DNA (品红色)和脂质(绿色)的 3D 共分布图像^[60]；(c)黑腹果蝇不同发育阶段的脂肪体成像^[25]；(d)整个斑马鱼胚胎的体积共焦拉曼光谱成像^[11]

Fig. 7 Applications in cytology and developmental biology. (a) 3D images of hiPSC and different components of diffractive CMs cells^[10]; (b) 3D co-distribution images of DNA (magenta) and lipids (green) in cells and tissues^[60]; (c) adipose body images of *Drosophila melanogaster* at different developmental stages^[25]; (d) volumetric confocal Raman spectral images of the entire zebrafish embryo^[11]

育过程中的蛋白质和脂质代谢以及分子组成,包括秀丽隐杆线虫、斑马鱼和果蝇等。Chen 等^[62]通过使用高光谱受激拉曼散射显微镜,在秀丽隐杆线虫中发现了以前未知的类视黄醇细胞质储存。根据类视黄醇的时间动态,发现它们对应的拉曼峰信号强度与脂肪存储的水平呈正相关。同时,为了更好检测生物的发育,研究人员将重水(D₂O)检测与受激拉曼散射显微镜相结合,用于研究秀丽隐杆线虫种系发育中的脂质合成及小鼠大脑发育中的髓鞘形成,并通过该方法观察了斑马鱼的胚胎发生,其在胚胎细胞分裂过程中显示出比脂肪生成快得多的蛋白质合成速率^[63]。除了使用秀丽隐杆线虫研究脂质的代谢外,果蝇、斑马鱼等生物也被用来研究复杂的生物过程与疾病机制。2012年,Yu 等^[64]通过受激拉曼散射显微镜实现对斑马鱼脊索结构的化学分析,并与 CARS 图像进行对比,两种方法都能够重建出分辨率优于 1 μm 的脊索的三维结构。虽然目前很多方法都能够实现对生物模型样本的三维无标记化学成像,但是没有在不损害胚胎完整性的

情况下获取整个样本的复杂体积的分子组成信息。基于此,Høgset 等^[11]通过使用共焦拉曼光谱成像对从未标记的斑马鱼胚胎中提取的生物分子信息进行可视化,生成了整个斑马鱼胚胎的三维图像,并采用多元成分分析来提取生物分子图谱,用于检测局部生物分子的异质性,其实验结果如图 7(d) 所示。最近,Wang 等^[25]利用搭建的基于无标记结构分子与体积成像的双模态光学拉曼投影断层扫描设备检测斑马鱼与拟南芥的生物分子组成,并探索了其在不同发育阶段以及大尺度下检测黑腹果蝇的脂肪体的潜力,为进一步探究果蝇的体内代谢活动提供了新的方法,其实验结果如图 7(c) 所示。

4 结论与展望

重点回顾了近年来用于生物样品快速三维拉曼成像的不同技术的实现方法以及研究进展,并对不同技术目前在细胞生物学、发育生物学等领域的应用进行总结。可以发现,基于不同策略的三维拉曼成像技术

适用于对成像速度、信号强度以及分辨率要求不同的样本,正确选择合适的成像技术对于获取样本信息组成以及分析具有至关重要的作用。此外,表面增强拉曼散射与拉曼标签技术的进步使得能够在复杂的生物系统中以高特异性和灵敏度观察生物分子的相互作用和分布。然而,这些技术仍然有望进一步得到优化发展。

