

生物组织大深度定量光学成像

王志博, 刘开元, 蒋慎益, 何木斌, 韩涛, 斯科, 李鹏, 刘智毅, 钱骏, 丁志华*

浙江大学光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027

摘要 近年来,面向生物组织大深度光学成像的方法不断发展,其中包括光学相干层析、多光子成像和自适应光学等。介绍了浙江大学光电科学与工程学院近年来在生物组织大深度定量光学成像方面的一系列重要进展,包括光学相干层析结构与功能成像、基于三光子荧光显微的大深度脑血管成像和新型的畸变误差波前校正方法等,并进一步概述了如何对上述方法获取的光学图像实施定量表征以获取生物组织的生理与病理信息。

关键词 生物技术; 大深度光学成像; 光学相干层析; 多光子成像; 自适应光学; 定量表征

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.1717001

Large-Depth Quantitative Optical Imaging of Biological Tissues

Wen Zhibo, Liu Kaiyuan, Jiang Shenyi, He Mubin, Han Tao, Si Ke, Li Peng, Liu Zhiyi,
Qian Jun, Ding Zhihua**State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China*

Abstract In recent years, methods for large-depth optical imaging of biological tissues, such as optical coherence tomography, multi-photon imaging, and adaptive optics, have been developed continuously. This paper outlines a series of important advances in large-depth quantitative optical imaging of biological tissues achieved by the College of Optical Science and Engineering of Zhejiang University in recent years, including structural and functional optical coherence tomography, large-depth cerebral vascular imaging based on three-photon fluorescence microscopy, and new wavefront correction methods for distortion errors. It also summarizes the ways of quantitatively characterizing the optical images obtained by these methods to acquire physiological and pathological information about biological tissues.

Key words biotechnology; large-depth optical imaging; optical coherence tomography; multi-photon imaging; adaptive optics; quantitative characterization

1 引言

生物组织大深度定量光学成像是利用先进的光学成像方法拓展生物组织的成像深度,并进一步对获取的光学图像实施定量表征,是深入理解生物组织的结构功能特性和相关病理机制的重要手段。

在各种光学成像技术中,光学相干层析(OCT)和由其拓展的光学相干层析血流造影(OCTA)是新型的高分辨率、无损生物组织成像技术^[1],可达到毫米量级的成像深度,在生物医学特别是各种眼科、皮肤科等疾病的诊断和监测中有着广泛的应用。相比其他一些成

像技术,如超声成像、核磁共振成像等,OCT成像具备较高的空间分辨率。同时,与共聚焦显微技术、多光子显微技术等高分辨技术相比,OCT成像具有更大的成像视场和深度。目前,OCT成像的主要研究工作集中在相关技术指标的优化方面,包括提高OCT图像的获取速度、空间分辨率和穿透深度等。此外,多光子成像技术(二次谐波成像、双光子荧光成像和三光子荧光成像等)相比于共聚焦荧光显微技术拥有高穿透深度、低光漂白和低光损伤等优点^[2],进而被广泛应用于活体组织成像中。其中,由Horton等^[3]在2013年研发的三光子荧光成像拥有极强的定域性激发能力,能极大地

收稿日期: 2022-06-14; 修回日期: 2022-07-21; 录用日期: 2022-07-28

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFA0700501, 2019YFE0113700)、国家自然科学基金(62035011, 11974310, 31927801, 61735016, 62075189, 61975172, 61905214)、浙江省自然科学基金(LR22F050007, LR19F050002, LR20F050001)、浙江大学教育部脑与脑机融合前沿科学中心

通信作者: *zh_ding@zju.edu.cn

提升成像穿透深度,在活体脑科学研究中有非常重要的应用^[4]。然而,三光子荧光信号极其微弱。因此,提高三光子荧光成像的信号强度进而拓展其成像深度,并使其和特定的组织功能研究(如脑科学研究等)更好地结合在一起是该技术的重要发展方向。在对生物组织进行光学成像时,生物样本的不透明性和不均匀性会造成生物组织折射率不匹配,使得成像的对比度下降、分辨率降低,最终导致图像变得模糊。为使光学成像系统适应外界变化并保持良好的性能,研究人员将自适应光学(AO)技术^[5-7]与各种光学成像技术相结合,实时校正光学成像系统像差,以提升图像在深层组织样本中的分辨率与对比度。目前,改进现有的像差矫正算法来提升图像的复原效果是AO研究领域的重点和趋势。基于光学图像揭示生物组织在生理与病理过程中发生的动态、微小改变,进而更好地理解基础的生命活动或实现疾病的高灵敏诊断,高精度的定量表征是其中的重要一环^[8-10]。光学成像方法与定量表征技术的融合成为了研究重要疾病(特别是早期病变)的新思路和新手段。

本文对生物组织大深度定量光学成像展开探讨,重点阐述了浙江大学光电科学与工程学院近年来在该领域中的一系列重要研究进展,主要包括 OCT、三光

子荧光成像、AO 和图像定量表征等方面的相关研究。

2 生物组织大深度成像方法

2.1 光学相干层析

OCT 基于低相干干涉原理,可以非侵入、非接触、高分辨地实现样品的实时三维(3D)成像^[11-12]。OCT 成像的原理如图 1(a)所示。迈克耳孙干涉仪将光源的入射光分成两部分并分别进入参考臂和样品臂,两束光经过两臂中的反射面反射后分别形成参考光和信号光并进行干涉,最终干涉光谱由光谱仪接收,其中频率域的干涉光谱经过傅里叶变换后可得到空间域的 OCT 结构图像。3D OCT 成像^[13]如图 1(b)所示。OCT 技术利用轴向扫描(A-line)捕捉样品的背向散射信号,获得深度分辨的结构信息,利用横向扫描(B-frame)获得样品的二维截面信息,并基于光栅扫描等其他二维空间扫描模式(C-scan)获得一系列连续的二维横截面图像,最终实现三维成像。傅里叶域 OCT 轴向量程受限于有限的光谱采样率,一般量程为 1~5 mm。为了进一步拓宽量程,Wang 等^[14]采用虚像相控阵列(VIPA)对衍射光栅的光谱进行进一步细分,实现 81.87 mm 的成像量程。

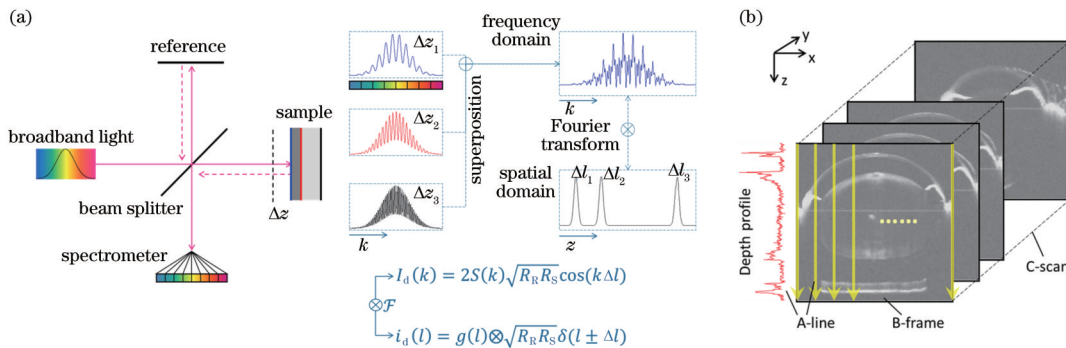


图 1 OCT 成像原理与三维重构。(a) 谱域 OCT(SD-OCT) 成像原理示意图^[13]; (b) 3D OCT 重构小鼠全眼活体图像^[13, 15]
 Fig. 1 Mechanism of OCT imaging and 3D reconstruction. (a) Schematic diagram of spectral domain OCT (SD-OCT) imaging^[13]; (b) reconstruction of 3D OCT image for mouse full eye *in vivo*^[13, 15]

OCT 能够在体获取生物体内部组织和器官的三维结构或功能信息,是重要的生物医学成像手段。在疾病诊断应用上,为了减轻患者的痛苦,且在方便伸入狭窄弯曲的生物体管道的同时,防止对管壁组织造成损伤,探头的小型化设计是关键问题之一。美国约翰霍普金斯大学 Sharma 和 Kang^[16]仅用一根单模光纤(SMF)实现了对动脉组织的 OCT 成像,但由于从 SMF 出射的光束具有发散特性,故图像的横向分辨率低,且有效成像范围有限。为了降低光束的发散性,研究人员进行了系列研究工作。韩国国立釜山大学 Moon 等^[17-18]通过引入大纤芯光纤(LCF)实现了对光纤基模的放大,但 LCF 中的高阶模式被认为是不利于成像的,且没有被利用起来,所以通过 LCF 不能实现对出射光场的调控。Ding 等^[19]提出了一种基于拉锥光纤的高传输效率无透镜探头。该探头由一根 SMF、

