

免疫光子学进展

骆清铭^{1,2} 张智红^{1,2}

¹ 武汉光电国家实验室(筹)-华中科技大学 Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 湖北 武汉 430074
² 华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要 光学分子成像是在复杂生物体中同时描述多种分子和细胞功能的最佳手段。作为机体发挥防御、监视和自稳功能的免疫系统,研究者们正面临着如何将其作为一个真正的系统来研究的挑战。免疫光子学是指基于光子学原理和方法的活体免疫光学成像和免疫光子治疗。以多光子激发显微成像和光声层析成像为代表的高时空分辨活体成像技术,以荧光蛋白为代表的活体长时程标记方法,使得光学分子成像成为引导免疫学研究走向系统化与可视化道路的主力军。本文从免疫学的特点出发,介绍活体光学成像技术和分子探针的发展,综述其在免疫学研究中的应用,并展望免疫光子学今后的发展方向。

关键词 生物光学;光子学;免疫;成像;探针

中图分类号 O63 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201131.0900114

Progress in Immunophotonics

Luo Qingming^{1,2} Zhang Zhihong^{1,2}

¹ Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for

Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

² Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

Abstract Optical molecular imaging is the best approach to monitor multiple molecule events and cell functions simultaneously in complex organisms. Since immune system provides defense, surveillance and self-stabilizing functions for lives, the major challenge for researchers is to consider immune system as a system. Immunophotonics refers to *in vivo* immune optical imaging (Immuno-Optimaging) and immune photonic therapy (Immuno-Phototherapy) based on the principle and method of photonics. The combination of *in vivo* optical imaging with high spatio-temporal resolution, such as multi-photon excitation microscopy and photoacoustic tomography, and intravital long-term labeling method based on fluorescent proteins, makes optical molecule imaging be the main force of guiding immunologists to embrace the era of systematization and visualization. Here, based on the characteristics and needs of immunology, we introduce the latest development of *in vivo* optical molecular imaging and molecular probes, review the applications of those techniques and methods in immunology research, and further discuss the prospect of the future development of immunophotonics.

Key words biotechnology; photonics; immunity; imaging; probe

OCIS codes 170.2655; 170.3880

1 引 言

Science 在 2005 年发表专题,列举了人类尚待解决的 125 个科学问题^[1],6 个免疫相关的问题位列其中,可见免疫学研究的重要性。免疫光子学

(Immunophotonics) 包括活体免疫光学成像 (Immuno-Optimaging) 和免疫光子治疗 (Immuno-Phototherapy)。随着光学分子成像技术和分子探针的快速发展,活体免疫光学成像受到了免疫学家

收稿日期: 2011-08-02; **收到修改稿日期**: 2011-08-12

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(2011CB910401)和新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0220)资助课题。

作者简介: 骆清铭(1966—),男,博士,教授,主要从事信息光电子学与生物医学交叉的学科——生物医学光子学等方面的研究。E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn(中国光学学会会员号:S040111043S)

和信息学家们的高度关注,已用于感染^[2]、肿瘤^[3]和移植^[4]等刺激条件下免疫细胞的运动、迁移和相互接触等动态信息的获取,为免疫应答和免疫治疗过程的直观呈现和机理的系统性解析提供了非常有价值的研究手段^[5]。免疫光子治疗也刚刚展现出其临床应用前景。本文将从免疫学问题及其对技术手段的需求出发,叙述以多光子激发显微成像和光声层析成像为代表的活体高分辨光学分子成像技术,及与之相适应的光学分子探针和标记方法的发展。介绍活体免疫光学成像在免疫学研究中的应用,并对免疫光子学今后的发展方向予以展望。

2 活体动态成像将引导免疫学问题真正走向系统化研究

作为机体发挥防御、监视和自稳功能的免疫系统,其功能异常会导致传染性疾病(如艾滋病、结核等)、重症自身免疫性疾病和恶性肿瘤等重大疾病的发生。机体免疫的根本是免疫应答,即通过免疫细胞对抗原的识别与提呈、免疫细胞自身的活化、进而发挥效应等一系列连续过程而实现。机体中几乎所有的免疫细胞都是可移动的,信息在受刺激细胞与成千上万其他细胞的接触中快速地传递与改变,激活与分化的免疫细胞在不同组织器官之间迁移。免疫应答相关分子(如蛋白质)的表达、空间转位与相互作用等功能信息也是瞬息万变,在不同微环境中的功能具有时效性和差异性。因此,免疫应答可看做是刺激触发的大量免疫分子和不同类型细胞在时空上的信息整合,免疫系统实质上是信息系统。