首先,复杂的生物样本的检测需要更高成像速度、灵敏度、成像深度,模态融合可为此提供解决方案。例如,在 SRS 显微镜中,将共轭的超极化性增强与电子共振相结合,除了能够增强信号外,还能够在空间上调制电子预共振的条件,打破衍射极限^[29]。其次,系统可与其他物理过程相耦合,如光热显微镜^[65-66]、光学相干断层扫描^[67]、光诱导力显微镜^[68]等,进一步提升速度和灵敏度,增大成像深度。例如,在受激拉曼光热显微镜中,SRS 已成功地与光热显微镜相耦合,通过探测激光束的折射率变化,将激光调制深度提高到 500 倍以上,并通过对病毒颗粒、细胞与组织的成像证明该系统的能力^[65]。此外,相干拉曼散射显微镜在成像速度与灵敏度上优于自发拉曼散射显微镜,受限于设备复杂性及成本,极大阻碍了在生物学中的进一步应用,随着方法的改进与使用廉价电子器件构建的高质量激光源的开发,相干拉曼散射显微镜的复杂度将逐步下降,可应用于一系列领域,如纳米制造、食品细菌检测、危险物品检测等。最后,深度学习和光学技术的发展与融合将会使基于不同策略的三维拉曼成像技术应用于生物系统中复杂的动态化学监测过程以及其他相关领域,可为产业化及临床应用开辟新的成像技术体系及方法。

参 考 文 献

- [1] Kubota S I, Takahashi K, Nishida J, et al. Whole-body profiling of cancer metastasis with single-cell resolution[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(1): 236-250.
- [2] Ma L, Li Y, Peng J Y, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration[J]. *Cell Research*, 2015, 25(1): 24-38.
- [3] Jonkman J, Brown C M, Wright G D, et al. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15: 1585-1611.
- [4] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [5] Katona G, Szalay G, Maák P, et al. Fast two-photon *in vivo* imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes[J]. *Nature Methods*, 2012, 9: 201-208.
- [6] Ando J, Palonpon A F, Sodeoka M, et al. High-speed Raman imaging of cellular processes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 33: 16-24.
- [7] Stewart S, Priore R J, Nelson M P, et al. Raman imaging[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2012, 5: 337-360.
- [8] Krafft C, Schie I W, Meyer T, et al. Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(7): 1819-1849.
- [9] Jones R R, Hooper D C, Zhang L W, et al. Raman techniques: fundamentals and frontiers[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2019, 14(1): 231.
- [10] Kallepitis C, Bergholt M S, Mazo M M, et al. Quantitative volumetric Raman imaging of three dimensional cell cultures[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14843.
- [11] Høgset H, Horgan C C, Armstrong J P K, et al. *In vivo* biomolecular imaging of zebrafish embryos using confocal Raman spectroscopy[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6172.
- [12] Rocha-Mendoza I, Licea-Rodriguez J, Marro M, et al. Rapid spontaneous Raman light sheet microscopy using cw-lasers and tunable filters[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(9): 3449-3461.
- [13] Oshima Y, Sato H, Kajiura-Kobayashi H, et al. Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope[J]. *Optics Express*, 2012, 20(15): 16195-16204.
- [14] Müller W, Kielhorn M, Schmitt M, et al. Light sheet Raman micro-spectroscopy[J]. *Optica*, 2016, 3(4): 452-457.
- [15] Subedi N R, Yaraghi S, Jung P S, et al. Airy light-sheet Raman imaging[J]. *Optics Express*, 2021, 29(20): 31941-31951.
- [16] Dunn L, Luo H K, Subedi N R, et al. Video-rate Raman-based metabolic imaging by Airy light-sheet illumination and photon-sparse detection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(9): e2210037120.
- [17] McCullough E C, Payne J T. X-ray-transmission computed tomography[J]. *Medical Physics*, 1977, 4(2): 85-98.
- [18] Fauver M, Seibel E, Rahn J R, et al. Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography[J]. *Optics Express*, 2005, 13(11): 4210-4223.
- [19] Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, et al. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 541-545.
- [20] Luo X Q, Yu W, Wang C X. An image reconstruction method based on total variation and wavelet tight frame for limited-angle CT[J]. *IEEE Access*, 2017, 6: 1461-1470.
- [21] Heck L, Herzen J. Recent advances in X-ray imaging of breast tissue: from two- to three-dimensional imaging[J]. *Physica Medica*, 2020, 79: 69-79.
- [22] Tamminen I, Lehto K, Hannula M, et al. A tube-source X-ray microtomography approach for quantitative 3D microscopy of optically challenging cell-cultured samples