一段拉锥光纤和一段 LCF 组成,结构图如图 2(a)所示,其中:SMF 被用于实现 OCT 系统与探头远端光学组件之间的光传输;拉锥光纤被用于提高光传输效率和控制 LCF 中激发的模式;LCF 因具有较大的纤芯直径和较小的数值孔径,故其在减小出射光束发散性的同时,可以调节模间相位差。4 组典型参数下出射光束的二维光强分布如图 2(b)所示。优化参数后所制作的探头如图 2(c)所示,其插入损耗为 0.81 dB,优于基于逐步过渡纤芯的无透镜探头。可以发现,在 1300 nm 中心波长下,该探头实现了 140 μm 的工作距离、11.5 μm 的横向分辨率和 520 μm 的焦深。由于光束被光纤反射器偏转后从光纤的侧面出射时,光纤的侧面相当于一个柱透镜,故工作距离和横向分辨率得到了优化。基于探头的 OCT 系统对人类手指皮肤的成像效果如图 2(d)所示,台式系统对人类手指皮肤的

成像效果如图 2(e)所示。可以发现,二者成像效果相当,其中皮肤的分层结构与排汗管 (SD) 在图中清晰

可见。

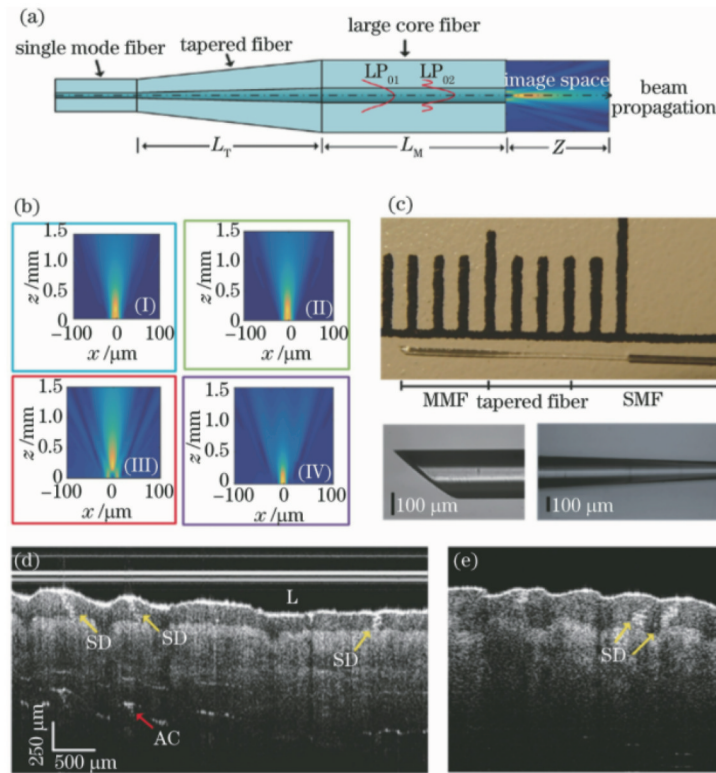


图 2 输出光束可调控的无透镜探头^[20]。(a)探头的结构图;(b)4组典型参数下出射光束的二维光强分布;(c)所制作探头的整体图和显微图;(d)基于探头的OCT系统对人类手指的成像图;(e)基于振镜的台式系统对人类手指的成像图
Fig. 2 Lens-free probe with tunable output beam^[20]. (a) Layout of probe; (b) two-dimensional light intensity distribution of outgoing beam under four typical parameters; (c) photograph and micrograph of fabricated probe; (d) image of human finger from probe-based OCT system; (e) image of human finger from galvanometer desktop system

作为 OCT 的功能性拓展, OCTA 将血红细胞 (RBC) 作为内源性血流标记特征, 高灵敏地区分静态的组织背景和动态的血流信号, 进而实现毛细血管水平的三维血流灌注可视化^[21-24], 如图 3 所示。目前, OCTA 技术已经被迅速地应用于科学研究和临床诊疗中^[25], 如眼科^[26-29]、皮肤科^[30-32]、神经科学^[33-35]、脑成像^[36-39]和肿瘤学^[40]。自 OCTA 问世以来, 涌现出大量的提高血流造影灵敏度和运动对比度的技术手段^[41-47]。Cheng 等^[48]建立了基于随机相幅矢量和理论 OCTA 血流信号统计模型, 阐明了 OCTA 运动对比度的理论机制。Guo 等^[49]提出了散斑场复值退相关运动检测方法, 综合复值干涉信号的幅度与相位信息, 实现了布朗运动水平的微小血流运动的高灵敏检测。Huang 等^[50]率先提出了多元时间序列模型, 获得了噪声信号与 OCTA 信号的渐进统计分布, 如图 4(a) 所示。同时, 基于逆信噪比-复退相关 (ID) 二维特征空间构建了信噪比自适应的 OCTA 方法, 并称之为 ID-OCTA。该方法应用于小鼠眼睛的结果如图 4 所示, 其中图 4(b)~(f) 分别对应中间毛细血管丛 (ICP)、脉络膜、视网膜全层、浅血管丛 (SVP) 和深层毛细血管丛 (DCP) 的图像, 图 4(g)~(i) 显示的是人眼的视网膜全层、SVP 与 DCP 的结果。进一步, 针对 ID 空间中动态

血流信号与静态组织信号的混叠区域, Li 等^[51]结合血管形态、逆信噪比与复退相关值多维特征信息, 提出了一种改进的 OCTA 分类器 (SID-OCTA), 可以在剔除背景噪声的同时, 提升血管对比度与连通性。Yang 等^[52]率先开展了大鼠光栓脑卒中模型缺血形成至恢复全过程的 OCTA 跟踪成像研究, 在毛细血管水平上揭示了脑皮层三维微循环形态的时空动态演变规律及其性别差异, 为中风机制研究、疗效和药效评价提供了理想的监测平台。

在诸多疾病的发生和发展过程中, 针对早期功能损伤的检测与干预可以显著减慢病程并降低危害。为了提升血流动力学监测的动态范围并降低不确定性, Chen 等^[53]提出了一种自适应时空 (ST) 核用于退相关估计, 并对大鼠脑皮层血流动力学进行在体监测。相比于传统的空间核, 基于 ST 核的血流动力学监测将退相关的动态监测范围扩大了约 49%, 不确定度降低了约 40%, 不同强度刺激结果的可分性扩大了约 180%, 这种优良的监测性能将极大地促进基于退相关的定量 OCTA 在血流动力学中的研究与发展。Deng 等^[54]提出了一种基于 OCTA 的视网膜神经血管耦合功能成像方法, 利用闪烁光刺激 (FLS) 激发视网膜神经活动, 利用动态 OCTA 捕捉视网膜微血管网络的形