20世纪生物化学和分子生物学的蓬勃发展,以及显微成像和流式细胞检测技术的广泛应用,使得人们对生命活动过程的认识从早期宏观水平的描述,上升到目前微观水平的分析。免疫学家们已获得了大量有关免疫分子的结构与功能信息,鉴定了很多重要的免疫细胞类型及其功能,极大地推动了免疫学研究进程。然而,无论是体外分离纯化的蛋白质,还是体外培养的细胞或细胞网络,都不可能真实地模拟生物活体内的精细组成结构和生理或病理环境,由体外研究所获得的大量生物分子和细胞的功能信息,亟待活体内动态研究与确证。基于模式动物的静态节点的研究方法只适合对免疫系统当前状态的判断,却无法告诉我们这些状态环节之间是如何衔接与发展的。研究者们正面临着如何将免疫系统作为一个真正的系统来研究的挑战^[6]。

近10年来迅速发展的分子成像技术,展现了其在生命科学研究领域的巨大潜力,吸引着免疫学家们也开始涉足活体分子成像领域。分子成像技术和方法的发展,有望阐明在刺激诱导的免疫应答过程中,众多种类的免疫细胞是如何迁移、募集与相互接触的,信息是如何在免疫系统中级联放大、传递与整合的,最终机体将输出何种免疫状态(免疫耐受或免疫反应)。这就需要分子成像技术和方法在活体免疫成像方面具备以下能力:1)高时空分辨的三维成像;2)多分子与细胞事件的并行检测;3)长时程动态监测;4)跨层次多尺度(从亚微米到厘米)的系统性观察。

3 光学分子成像

自21世纪初以来,分子成像领域的迅速发展,为非侵入性可视化观察活体内的分子事件提供了有效的研究手段。光学成像技术具有高灵敏度、高时间与空间分辨率、多参数检测和低损伤等特点。光学分子探针种类繁多、携带信息丰富(强度、光谱、寿命、偏振、吸收和散射)。光学分子探针与光学成像技术相结合,使得光学分子成像在多分子并行检测方面具有独特的优势,是在复杂生物体中同时描述多种生物分子和细胞功能的最佳手段。以多光子激发显微成像和光声层析成像为代表的成像技术的发展,拉开了活体内高分辨成像的序幕。以荧光蛋白、有机染料和无机纳米颗粒为基础的标记技术和特异分子探针的发展,为活体光学分子成像提供了色彩斑斓、功能特异的光学信号。光学分子成像已在神经科学、肿瘤学、免疫学等多学科研究领域展示了其应用价值,使得生物学家们在活体内动态追踪靶细胞、鉴定特定基因的表达、监测分子的运动与互作、并行检测多分子与细胞事件,已不再是遥不可及。

3.1 活体高时空分辨的多光子激发显微成像

1990年,Denk等^[7]将飞秒激光技术首次引入到光学显微成像中,发明了多光子激发扫描显微成像系统,从而引发了活体内高分辨显微成像研究生命活动过程的革新,由于同时具有高空间分辨率和一定的组织探测深度,是目前最常用的活体分子成像技术之一,也是迄今为止活体分子成像领域中时间和空间分辨率最高的技术^[8]。多光子显微成像技术早先主要是应用于神经科学的研究中,为在分子水平探索哺乳动物脑皮层活动过程、学习记忆机理、神经系统疾病发生机制提供了强大的工具。尤其在

神经突触的信息整合、神经元与胶质细胞间的网络调节、神经系统疾病(如老年痴呆症)的发生发展及对邻近神经元网络的影响、脑疾病的药物治疗结果评价等诸多方面,发挥着不可替代的作用^[9]。在免疫学研究方面,Miller等^[10,11]在国际上最早应用多光子显微成像技术开展活体组织内免疫细胞的运动、迁移和相互接触的动态成像研究,为免疫学家们开辟了一条解决问题的新道路。