- [J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 548.
- [23] Schulmerich M V, Cole J H, Dooley K A, et al. Noninvasive Raman tomographic imaging of canine bone tissue[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(2): 020506.
- [24] Demers J L H, Davis S C, Pogue B W, et al. Multichannel diffuse optical Raman tomography for bone characterization *in vivo*: a phantom study[J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(9): 2299-2305.
- [25] Wang N, Wang X Y, Yan T Y, et al. Label-free structural and functional volumetric imaging by dual-modality optical-Raman projection tomography[J]. *Science Advances*, 2023, 9(12): eadf3504.
- [26] Li S W, Li Y P, Yi R X, et al. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy and its applications[J]. *Frontiers in Physics*, 2020, 8: 598420.
- [27] Cheng J X, Xie X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [28] 敖建鹏, 黄静, 季敏标. 受激拉曼散射显微技术及其应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(4): 0400001.
- Ao J P, Huang J, Ji M B. Stimulated Raman scattering microscopy and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(4): 0400001.
- [29] Hu F H, Shi L X, Min W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16: 830-842.
- [30] 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.
- [31] Lin P, Ni H L, Li H T, et al. Volumetric chemical imaging *in vivo* by a remote-focusing stimulated Raman scattering microscope[J]. *Optics Express*, 2020, 28(20): 30210-30221.
- [32] Bi Y L, Yang C, Chen Y G, et al. Near-resonance enhanced label-free stimulated Raman scattering microscopy with spatial resolution near 130 nm[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 81.
- [33] Gong L, Zheng W, Ma Y, et al. Higher-order coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy realizes label-free super-resolution vibrational imaging[J]. *Nature Photonics*, 2020, 14: 115-122.
- [34] Jang H, Li Y J, Fung A A, et al. Super-resolution SRS microscopy with A-PoD[J]. *Nature Methods*, 2023, 20: 448-458.
- [35] Qian C X, Miao K, Lin L E, et al. Super-resolution label-free volumetric vibrational imaging[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3648.
- [36] Shi L X, Klimas A, Gallagher B, et al. Super-resolution vibrational imaging using expansion stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(20): e2200315.
- [37] Wei M, Shi L Y, Shen Y H, et al. Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(14): 6608-6617.
- [38] 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: e265.
- [39] 吴凡, 李商羽, 洪维礼, 等. 高光谱相干拉曼散射技术及其应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617003.
- Wu F, Li S Y, Hong W L, et al. Hyperspectral coherent Raman scattering and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617003.
- [40] Fu D, Lu F K, Zhang X, et al. Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(8): 3623-3626.
- [41] Camp Jr C H, Lee Y J, Heddleston J M, et al. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8: 627-634.
- [42] Ozeki Y, Umemura W, Otsuka Y, et al. High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6: 845-851.
- [43] Shi K B, Li H F, Xu Q, et al. Coherent anti-Stokes Raman holography for chemically selective single-shot non-scanning 3D imaging[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(9): 093902.
- [44] Heuke S, Rigneault H, Sentenac A. 3D-coherent anti-Stokes Raman scattering Fourier ptychography tomography (CARS-FPT)[J]. *Optics Express*, 2021, 29(3): 4230-4239.
- [45] Fantuzzi E M, Heuke S, Labouesse S, et al. Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using random illuminations[J]. *Nature Photonics*, 2023, 17: 1097-1104.
- [46] Chen X L, Zhang C, Lin P, et al. Volumetric chemical imaging by stimulated Raman projection microscopy and tomography[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15117.
- [47] Chen X L, Zhu S P, Wang H Y, et al. Accelerated stimulated Raman projection tomography by sparse reconstruction from sparse-view data[J]. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 2020, 67(5): 1293-1302.
- [48] Gong L, Zheng W, Ma Y, et al. Saturated stimulated-Raman-scattering microscopy for far-field super-resolution vibrational imaging[J]. *Physical Review Applied*, 2019, 11(3): 034041.
- [49] McAughtrie S, Lau K, Faulds K, et al. 3D optical imaging of multiple SERS nanotags in cells[J]. *Chemical Science*, 2013, 4(9): 3566-3572.
- [50] Vantasin S, Ji W, Tanaka Y, et al. 3D SERS imaging using chemically synthesized highly symmetric nanoporous silver microparticles[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2016, 55(29): 8391-8395.
- [51] Jin Q R, Li M, Polat B, et al. Mechanical trap surface-enhanced Raman spectroscopy for three-dimensional surface molecular imaging of single live cells[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2017, 56(14): 3822-3826.
- [52] Jimenez de Aberasturi D, Henriksen-Lacey M, Littl L, et al. Using SERS tags to image the three-dimensional structure of complex cell models[J]. *Advanced Functional*