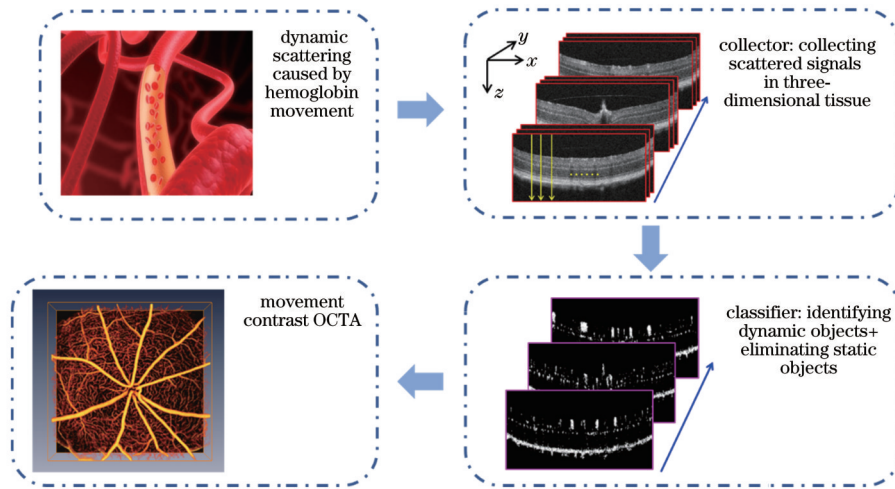


图 3 OCTA 原理示意图

Fig. 3 Schematic diagram of principle for generating OCTA

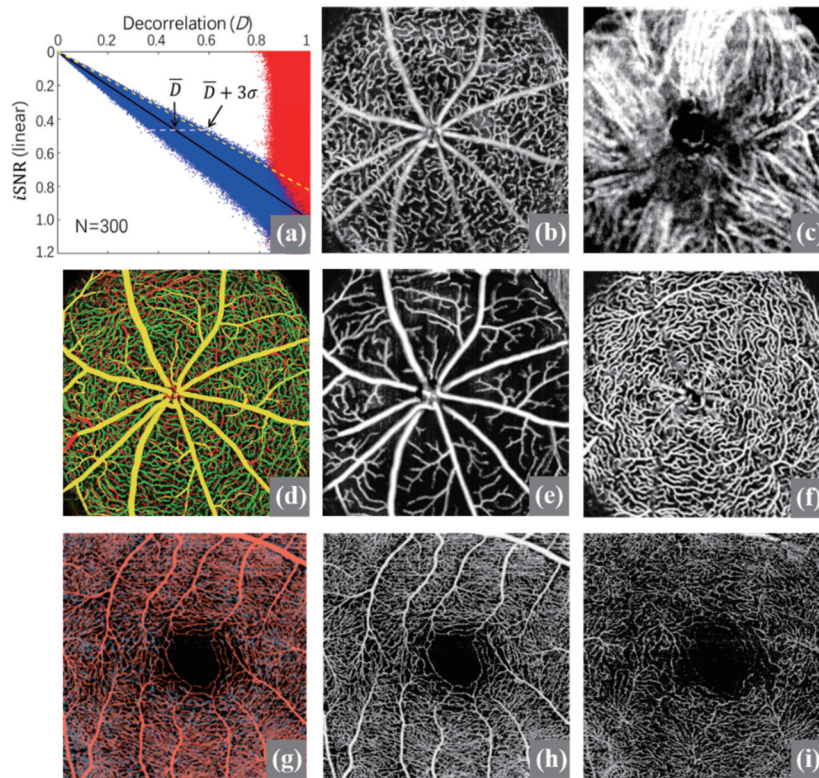


图 4 ID 的渐近关系和生成的 OCTA 图像^[50]。(a) ID 的渐近关系；(b)小鼠眼睛中的 ICP 图像；(c)小鼠眼睛中的脉络膜图像；(d)小鼠眼睛中的视网膜全层图像；(e)小鼠眼睛中的 SVP 图像；(f)小鼠眼睛中的 DCP 图像；(g)人眼中的视网膜全层图像；(h)人眼中的 SVP 图像；(i)人眼中的 DCP 图像

Fig. 4 Asymptotic relation of ID and generated OCTA images^[50]. (a) Asymptotic relation of ID; (b) image of ICP in mouse eye; (c) image of choroid in mouse eye; (d) image of whole retina in mouse eye; (e) image of SVP in mouse eye; (f) image of DCP in mouse eye; (g) image of whole retina in human eye; (h) image of SVP in human eye; (i) image of DCP in human eye

态响应与血流动力学变化,获得了神经血管耦合响应的精准空间分布图,如图 5 所示。针对动态 OCTA 长时间采集所导致的数据量大的问题,Deng 等^[54]利用图形处理器(GPU)加速的方法,实现了 OCTA 数据的实时处理,获得了 133 kHz 的高速线处理速度,进一步满足了临床需求。Zhang 等^[55]开展了神经调节微循环动态成像研究,基于红外吸收的光热效应实现了神经细

胞的调控,实现了脑皮层 OCTA 微循环的动态成像,成功记录了神经调节血流动力学响应的动态过程及其随调控强度的变化,实现了一种无标记、全光学脑功能调控与成像技术。

此外,OCTA 还有望用于血糖的无创监测^[56-59]。Liu 等^[60]发展了一种基于 OCTA 的无创、快速血糖监测技术,利用 OCT 实现活体视网膜的三维散射成像,

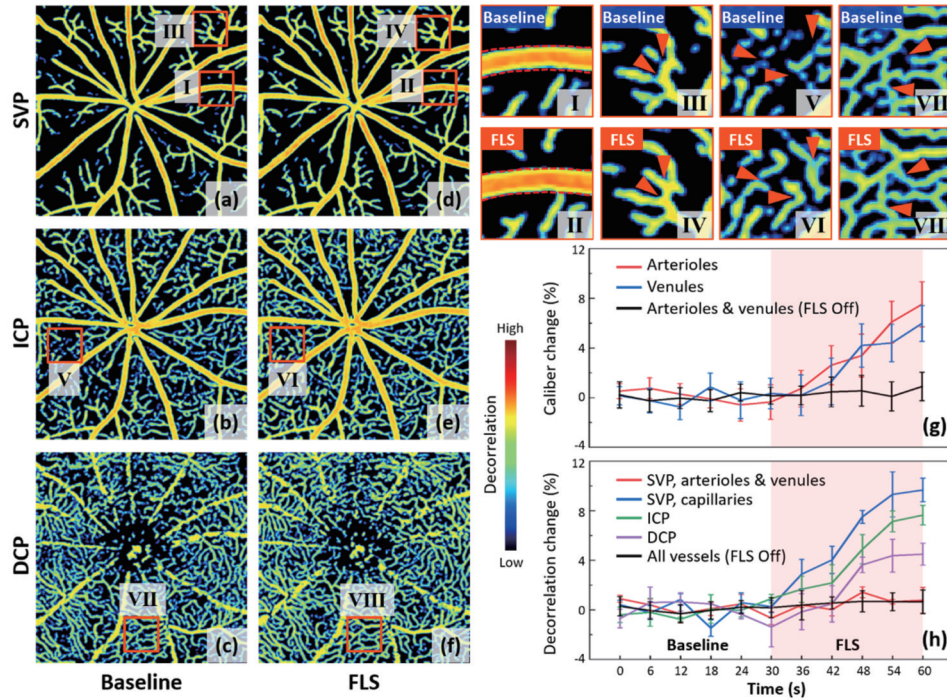


图 5 FLS 诱导的小鼠视网膜血流动力学响应的在体监测^[54]。(a)退相关编码的 SVP 中基线段的 OCTA 投影图;(b)退相关编码的 ICP 中基线段的 OCTA 投影图;(c)退相关编码的 DCP 中基线段的 OCTA 投影图;(d)退相关编码的 SVP 中刺激段的 OCTA 投影图;(e)退相关编码的 ICP 中刺激段的 OCTA 投影图;(f)退相关编码的 DCP 中刺激段的 OCTA 投影图;(g)血管形态的定量监测曲线;(h)血流区域中退相关系数的定量监测曲线

Fig. 5 FLS-evoked hemodynamic responses of mouse retina *in vivo*^[54]. (a) OCTA projection of baseline phase in decorrelation coded SVP; (b) OCTA projection of baseline phase in decorrelation coded ICP; (c) OCTA projection of baseline phase in decorrelation coded DCP; (d) OCTA projection of FLS phase in decorrelation coded SVP; (e) OCTA projection of FLS phase in decorrelation coded ICP; (f) OCTA projection of FLS phase in decorrelation coded DCP; (g) quantitative monitoring curve of vascular morphology; (h) quantitative monitoring curve of decorrelation coefficient in blood flow area

利用信号在深度方向的衰减特性实现三维光学衰减系数(OAC)成像,并结合 OCTA 的血流信息实现视网膜血液组织光学衰减系数的成像,如图 6 所示。研究发现,与背景组织相比,血液成分的衰减系数与血糖浓度(BGC)之间存在更为可靠的关联性,每 100 mg/L 的血糖质量浓度变化下小动脉/静脉血液散射系数的变化为 $0.05 \sim 0.07 \text{ mm}^{-1}$,并且观察到糖尿病模型小鼠血液衰减系数有显著升高(显著性为 $p < 0.001$)的现象。此外,不同类型的血管也表现出不同的性能:小静脉血液的衰减系数和血糖浓度之间的相关系数($R = 0.86$)要高于小动脉($R = 0.73$)。值得注意的是,糖尿病小鼠视网膜血液衰减系数的变化早于视网膜微血管病变(目前糖尿病视网膜病变临床诊断的关键指标之一)。该技术有望实现视网膜血糖的直接、长期监测,深入揭示糖尿病视网膜病变的发生发展机制,促进糖尿病视网膜病变的早期筛查。

将 OCT 样品臂小型化并与临床内镜通道结合,可进入人体腔道内获得结构和血流图像。由于血管生成与肿瘤进程密切相关,故内镜式 OCTA 有望用于内部器官的早期肿瘤检测中,如 Barrett 食管^[26]。Yao 等^[61]利用电热型微机电系统(ET-MEMS)远端扫描探头实现了 $2.0 \text{ mm} \times 2.3 \text{ mm}$ 视场 ($x-y$) 的步进式栅形扫描

血流成像,探头直径为 3.5 mm。基于 ET-MEMS 探头在人口腔颊黏膜中进行了三维 OCTA 血流成像, OCT 结构(灰色)融合 OCTA 血流(黄色)的三维渲染结果如图 7(a)所示,其中位于固有层(LP)内的浅表血管丛(SP)为进入结缔组织乳突的毛细血管袢(CL)提供营养和氧气。如图 7(b)、(c)所示,从三维 OCTA 图像中可以看到深度可分辨的血管网络,其中乳突固有层(pLP)的 OCTA 最大值投影图可显示集中且长的毛细血管袢,而更深的网状固有层(rLP)能更清楚地显示血管丛。为了进一步降低内镜式 OCTA 的成本和扩大应用范围,研究人员也进行了一些尝试。比如,在胆胰管狭窄腔内,Yao 等^[62]利用临床近端环扫探头实现了 OCTA 血流成像,探头直径仅为 0.9 mm。基于 ET-MEMS 的远端扫描探头适用于近检以针对局部区域进行血流成像,而临床近端环扫探头更适用于大规模筛查。