与单光子激发荧光显微成像(如宽场荧光成像、共聚焦荧光显微成像等)相比,多光子荧光显微成像技术由于使用700~1000 nm的近红外光源,在该波长范围内生物样品对激发光的散射影响较小,使得多光子激发荧光显微成像的探测深度明显加大(从50 μm 增加到约500 μm)。此外,多光子激发产生的荧光信号强度与激发光强呈平方依赖关系,使得多光子激发只发生在焦点处,而无焦点外荧光,极大地降低了背景荧光的影响,不需要共聚焦小孔即可达到极高的纵向分辨率,大大提高了信号收集效率。高度局域化的多光子激发还可以避免焦点外样品的光漂白和光损伤。因此,双光子荧光显微成像可以对生物样品,尤其是厚组织样品,实现非侵入性、低损伤的三维高分辨荧光成像,可用于活体内长时程(数天至数月)动态观察生命活动过程^[12,13]。

分子成像技术的更高时间和空间分辨率,是研究者们不断追求的创新目标。毫秒级时间分辨率的光学分子成像技术,是生命科学家们梦寐以求的可用于生物活体内快速分子事件研究的重要手段^[9]。但是,在提高成像时间分辨率的同时,人们并不希望牺牲成像的空间分辨率和探测灵敏度。因此,基于声光偏转原理的无惯性扫描技术获得了热切关注。Li等^[14,15]在该领域进行了开创性工作,建立了飞秒激光快速随机扫描双光子显微成像新技术,使得像素随机寻址速率提高了两个数量级(由1 ms/pixel缩短至小于0.01 ms/pixel),满足了活体内测量细胞网络快速活动模式的要求。然而,飞秒激光Z方向无惯性扫描是一个非常困难的问题,对于活体内三维成像信息的快速获取,尚需进一步完善与发展三维随机扫描多光子显微成像新原理、新技术与新方法,为开展更高层次的生物功能机制研究提供更加有力的手段。

3.2 高分辨光声成像技术及其多尺度测量

荧光分子层析成像(FMT)、扩散光学层析成像(DOT)和光学弱相干层析成像(OCT)等光学成像技术的发展,使得活体内动态监测生理过程或病理

状态下的分子事件成为可能,为生命科学的新发现和疾病的早期诊断提供了重要手段。然而,由于光在生物组织中传播时的散射特性,常用的活体高分辨光学成像技术——多光子显微成像和OCT的成像深度很难超过光学成像的“软极限”(约1 mm)。FMT和DOT虽然可实现10 cm深度的活体内分子成像,但其成像空间分辨率不高(仅毫米级)。近年来光声成像的迅速发展,标志着生物医学影像领域的一次重大技术革新。光声成像技术结合了光学成像高对比度和超声成像高穿透深度的优点,从原理上避开了光散射的负面影响,其成像深度已突破了光学准弹道光区域的成像“软极限”,是高分辨光学成像技术中唯一有望突破深度“硬极限”(5 cm)的技术^[16]。

2003年Wang等^[17]应用光声成像清晰地探测到活体小鼠脑血管分布,获得了脑实质病损的清晰图像。2006年Zhang等^[18]研制的光声显微成像系统在成像深度大于3 mm时,横向与纵向分辨率分别达45和15 μm 。2008年研制的一套近红外光声成像系统,成像深度达3 cm,纵向和横向分辨率分别达到144和560 μm ^[19]。同年,采用光学聚焦扫描的方式实现了5 μm 横向分辨率的高分辨显微成像,得到了单根毛细血管的光声图像,可有效分辨单个红细胞^[20]。2010年,光声成像技术在高分辨成像上实现了突破,分辨率由微米级迈进到亚微米尺度,达到200 nm的横向分辨率^[21]。2007年,Yang等^[22]利用光声成像技术进行了人体前臂血管成像、脑皮层血流和血氧状态变化的功能与代谢成像、肿瘤早期新生血管生成检测与治疗监控等方面的研究,在活体上获得了几十微米分辨率的清晰光声图像。

由此可见,光声成像技术已具备从分子(亚微米)、毛细血管(几个微米)到人体组织(几个厘米)跨层次多尺度的活体分子成像能力,在活体内同步获取组织器官的功能、代谢与蛋白质分子等多源信息方面,也具有独特的优势^[23,24]。此外,光声成像测量的是光吸收率,理论上能与测量散射、荧光和偏振的光学成像技术相融合,有望形成一套集组织结构和蛋白质与细胞功能于一体的活体高分辨深度层析成像系统。