- Materials, 2020, 30(14): 1909655.
- [53] Zhang Y Z, Jimenez de Aberasturi D, Henriksen-Lacey M, et al. Live-cell surface-enhanced Raman spectroscopy imaging of intracellular pH: from two dimensions to three dimensions[J]. ACS Sensors, 2020, 5(10): 3194-3206.
- [54] Zhao Z L, Shen Y H, Hu F H, et al. Applications of vibrational tags in biological imaging by Raman microscopy[J]. The Analyst, 2017, 142(21): 4018-4029.
- [55] Wei L, Hu F H, Shen Y H, et al. Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering[J]. Nature Methods, 2014, 11: 410-412.
- [56] Horgan C C, Nagelkerke A, Whittaker T E, et al. Molecular imaging of extracellular vesicles *in vitro* via Raman metabolic labelling[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2020, 8(20): 4447-4459.
- [57] Wei L, Chen Z, Shi L, et al. Super-multiplex vibrational imaging[J]. Nature, 2017, 544(7651): 465-470.
- [58] Shi L X, Wei M, Miao Y P, et al. Highly-multiplexed volumetric mapping with Raman dye imaging and tissue clearing[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40: 364-373.
- [59] Kim H, Han Y, Suhito I R, et al. Raman spectroscopy-based 3D analysis of odontogenic differentiation of human dental pulp stem cell spheroids[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(29): 9995-10004.
- [60] Lu F K, Basu S, Igras V, et al. Label-free DNA imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering microscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(37): 11624-11629.
- [61] Hu F H, Zeng C, Long R, et al. Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes[J]. Nature Methods, 2018, 15: 194-200.
- [62] Chen A J, Li J J, Jannasch A, et al. Fingerprint stimulated Raman scattering imaging reveals retinoid coupling lipid metabolism and survival[J]. Chemphyschem, 2018, 19(19): 2500-2506.
- [63] Shi L Y, Zheng C G, Shen Y H, et al. Optical imaging of metabolic dynamics in animals[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2995.
- [64] Yu Z L, Chen T, Zhang X N, et al. Label-free chemical imaging *in vivo*: three-dimensional non-invasive microscopic observation of amphioxus notochord through stimulated Raman scattering (SRS)[J]. Chemical Science, 2012, 3(8): 2646-2654.
- [65] Zhu Y F, Ge X W, Ni H L, et al. Stimulated Raman photothermal microscopy toward ultrasensitive chemical imaging[J]. Science Advances, 2023, 9(43): eadi2181.
- [66] Zhang D L, Li C, Zhang C, et al. Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution[J]. Science Advances, 2016, 2(9): e1600521.
- [67] Robles F E, Zhou K C, Fischer M C, et al. Stimulated Raman scattering spectroscopic optical coherence tomography[J]. Optica, 2017, 4(2): 243-246.
- [68] Tamma V A, Beecher L M, Shumaker-Parry J S, et al. Detecting stimulated Raman responses of molecules in plasmonic gap using photon induced forces[J]. Optics Express, 2018, 26(24): 31439-31453.