2.2 三光子荧光成像

三光子荧光显微成像在生物组织中可实现高空间分辨率的大深度定量成像。三光子荧光成像的两大显著特点在于长波长近红外光激发和高阶非线性光学效应。第一,由于近红外光具有更低的散射,故激发光波长越长,在生物组织中抗散射的能力更强,穿透深度更

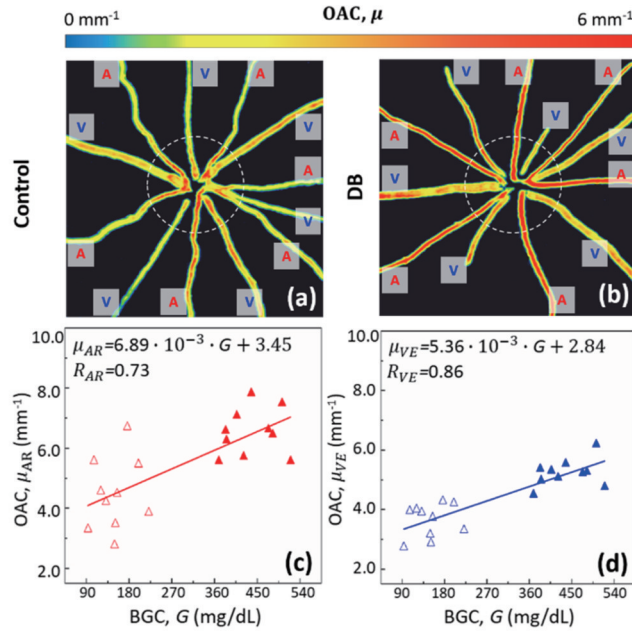


图 6 基于 OCTA 的 OAC 监测及 OAC 与 BGC 的相关性^[41]。(a) 健康小鼠视网膜动静脉的 OAC 投影图；(b) 糖尿病小鼠视网膜动静脉的 OAC 投影图；(c) 视网膜小动脉的 OAC 与 BGC 的相关曲线；(d) 视网膜小静脉的 OAC 与 BGC 的相关曲线

Fig. 6 OCTA-based OAC measurement and correlation between OAC and BGC^[41]. (a) OAC projection of retinal arteries and veins for healthy mice; (b) OAC projection of retinal arteries and veins for diabetic mice; (c) correlation curve of OAC and BGC for retinal arterioles; (d) correlation curve of OAC and BGC for retinal venules

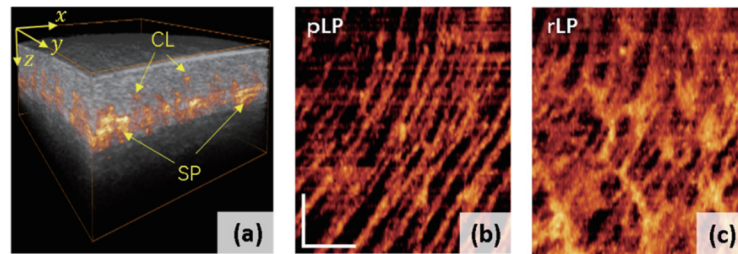


图 7 基于 ET-MEMS 远端扫描探头的颊黏膜 OCTA 图像^[61]。(a) 颊黏膜中融合 OCT 结构(灰色)和 OCTA 血流(黄色)图像的三维渲染图；(b) 颊黏膜中 pLP 层的 OCTA 最大值投影图；(c) 颊黏膜中 rLP 层的 OCTA 最大值投影图

Fig. 7 OCTA imaging of buccal mucosa by ET MEMS-based distal-end scanning probe^[61]. (a) Three-dimensional images of fused OCT structure (gray) and OCTA vasculature (yellow) in buccal mucosa; (b) projection of maximum OCTA of pLP layer in buccal mucosa; (c) projection of maximum OCTA of rLP layer in buccal mucosa

大。目前三光子荧光显微成像常用的两个最佳近红外激发窗口在 1300 nm 和 1700 nm 附近,这两个波段的光在生物组织中的衰减长度较长,穿透深度理论上可以达到 3 mm 以上^[63],故三光子显微成像可以实现生物组织的大深度成像。第二,由于三光子荧光为近似五阶非线性光学效应,非线性激发产生的荧光信号高度局限在聚焦光斑的焦点处,无非焦面外激发的杂散信号的干扰,因此三光子荧光成像能在生物组织大深度成像中保持良好的信号背景比和高空间分辨率。以上两大特性保证了三光子荧光显微成像具有毫米量级的光学成像深度和亚微米量级的空间分辨率。然而,由于三光子激发效率低,荧光探针的三光子吸收截面通常在 10^{-80} 量级^[64],故要求激发光具有非常高的峰值功率。目前,满足条件的飞秒激光器的脉冲宽度在百

飞秒量级,重复频率在 1 MHz 左右,这限制了三光子荧光显微成像的成像速度。总体而言,目前三光子荧光显微成像在生物结构成像上表现优异,但在实时动态成像上仍面临较大的挑战。

三光子荧光显微成像目前在生物组织大深度成像中已经获得了广泛的应用。2013 年,美国康奈尔大学 Horton 等^[3]通过孤子自频移的方式,在光子晶体棒状光纤中产生了 1700 nm 波段的飞秒光源,首次实现了活体小鼠脑神经和脑血管的三光子荧光成像,如图 8 (a) 所示,成像深度达到了 1.35 mm,成功实现了对小鼠海马体区域的脑血管和神经元的分别成像。之后, Ouzounov 等^[65]和 Wang 等^[66]通过非共线光参量放大(NOPA)方式获得了 1300 nm 波段的飞秒激光,如图 8 (b)、(c) 所示,1300 nm 的飞秒光激发处能响应

Ca²⁺的 GcaMP6s 探针的三光子荧光信号,并相继实现了开颅和穿颅下的神经元功能成像。需要指出的是,在这两个工作中,三光子荧光神经元功能成像的帧率

在 9 Hz 以内,尚难以满足实时神经元动态成像监测的要求(帧率大于 25 Hz)。

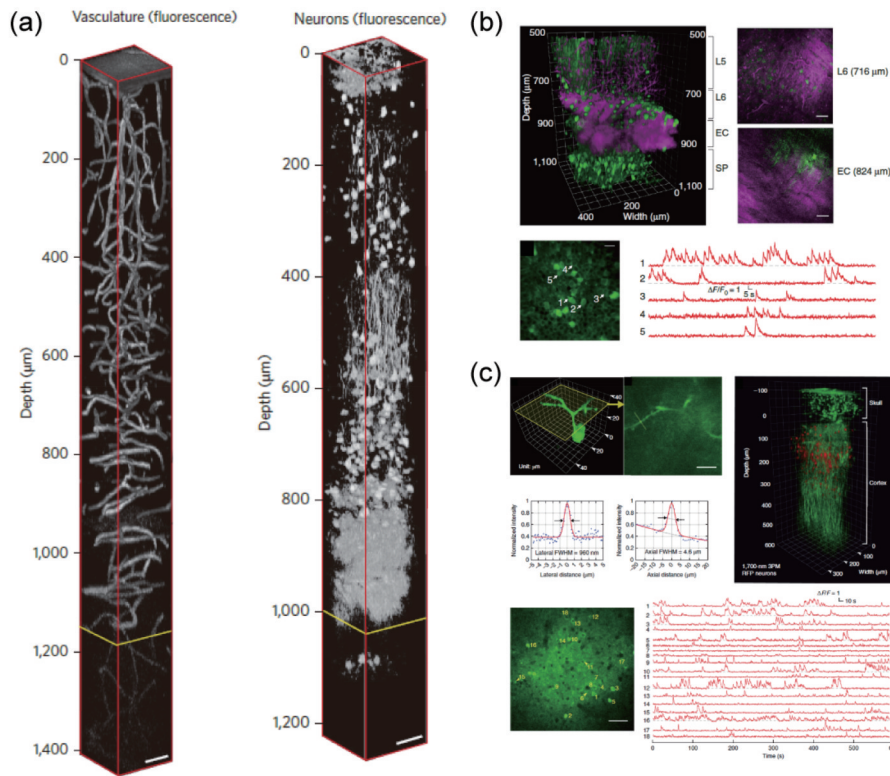


图 8 三光子荧光脑血管、神经元结构和脑功能成像。(a)三光子荧光小鼠脑血管和脑神经三维结构成像^[3]; (b)小鼠开颅窗下的三光子荧光神经元功能成像^[65]; (c)颅骨完整小鼠的三光子荧光神经元功能成像^[66]