3.3 光学分子探针和多色标记方法的发展及其在活体小动物成像中的应用

光学分子探针一直是与光学成像技术相辅相成、同步发展的。光学分子探针主要包括化学小分

子探针、纳米颗粒和遗传编码型分子探针等。发光纳米颗粒亮度高,但体积较大。相对而言,化学小分子探针由于其体积小而对生物分子功能的干扰小,在生命科学研究中发挥着重要作用。基于荧光蛋白的遗传编码型分子探针^[25],由于其准确的亚细胞定位能力、良好的生物相容性以及光学信号(荧光蛋白)不会随着细胞的分裂而减少等特点,使得在活细胞和活体内长时程(数天至数月)动态监测蛋白质分子事件成为可能。不同类型光学分子探针和多元化标记方法的联合使用,是实现活体内多分子事件同步光学标记的必然选择。

3.3.1 多光子成像探针

常用荧光探针的多光子激发效率很低,必须依靠强激发来获得足够的信噪比,容易引起探针的荧光饱和、光漂白和生物样品光损伤等诸多问题,因此减少了样品的可观测时间,并可能导致样品非生理性的功能与形态改变。目前,多光子荧光探针的研究还只停留在设计和制备具有高多光子激发效率的有机染料分子方面^[26,27]。针对生物成像中亟需解决的对比度、特异性、光稳定性和生物相容性等问题,设计高性能的多光子荧光化学小分子探针并将其应用到活体成像,这方面的工作目前还非常缺乏^[28]。常用于活体免疫光学成像的荧光染料只有两种,CFSE和CMTMR^[10]。常用的一些荧光蛋白及其突变体(如CFP,GFP,YFP和RFP)均具有较高的多光子吸收截面^[29]。多光子激发显微成像与荧光蛋白标记的转基因动物模型相结合,已广泛地应用于神经、肿瘤和免疫的活体光学成像研究。新近发展的深红和近红外荧光蛋白,如mKate^[30],mLumin^[31]和IFP^[32],显著提升了活体成像的深度信息获取能力。此外,光活化或光转换荧光蛋白的不断优化,为活细胞内的蛋白质扩散运动研究和活动物体内细胞的迁移追踪提供了非常有效的标记方法^[33~35],也为超高分辨光学成像提供了高性能的光学标记物^[36,37]。进一步研制亮度高、斯托克斯位移大、双光子吸收截面大、光活化或光转换速度快、光谱更丰富的深红或近红外荧光蛋白,是荧光蛋白应用于活体光学成像的重要发展方向^[38]。

3.3.2 光声成像探针

金纳米颗粒由于其良好的吸收特性和生物相容性,是目前应用最广泛的光声成像探针,在其表面偶联靶向性的抗体或多肽后,可用于肿瘤特异性分子的光声成像研究。用于光声成像的还有有机染料(伊文斯蓝、亚甲蓝和ICG等)和碳纳米管等。在遗

传编码型分子探针方面,2009年Razansky等^[39]开创了荧光蛋白应用于光声成像的先河,以唾液腺中表达eGFP的果蝇蛹和椎骨中表达mCherry的斑马鱼为研究对象,实现了活体内的光声成像。目前,可用于光声成像的探针种类极少,尤其是缺少具有良好光声成像性能的遗传编码型探针,是制约光声成像在活体分子或细胞事件研究中应用的主要因素。研制高性能的光声成像对比剂,是活体光声成像广泛应用的前提。

3.3.3 活细胞和活体内多种蛋白质同步光学标记

2004年Hutter^[40]用荧光蛋白突变体CFP,GFP,YFP,DsRED和荧光染料DiD,分别标记了线虫的四类神经元,实现了活体模式动物的五色荧光显微成像。2006年Kogure等^[41]获得了一个具有很大斯托克斯位移的荧光蛋白突变体mKeima,联合使用CFP,mMiCy,EGFP,YFP和dKeima570等荧光蛋白,在活细胞内实现了单一波长激发下的六色荧光成像。多色标记方法中最有创意的工作当属2007年Livet等^[42]建立的“脑虹(brainbow)”多色荧光标记技术,为发育生物学和活体内细胞网络研究提供了独特的手段。Wu等^[43]提出的“后编码”技术,以小分子调控量子点荧光进行编码,是一种具有良好应用前景的多色荧光标记技术。Chu等^[31]在基于荧光蛋白的双分子荧光互补技术上取得了突破性进展,发展了基于深红荧光蛋白mLumin的双分子荧光互补系统,并与基于蓝色和黄色荧光蛋白的互补系统联合使用,在活细胞内实现了三对蛋白质间相互作用的同步可视化。由于该系统为深红色荧光互补系统,其光谱尤其适于小动物活体荧光成像,有望用于蛋白质-蛋白质相互作用的在体研究。

活体内多种分子与细胞事件的光学成像,对光学分子探针和成像技术均提出了更高要求。研制性能参数更优的光学分子探针,建立多元化的光学标记技术体系,提高光学成像系统的多源信号采集、提取与鉴别能力,是光学分子成像发展的必然方向。

4 光学成像在免疫学研究中的应用

近年来,多光子显微成像技术与基于荧光蛋白的遗传报告基因的发展,为免疫学家们提供了高时空分辨的活体研究手段,获得了一系列病原体与宿主之间的相互作用及其诱导的免疫应答的动态信息^[2]。

Zinselmeyer等^[44]选择以足垫为李斯特细菌的感染部位和非侵入性光学成像窗口,用2-MDa

Dextran-TMR 标记血管,研究荧光染料 CFSE 标记的中性粒细胞在足垫感染局部的迁移,揭示了在感染和慢性炎症条件下免疫细胞是如何参与不同化学信号诱导的免疫反应。Chtanova 等^[45]以 Lys-GFP 小鼠为动物模型,使用胞内寄生虫弓形虫感染小鼠耳翼的引流淋巴结,通过活组织双光子成像和冰冻切片组织分析,研究了表达绿色荧光蛋白(GFP)的中性粒细胞与表达红色荧光蛋白(RFP)的寄生虫之间的动态关系,发现了淋巴结内中性粒细胞入侵区域伴随着巨噬细胞消失的现象;Peters 等^[46]较细致地对 RFP 标记的利什曼原虫入侵 Lys-GFP 小鼠耳朵后,中性粒细胞的聚集行为及其对寄生虫的吞噬现象进行了动态观察和描述,发现抑制中性粒细胞可导致利什曼原虫的感染增强;McDonald 等^[47]以非炎症感染(如烧伤、冻伤和压伤等)损伤的 Lys-GFP 小鼠肝脏为研究对象,用 Alexa-647-BSA 标记血管,荧光染料碘化丙啶(PI)标记坏死的肝细胞,通过转盘式共聚焦活体显微镜经腹部窗口动态观察了肝脏组织中非炎症感染刺激下的中性粒细胞募集,并解析了其分子机理。Waite 等^[48]以 Lys-GFP 和 CD11c-YFP 杂交的小鼠为实验动物模型,将李斯特细菌经尾静脉感染小鼠,通过对活组织脾脏的多光子成像,动态研究了 DC 细胞和中性粒细胞的运动及其对细菌的吞噬过程,为理解脾脏组织在感染免疫中的作用提供了动态信息。除多光子激发和激光共聚焦显微成像技术外,光学分子层析成像技术也已用于感染免疫的研究,Larmann 等^[49]使用近红外荧光染料 DIR 体外分别标记中性粒细胞和单核细胞,过继转移到新宿主体内,三维定量分析了炎症感染诱导的尿激酶受体介导的白细胞迁移。

光学分子成像除在感染免疫的研究中发挥了重要作用外,在肿瘤免疫和移植免疫的研究中也展现了其独特的应用价值。然而,由于受限于实验动物模型及其成像部位的深度,大多数研究还只是针对肿瘤或移植物的引流淋巴结进行成像。针对肿瘤原位或移植原位活体光学成像较少报道。目前,已报道的在肿瘤微环境中动态光学成像的免疫细胞仅有三种,细胞毒性杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)^[50~52]、自然杀伤细胞(NK)^[53]和单核巨噬细胞(M ϕ)^[54]。而在肿瘤免疫中发挥重要功能的众多免疫细胞^[55],如树突细胞、调节性 T 细胞、肿瘤相关巨噬细胞和肥大细胞等,均未见活体动态成像的报道。近两年,光学分子成像技术也已用于移植免疫研究,在皮肤移植^[56]、胰岛移植^[57]和肺移植^[58]等动