Fig. 8 Three-photon fluorescence imaging of cerebral blood vessels, neuronal structures and brain functions. (a) Three-photon fluorescence imaging of three-dimensional structures of cerebral blood vessels and cranial nerves in mice^[3]; (b) three-photon fluorescence functional neuronal imaging under craniotomy window in mice^[65]; (c) three-photon fluorescence neuronal functional imaging of mice with intact skulls^[66]

为进一步拓展三光子荧光成像在大脑结构成像中的应用,深圳大学王科教授团队将三光子荧光显微技术应用于星形胶质细胞和小胶质细胞成像中^[67-68]。深圳大学 Chen 等^[67]采用 SR101 标记星形胶质细胞,实现了 942 μm 的成像深度。深圳大学 Cheng 等^[68]用波长为 1720 nm 的飞秒光激发可特异性标记小胶质细胞的 DyLight 649 染料,使小鼠大脑的小胶质细胞成像深度达到了 1124 μm。之后,深圳大学 Liu 等^[69]对比了几种量子点和商用染料(Texas Red、SR101)在 1700 nm 窗口附近的三光子吸收截面,发现量子点的三光子吸收截面普遍高出商用染料 4~5 个数量级,并选用了三光子吸收截面最大的量子点探针 Qtracker655。如图 9 (a) 所示,在 1700 nm 窗口激发下,实现了目前三光子荧光脑血管成像的最大深度记录(2.2 mm)。

由于颅骨中各成分折射率不均一,表现出对光非常高的散射,故经颅脑成像一直以来都面临很大挑战。三光子荧光显微成像的强抗散射能力为经颅大深度脑成像提供了可能。Wang 等^[70]开发了一种具有聚集诱导发光特性的探针 DCDPP-2TPA,采用 DSEP-PEG 将该探针包覆成纳米颗粒以增强荧光,在颅骨完整的

条件下,对小鼠脑皮层血管进行了三光子荧光成像,深度达到了 300 μm。之后,各类三光子激发的荧光探针均相继被成功应用到穿颅条件下的三光子荧光成像中^[71-72]。

除此之外,三光子荧光显微技术还可以用于荧光寿命成像和光动力治疗中。Ni 等^[73]将时间相关单光子计数技术应用到三光子荧光显微镜中,可实现微弱荧光信号的荧光寿命成像探测,成像结果如图 9 (b) 所示,其在小鼠脑血管的荧光寿命成像中达到了 600 μm 的深度。Li 等^[74]将光敏剂 HPPH 用 SiO₂ 包覆成纳米颗粒来标记 HeLa 细胞,如图 9 (c) 所示,并采用 1560 nm 波长的飞秒激光激发,成功监测到了三光子光动力促使 HeLa 细胞凋亡的过程。三光子荧光显微技术除了应用在脑结构和功能成像外,还能进一步拓展以应用在小鼠脂肪肝诊断和淋巴系统追踪等领域中。新加坡国立大学 Wang 等^[75]开发了一种具有极大三光子吸收截面的聚集诱导发光纳米探针 TPAPhCN,如图 9 (d) 所示,在 1200 nm 飞秒激光激发下,脂肪肝的三光子荧光成像表明 TPAPhCN 能够特异性标记脂滴。另外,美国康奈尔大学 Choe 等^[76]将三

光子荧光显微镜应用于小鼠整个淋巴结的成像中,如图 9(e)所示,成像深度达到了 900 μm ,并成功观测了 T 细胞区域中 CD8^+ T 细胞和 CD4^+ T 细胞的运动过

程。由于三光子荧光显微技术在生物组织深层结构成像上表现出了优异的效果,故三光子荧光显微成像有望被进一步应用于脾脏、肾脏等其他器官的成像中。

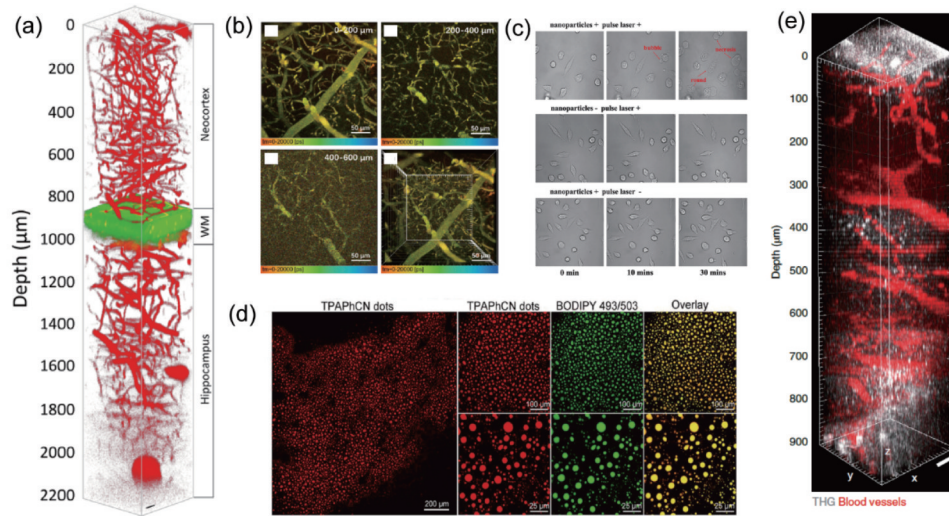


图 9 多种三光子荧光成像应用场景。(a)最大深度的三光子荧光小鼠脑血管结构成像^[69]; (b)三光子荧光寿命小鼠脑血管成像^[73]; (c) HeLa 细胞的三光子光动力治疗^[74]; (d)三光子荧光成像用于小鼠脂肪肝中脂滴形态观测^[75]; (e)三光子荧光成像实现对小鼠完整淋巴结的三维结构成像^[76]

Fig. 9 Various three-photon fluorescence imaging applications. (a) Maximum-depth three-photon fluorescence imaging for structures of cerebral blood vessels in mice^[69]; (b) three-photon fluorescence lifetime imaging of cerebral blood vessels in mice^[73]; (c) three-photon photodynamic therapy of HeLa cells^[74]; (d) three-photon fluorescence imaging for observation of lipid droplet morphology in mouse fatty liver^[75]; (e) three-dimensional structural imaging of intact lymph nodes in mice by three-photon fluorescence imaging^[76]

三光子荧光成像一直以来追求成像深度更大和成像速度更快。一方面,三光子荧光成像技术可以与其他克服生物组织散射的技术相结合以进一步增大成像深度。例如,在三光子荧光成像中,激发光在经过光学系统和生物样品之后不可避免地会产生波形畸变,进而在大深度成像中无法被完美地聚焦成一个光斑,这限制了深层组织中三光子荧光信号的强度。AO 技术可以在一定程度上克服激发光波形畸变导致的像差,从而提高三光子荧光成像的信噪比和成像深度。欧洲分子生物学实验室 Streich 等^[77]通过 AO 矫正三光子荧光显微成像时的像差和小鼠心跳引起的图像偏移误差,如图 10(a)所示。在 1300 nm 飞秒激光激发下,他们实现了 1.4 mm 的小鼠大脑神经元树突活动的记录,如图 10(b)所示,这是目前三光子神经元成像的最大深度记录。另外,完整颅骨下的三光子穿颅脑成像深度受限于颅骨的高散射干扰,成像深度被限制在 500 μm 以内。活体组织光透明技术可以通过外源性的生物安全试剂对小鼠颅骨进行透明化处理,替换颅骨间的钙质和胶原纤维等,达到折射率匹配的效果,从而显著降低颅骨的散射^[78]。Li 等^[79]利用重水替换颅骨光透明剂中的水成分,降低颅骨光透明剂在近红外波段中的吸收,达到同时降低颅骨散射效应和吸收效应的作用。在 1550 nm 飞秒激光激发的三倍频成像中,小鼠穿颅脑成像深度提升到了 600 μm 。进一步地,He 等^[80]通过选用三光子吸收截面较大的荧光探

针,在 1300 nm 飞秒激光激发下实现了目前最大的小鼠脑血管穿颅成像深度(1.00 mm)。除此之外,进一步延长三光子荧光发射波长至近红外波段处,减少信号光收集过程中的损耗,这有助于提升三光子荧光的成像深度。深圳大学 Xu 等^[81]选用发射在近红外一区中的聚集诱导发光纳米探针,在 1700 nm 窗口激发下实现了 1.69 mm 深度的三光子荧光脑血管成像,这是目前有机探针中的最大成像深度记录。进一步地,Ni 等^[82]首次实现了近红外二区激发和近红外二区发射的多光子荧光显微成像,选用高光电转换效率的面探测 InGaAs 相机替代单点探测的光电倍增管,以解决近红外响应的光电倍增管灵敏度低的问题,对近红外二区激发和近红外二区发射的三光子荧光显微成像具有借鉴意义。另一方面,三光子荧光显微成像的速度主要受限于三光子激发的低效率,对低重复频率、高峰值功率的飞秒激光器的要求限制了单点扫描的速度。为进一步提高三光子荧光成像速度,美国康奈尔大学 Li 等^[83]将自适应激发光源引入到三光子显微成像技术中,如图 10(c)所示,通过预先扫描三光子荧光显微成像选择感兴趣区域,在实际成像中只针对神经元所在的空间坐标进行三光子荧光成像,成像速度提升了 30 倍以上。由于减少了感兴趣区域外的激发,故三光子荧光神经元结构和功能成像的信号背景比也得到了显著提升,成像结果如图 10(d)所示。然而,该方式依旧无法实现全局的三光子荧光动态成像,感兴趣区域之

外的信息会被舍弃。除此之外,优化提高荧光探针的三光子荧光亮度,使其在高重复频率(80 MHz)的飞秒

激光下也能产生足够强的三光子荧光,有望进一步提升三光子荧光的成像速度。

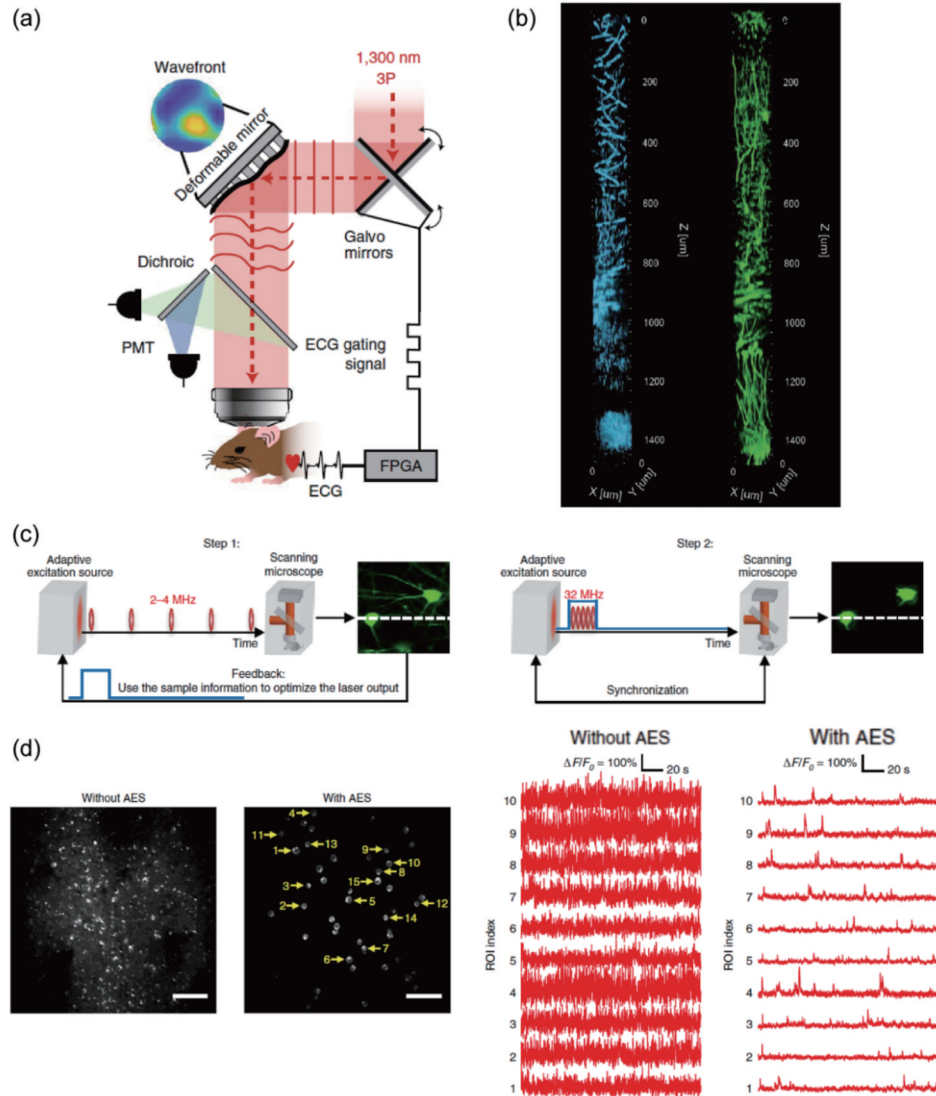


图 10 自适应光学改善三光子荧光成像深度和成像速度。(a)移动关联自适应光学三光子显微镜示意图^[77];(b)自适应光学三光子荧光显微镜下小鼠脑神经元的三光子荧光结构成像^[77];(c)自适应激发光源提高三光子荧光成像速度工作原理^[83];(d)自适应激发光源显著提升神经元结构和功能记录过程的信号背景比^[83]

Fig. 10 Three-photon fluorescence imaging depth and imaging speed improved by adaptive optics. (a) Schematic diagram of mobile-correlated adaptive-optics three-photon microscopy^[77]; (b) three-photon fluorescence structural imaging of mouse brain neurons under adaptive-optics three-photon fluorescence microscopy^[77]; (c) principle of adaptive excitation source improving speed of three-photon fluorescence imaging^[83]; (d) signal-to-background ratio significantly improved by adaptive excitation source during neuronal structural and functional recording process^[83]

2.3 自适应光学

在对生物组织进行光学显微成像时,生物样本的不透明性和不均匀性会造成生物组织折射率不匹配,进而使得成像的对比度下降、分辨率降低,图像变得模糊。为了恢复图像的分辨率和清晰度,需要对波前进行校正,常用AO技术来实现这一功能。AO最初是由美国天文学家Babcock于1953年提出,他提出用反馈校正技术减轻大气湍流的作用,虽然在当时的条件下没有合适的技术来实现波前的探测与校准,但是探测-控制-校准的方案成为了后续技术的内核^[84]。

AO技术发展迅速,20世纪70年代末,*Journal of the Optical Society of America*上发表了AO技术领域相关的一系列文章^[5,7],指明了技术的可实现性。1978年,Hardy^[6]发表了第一篇有影响力的综述,详细介绍了AO的原理与技术方。随着“星球计划”项目的开展,AO技术在天文和军用领域中得到了迅猛发展^[85]。21世纪以来,随着生命科学技术的蓬勃发展,AO技术从军用转向民用,逐渐和显微成像系统相结合,可提升图像在深层组织样本中的分辨率与对比度,以便于科学研究。

AO 系统主要分为三个部分,即波前探测模块、波前校正模块和控制模块。其中,最重要的模块就是波前探测模块,该部分的精度很大程度上决定了自适应

系统的精度。针对波前探测,有两种方案,即直接波前探测和间接波前探测^[86],如图 11 所示。

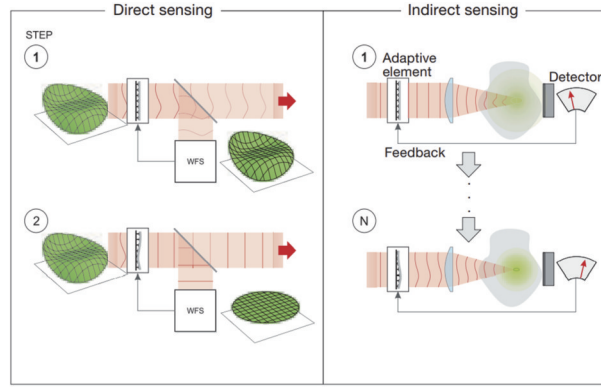


图 11 两种 AO 模式^[86]
Fig. 11 Two AO modes^[86]

直接波前探测是直接用探测器获取波前的信息,将信息传递到波前校准模块中进行校正。常用的波前探测器有 Shack-Hartmann (SH) 传感器、四棱锥传感器^[87]和剪切干涉仪等。其中,应用最广泛的是 SH 传

感器,因为它具有简单、有效和快速的优点^[88]。SH 传感器的原理如图 12 所示,通过测量子光斑的质心,计算偏移量,就可以得出波前的相位分布。

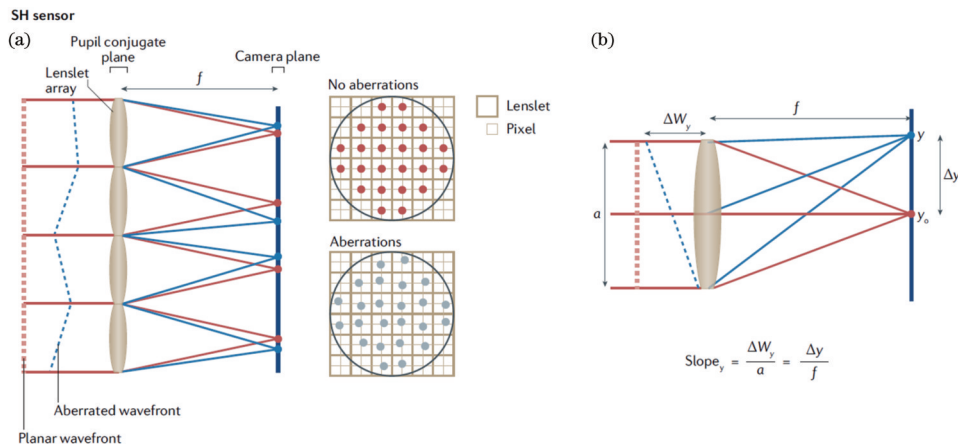


图 12 SH 传感器原理图^[89]
Fig. 12 Principle of SH sensor^[89]