物模型体内,研究了供体移植物与受体宿主的免疫细胞之间的动态关系与迁移过程。

5 展 望

近 10 年来,光学分子成像无论是在原理上还是在技术方法上都有较大的发展,可用于活体动态成像研究,能更直观、更准确地描述复杂生物体内的分子与细胞事件,为机体免疫应答这一系统行为的研究提供了有效手段。然而,活体内蛋白质分子相互作用构成的复杂调控网络、细胞所处微环境的动态变化与跨组织器官迁移以及分子-细胞-组织-器官-整体多个层次的功能信息表征,都对光学分子成像提出了更高要求。以活体内蛋白质和细胞功能的光学表征与跨层次信息整合作为关键科学问题,系统开展光学成像技术、光学分子探针、光学标记方法、信息处理与可视化等方面的研究,进一步发展和完善光学成像在高时空分辨的三维成像、多分子与细胞事件的并行检测、长时程动态监测和跨层次多尺度观察等方面的能力,是实现将免疫系统作为真正系统来研究的技术基础,将是免疫光子学未来 10 年发展的重要方向。

光声层析成像在肿瘤的成像诊断、转移监测和光热治疗中已展现了其良好的应用前景^[23],但在免疫研究中还仅限于对前哨淋巴结的成像显示,其受限原因主要是缺乏性能良好的遗传编码型和小分子染料型光声成像对比剂。发展具有高吸收特性的光声成像探针,将具有活体高分辨和多尺度成像特点的光声成像技术引入到免疫系统的活体跨层次动态研究中,是免疫光子学的重要发展方向之一。

光子学已在免疫成像中发挥着重要作用,此外,在免疫治疗方面也呈现出诱人的前景。用 ICG (FAD 认证的荧光染料)作为光热效应剂,用免疫佐剂作为免疫激活剂,在 805 nm 激光照射下诱导肿瘤光热损伤,激活免疫反应,从而达到肿瘤杀伤的效果^[59,60]。这种光诱导的癌症免疫治疗方法已在黑色素瘤和乳腺癌上证实了其有效性,刚刚进入临床前期实验。因此,光子学在免疫治疗中的推广应用及其分子机制研究,也将是免疫光子学的一个重要发展方向。

总之,光子学原理与技术的发展,将极大地促进免疫成像与免疫治疗的进程,为系统化研究免疫学问题提供跨层次多尺度的研究体系,将是未来 10 年信息科学与生命科学交叉的重要发展方向之一。