间接波前探测又被称为无传感器 AO 法,是通过观测成像的图像质量指标(锐度、对比度等)来判断波前情形的,再通过不断调整波前校准器件来得到最好的图像质量指标。常用的波前校准器件经过多年来的

更新和发展,主要有三种,即空间光调制器(SLM)、数字微镜器件(DMD)和可变形镜(DM)。其中,最为常用的两种器件的结构示意图如图 13 所示,左图为可变形镜,右图为空间光调制器^[86]。

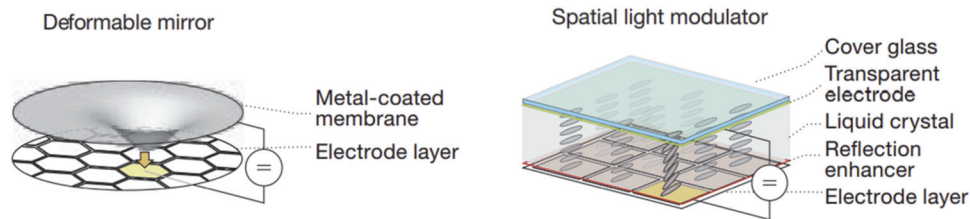


图 13 光学像差校正器^[86]
Fig. 13 Optical aberration corrector^[86]

2000 年,美国密歇根大学 Albert 等^[90]首先将 AO 技术和双光子成像技术相结合,该方案是基于遗传算法的无传感器的 AO 方法,利用可变形镜来实现光学像差校正的功能。该系统实现了对离轴像差的校正,扩大了双光子点扫描显微系统的扫描成像范围,证实了可变形镜对轴外像差校正的有效性。

2002 年,美国哈佛大学 Booth 等^[91]提出了模式法,实现了对显微图像的对比度与分辨率的提升。后续,该团队继续对模式法进行优化,以提升算法的速度和拓宽应用的场景,在将模式法与结构照明显微镜(SIM)系统^[92]、双光子成像系统^[93]、受激发射损耗(STED)系统^[94]的结合应用中,均获得了较好的成像效果。

2010 年,美国霍华德·休斯医学研究所 Ji 等^[95]提出了瞳孔分割法,该技术将物镜后瞳孔分为多个子区来控制子区光线的偏移从而对光场进行调控,并校正折射率不匹配产生的样本和系统像差,最终可以将分辨率恢复到近衍射极限的水平。利用该系统对小鼠皮层切片进行成像,在 400 μm 深度处得到了高分辨率的成像结果。之后,该团队对基于双光子成像系统的瞳孔分割法进行了不断地改进与提升,实现了较高分辨率和信噪比的活体成像^[96]。

美国霍华德·休斯医学研究所 Cui^[97]对相干 AO 技

术(COAT)算法进行改进,将原有 COAT 算法应用到显微成像系统中,实现对小鼠脑切片和淋巴结的深层组织成像。COAT 算法后续不断发展,在与双光子成像系统^[98-99]和 STED 系统结合^[100-101]后,可以实现较好的校正成像效果。

随着网络模型的优化和计算机算力的提升,使用深度学习对像差进行探测和校正逐步成为新的解决方案。近年来,卷积神经网络(CNN)已被用于波前传感中。部分研究人员使用点扩散函数(PSF)来对波前分布进行模拟,估计 Zernike 多项式系数^[102-104]。然而,在深层组织成像时波前分布难以探测,情况较为复杂。2021 年,浙江大学 Hu 等^[105]提出了一种新型的波前校正方法,即两步波前检测(TSWD)。该方法基于深度学习,利用 SH 波前传感器(SHWS)进行波前探测。该方法使用了两个网络,其中一个网络的作用是估计 Zernike 像差多项式的系数,以重建子区域上的局部波前,另一个网络可用于全局波前检索,将两者相结合可以对复杂波前结构进行精准的估计与拟合。该方法得到的重构波前的均方根畸变误差比传统方法 COAT^[97]要更低,效果更好。图 14 为该方法波前重构的结果图以及其与 COAT 方法的对比图。可以看出,与 COAT 方法相比,该方法具有明显的优势。

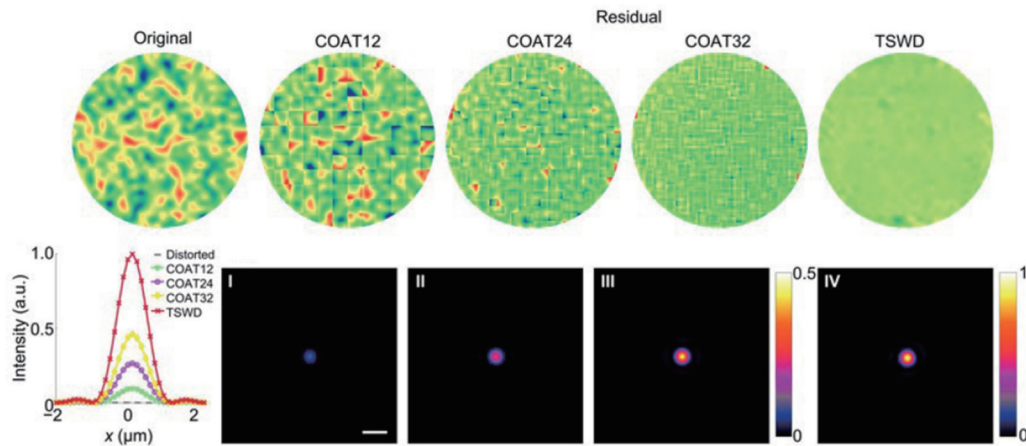


图 14 波前探测比较^[105]

Fig. 14 Wavefront detection comparison^[105]

2021 年,Zheng 等^[106]提出了一种可以快速、精准校正 SIM 中样本像差的方法。该技术方案通过训练卷积神经网络,实现用 Zernike 多项式的前 15 阶系数来表征像差。该方案使用 AO 方法对结构光照明进行补偿,并优化系统的网络结构,得到的预测像差与真实像差的相关性较高,可达 0.9986,并可在 10.1 ms 内完成对波前的预测与重构,可以有效校正 SIM 系统中的光学像差,如图 15 所示。同时,该技术对光照条件的鲁棒性强,未来可以应用在 SIM 深层生物组织高分辨率成像中。

2021 年,Hu 等^[107]提出了一种基于像差先验知识的深度学习荧光显微镜图像增强技术。由于这种新型的基于深度学习的波前探测方法是基于像差的先验知

识实现的,故无需额外光学器件就可实现对荧光显微成像的图像增强,在降低噪声的同时,提升了对比度与信号峰值信噪比。将该技术与 Zernike 像差多项式相结合,生成光学图像退化模型,并用生成的数据集(无需精确配准)进行端到端的神经卷积网络的训练,通过尺度循环像差校正(SRACNet)可大幅增强算法的运算速度、泛化性和鲁棒性,如图 16 所示。该方案在商用荧光显微镜上得到了验证,未来在深层组织成像中会有更大的作用。

由于常规的 SH 波前传感器只能探测低阶像差,对高阶像差无法探测,故针对深层生物样本产生的高阶像差问题,Hu 等^[108]于 2019 年提出了一种可进行高阶像差探测的 SH 波前传感器。该技术直接采用波前

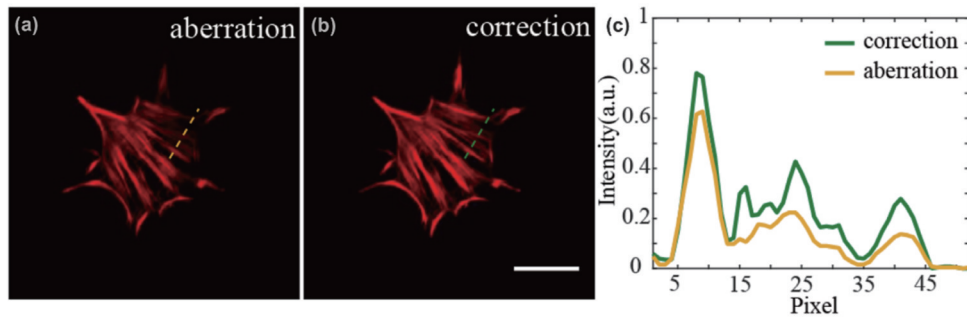


图 15 在培养的幼年叙利亚地鼠肾细胞中重建了鬼笔环肽标记的肌动蛋白的 SIM 图像^[106]。(a) AO 校正前;(b) AO 校正后;(c)图 15(a)、(b)中虚线处的强度分布