参 考 文 献

- 1 So much more to know ... [J]. *Science*, 2005, **309** (5731): 78~102
- 2 J. L. Coombes, E. A. Robey. Dynamic imaging of host-pathogen interactions *in vivo* [J]. *Nature Rev. Immunol.*, 2010, **10**(5): 353~364
- 3 T. Zal, G. Chodaczek. Intravital imaging of anti-tumor immune response and the tumor microenvironment [J]. *Semin. Immunopathol.*, 2010, **32**(3): 305~317
- 4 Z. Fan, J. A. Spencer, Y. Lu *et al.*. *In vivo* tracking of 'color-coded' effector, natural and induced regulatory T cells in the allograft response [J]. *Nature Med.*, 2010, **16**(6): 718~722
- 5 R. N. Germain, M. J. Miller, M. L. Dustin *et al.*. Dynamic imaging of the immune system; progress, pitfalls and promise [J]. *Nature Rev. Immunol.*, 2006, **6**(7): 497~507
- 6 M. F. Krummel. Illuminating emergent activity in the immune system by real-time imaging [J]. *Nature Immunol.*, 2010, **11** (7): 554~557
- 7 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 8 R. Weissleder, M. J. Pittet. Imaging in the era of molecular oncology [J]. *Nature*, 2008, **452**(7187): 580~589
- 9 B. A. Wilt, L. D. Burns, E. T. Wei Ho *et al.*. Advances in light microscopy for neuroscience [J]. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2009, **32**: 435~506
- 10 M. J. Miller, S. H. Wei, I. Parker *et al.*. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node [J]. *Science*, 2002, **296**(5574): 1869~1873
- 11 M. D. Cahalan, I. Parker, S. H. Wei *et al.*. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light [J]. *Nature Rev. Immunol.*, 2002, **2**(11): 872~880
- 12 F. Helmchen, W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, **2**(12): 932~940
- 13 J. N. Kerr, W. Denk. Imaging *in vivo*: watching the brain in action [J]. *Nature Rev. Neurosci.*, 2008, **9**(3): 195~205
- 14 D. Li, X. Lü, S. Zeng *et al.*. Beam spot size evolution of Gaussian femtosecond pulses after angular dispersion [J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(2): 128~130
- 15 S. Zeng, X. Lü, C. Zhan *et al.*. Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(8): 1091~1093
- 16 L. V. Wang. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography [J]. *Nature Photon.*, 2009, **3**(9): 503~509
- 17 X. Wang, Y. Pang, G. Ku *et al.*. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain [J]. *Nature Biotechnol.*, 2003, **21** (7): 803~806
- 18 H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica *et al.*. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging [J]. *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**(7): 848~851
- 19 K. H. Song, E. W. Stein, J. A. Margenthaler *et al.*. Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue *in vivo* in a rat model [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(5): 054033
- 20 K. Maslov, H. F. Zhang, S. Hu *et al.*. Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of single capillaries [J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(9): 929~931
- 21 C. Zhang, K. Maslov, L. V. Wang. Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption *in vivo* [J]. *Opt. Lett.*, 2010, **35**(19): 3195~3197
- 22 S. Yang, D. Xing, Q. Zhou *et al.*. Functional imaging of cerebrovascular activities in small animals using high-resolution photoacoustic tomography [J]. *Med. Phys.*, 2007, **34** (8): 3294~3301
- 23 C. Kim, C. Favazza, L. V. Wang. *In vivo* photoacoustic tomography of chemicals: high-resolution functional and molecular optical imaging at new depths [J]. *Chem. Rev.*, 2010, **110**(5): 2756~2782
- 24 V. Ntziachristos, D. Razansky. Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT) [J]. *Chem. Rev.*, 2010, **110**(5): 2783~2794
- 25 Chu Jun, Shi Hua, Yang Jie *et al.*. Optical visualization of molecular and cellular events: to decode 2008 Nobel Prize in chemistry [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, **35**(10): 1104~1111
- 储 军, 施 华, 杨 杰 等. 分子与细胞事件的光学可视化——解读 2008 年诺贝尔化学奖 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(10): 1104~1111
- 26 M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning *et al.*. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes [J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, **48**(18): 3244~3266
- 27 G. S. He, L. S. Tan, Q. Zheng *et al.*. Multiphoton absorbing materials; molecular designs, characterizations, and applications [J]. *Chem. Rev.*, 2008, **108**(4): 1245~1330
- 28 H. M. Kim, B. R. Cho. Two-photon probes for intracellular free metal ions, acidic vesicles, and lipid rafts in live tissues [J]. *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**(7): 863~872
- 29 M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo *et al.*. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins [J]. *Nature Methods.*, 2011, **8**(5): 393~399
- 30 D. Shcherbo, E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh *et al.*. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging [J]. *Nature Methods*, 2007, **4**(9): 741~746
- 31 J. Chu, Z. Zhang, Y. Zheng *et al.*. A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**(1): 234~239
- 32 X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin *et al.*. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome [J]. *Science*, 2009, **324**(5928): 804~807
- 33 M. Tomura, N. Yoshida, J. Tanaka *et al.*. Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein "kaede" transgenic mice [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**(31): 10871~10876
- 34 G. D. Vitorica, T. A. Schwickert, D. R. Fooksman *et al.*. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter [J]. *Cell*, 2010, **143**(4): 592~605
- 35 K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov *et al.*. Innovation: photoactivatable fluorescent proteins [J]. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, **6**(11): 885~891
- 36 M. Fernandez-Suarez, A. Y. Ting. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells [J]. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2008, **9**(12): 929~943
- 37 J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging [J]. *Trends Cell. Biol.*, 2009, **19**(11): 555~565
- 38 Yang Jie, Zhang Zhihong, Luo Qingming. Recent progress in fluorescent proteins research [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2010, **26**(11): 1025~1035
- 杨 杰, 张智红, 骆清铭. 荧光蛋白研究进展 [J]. *生物物理学报*, 2010, **26**(11): 1025~1035
- 39 Razansky Daniel, Distel Martin, Vinegoni Claudio *et al.*. Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins *in vivo* [J]. *Nature Photon.*, 2009, **3**(7): 412~417
- 40 H. Hutter. Five-colour *in vivo* imaging of neurons in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J. Microsc.*, 2004, **215** (Pt 2):

- 213~218
- 41 T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki *et al.*. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy [J]. *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**(5): 577~581
- 42 J. Livet, T. A. Weissman, H. Kang *et al.*. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system[J]. *Nature*, 2007, **450**(7166): 56~62
- 43 C. Wu, J. Zheng, C. Huang *et al.*. Hybrid silica-nanocrystal-organic dye superstructures as post-encoding fluorescent probes [J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46** (28): 5393~5396
- 44 B. H. Zinselmeyer, J. N. Lynch, X. Zhang *et al.*. Video-rate two-photon imaging of mouse footpad: a promising model for studying leukocyte recruitment dynamics during inflammation[J]. *Inflamm. Res.*, 2008, **57**(3): 93~96
- 45 T. Chtanova, M. Schaeffer, S. J. Han *et al.*. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection [J]. *Immunity*, 2008, **29**(3): 487~496
- 46 N. C. Peters, J. G. Egen, N. Secundino *et al.*. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies [J]. *Science*, 2008, **321** (5891): 970~974
- 47 B. McDonald, K. Pittman, G. B. Menezes *et al.*. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation [J]. *Science*, 2010, **330**(6002): 362~366
- 48 J. C. Waite, I. Leiner, P. Lauer *et al.*. Dynamic imaging of the effector immune response to listeria infection *in vivo* [J]. *PLoS Pathog.*, 2011, **7**(3): e1001326
- 49 J. Larmann, T. Frenzel, A. Hahnenkamp *et al.*. *In vivo* fluorescence-mediated tomography for quantification of urokinase receptor-dependent leukocyte trafficking in inflammation [J]. *Anesthesiology*, 2010, **113**(3): 610~618
- 50 B. Breart, F. Lemaitre, S. Celli *et al.*. Two-photon imaging of intratumoral cd8(+) T cell cytotoxic activity during adoptive t cell therapy in mice[J]. *J. Clinical Investigation*, 2008, **118**(4): 1390~1397
- 51 A. Boissonnas, L. Fetler, I. S. Zeelenberg *et al.*. *In vivo* imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor[J]. *J. Experimental Medicine*, 2007, **204**(2): 345~356
- 52 P. Mrass, H. Takano, L. G. Ng *et al.*. Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells [J]. *J. Experimental Medicine*, 2006, **203**(12): 2749~2761
- 53 J. Deguine, B. Breart, F. Lemaitre *et al.*. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and cd8(+) T cells during tumor regression[J]. *Immunity*, 2010, **33**(4): 632~644
- 54 J. B. Wyckoff, Y. Wang, E. Y. Lin *et al.*. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors[J]. *Cancer Res.*, 2007, **67**(6): 2649~2656
- 55 M. J. Pittet. Behavior of immune players in the tumor microenvironment [J]. *Curr. Opin. Oncol.*, 2009, **21** (1): 53~59
- 56 S. Celli, M. L. Albert, P. Bousso. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy[J]. *Nature Med.*, 2011, **17**(6): 744~749
- 57 Z. Fan, J. A. Spencer, Y. Lu *et al.*. *In vivo* tracking of "color-coded" effector, natural and induced regulatory T cells in the allograft response[J]. *Nature Med.*, 2010, **16**(6): 718~722
- 58 D. Kreisel, R. G. Nava, W. Li *et al.*. *In vivo* two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**(42): 18073~18078
- 59 X. Li, G. L. Ferrel, M. C. Guerra *et al.*. Preliminary safety and efficacy results of laser immunotherapy for the treatment of metastatic breast cancer patients [J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**(5): 817~821
- 60 X. Li, M. F. Naylor, H. Le *et al.*. Clinical effects of *in situ* photoimmunotherapy on late-stage melanoma patients: a preliminary study [J]. *Cancer Biol. Ther.*, 2010, **10** (11): 1081~1087