Fig. 15 Reconstructed SIM images of Phalloidin labeled actin in cultured baby hamster Syrian kidney cells^[106]. (a) Before AO correction; (b) after AO correction; (c) intensity profiles of dotted lines in Fig. 15(a) and Fig. 15(b)

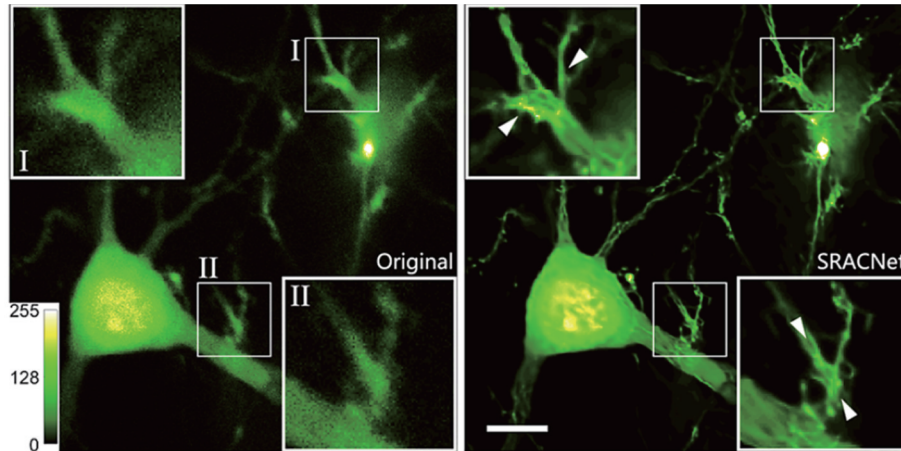


图 16 SRACNet 在共聚焦显微镜上的图像增强性能^[107]

Fig. 16 Image enhancement performance of SRACNet on confocal microscopy^[107]

的点阵图作为输入,无需图像分割或者质心探测,可以在个人计算机上实现在 10.9 ms 内预测前 120 阶 Zernike 像差,有效地提升了波前探测的精度与速度,可以更好地探测深层样本产生的像差。

统计实验结果表明,与传统的基于模式的 SHWS 相比,该方法的相位估计误差降低了 40.54%,点扩散函数的斯特列尔比提高了 27.31%。该方法的像差检测性能也在 300 μm 厚的小鼠脑切片上得到了验证,与传统 SHWS(TSHWS)相比,该方法的峰值信噪比中值提高了 30%~40%,如图 17 所示,其中 LSHWS 为基于学习的 SHWS。该技术具有检测精度高、流程简单、预测速度快和兼容性好等优点,可以大幅提升波前传感器的探测能力,且可与现有的 AO 系统相结合,进一步应用于生物医学领域中。

3 光学图像定量表征

3.1 纤维状结构空间取向定量表征

各种光学成像技术(光学相干层析成像、多光子成像等)提供了获取生物组织大深度精细图像的方法^[2, 109]。纤维状结构是生物组织的基本结构形式,血管、神经元轴突和胶原纤维等都以纤维状结构的形式存在于生物体内,并对生命活动有着重要的作用^[110]。

疾病的发生与演化往往会引起细胞和细胞外基质相互作用的扰动,并导致生物组织中各种纤维状结构的空 间构象发生变化^[8-10]。结合各种光学成像技术对生物组织内纤维状结构的空 间形态进行定量表征是研究疾病,特别是早期病变的新手段和新思路。通过精准地描述这种结构与功能的关联特性,人们将更加深入地认识到各种疾病的发生与演化机制。

空间取向是纤维状结构重要的空 间形态特征,对生物组织中纤维状结构二维和三维空 间取向的定量计算是研究的热点^[111-115]。傅里叶变换是一种常用的二维取向计算方法。2010 年,美国伊利诺伊大学香槟分校 Sivaguru 等^[116]通过二次谐波成像获取了马肌腱的胶原纤维图像,并基于图像的傅里叶变换谱的取向获取了图像某一个局域或整体的纤维空 间取向,但这种方法有计算速度和成像要求等方面的限制因素。2014 年,法国国家科学研究中心 Bancelin 等^[117]通过二次谐波成像获取了人体子宫颈活检样本切片的胶原纤维图像,并采用形态学开运算获得了胶原纤维的取向信息,该算法需要权衡角度计算精度和曲率分辨本领这两项指标。由于在生物体内实际的纤维状结构分布是三维的,因此近年来许多工作专注于三维空 间取向的计算。2012 年,美国伊利诺伊大学香槟分校 Lau 等^[118]进一步

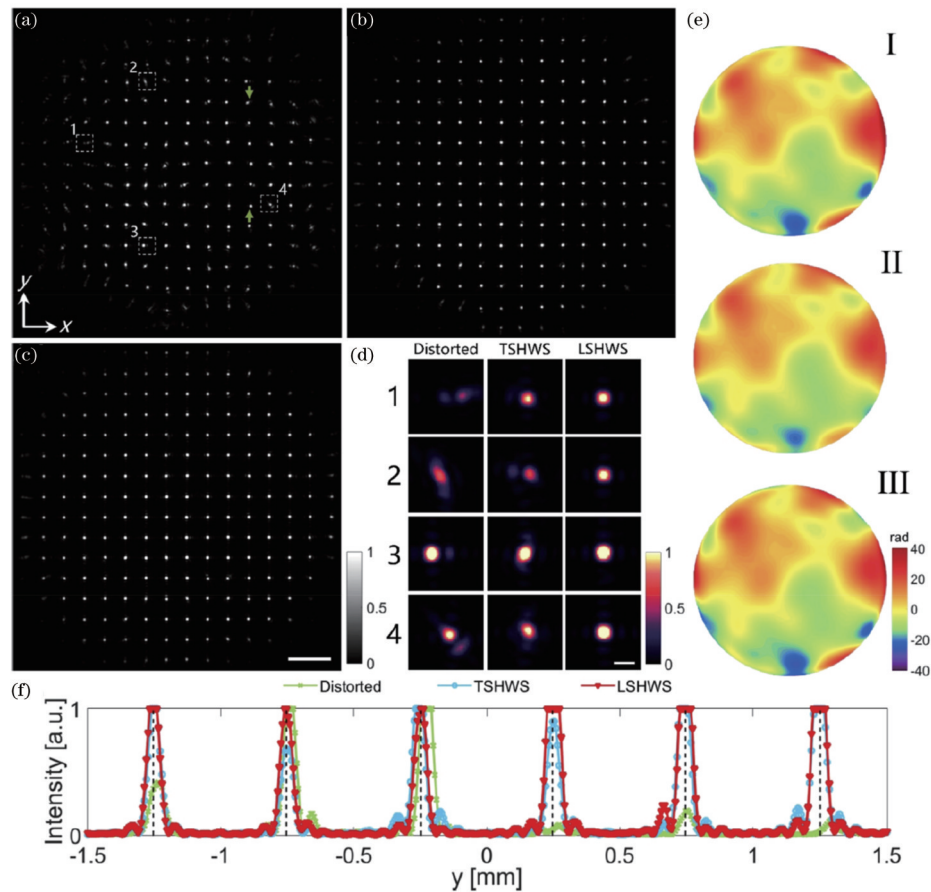


图 17 TSHWS 和 LSHWS 的波前传感能力比较^[108]。(a) 扭曲的 SHWS 模式；(b) 由 TSHWS 检测到的波前补偿的 SHWS 模式；(c) 由 LSHWS 检测到的波前补偿的 SHWS 模式；(d) 图 17(a)~(c) 中编号点的比较；(e) 像差波前、TSHWS 检测波前和 LSHWS 检测波前；(f) 图 17(a)~(c) 中光斑强度分布的比较

Fig. 17 Comparison of wavefront sensing capability of TSHWS and LSHWS^[108]. (a) Distorted SHWS pattern; (b) SHWS pattern compensated by wavefront detected by TSHWS; (c) SHWS pattern compensated by wavefront detected by LSHWS; (d) comparison of numbered spots in Figs. 17(a)–(c); (e) aberration wavefront, TSHWS detected wavefront and LSHWS detected wavefront; (f) comparison of spot intensity distribution in Figs. 17(a)–(c)

推广了之前基于傅里叶变换的二维取向算法, 获取了三维的空间取向信息。由于该算法是基于小区域的三维傅里叶变换的, 故需要在局域的空间尺寸与计算效率之间进行权衡。

2015 年, Liu 等^[119] 提出了一种新型纤维状结构空间取向定量表征方法, 并将其命名为权重矢量求和法, 该方法利用方位角 θ 和极角 φ 定义纤维状结构在三维空间中的取向, 如图 18(a) 所示。对于纤维强度图像中的像素, 权重矢量求和法创建了以该像素为中心的计算窗口, 计算窗口内中心像素与其他任何像素都可构成一个矢量, 并赋予这些矢量两项权重因子: 矢量长度的倒数和沿矢量方向强度的涨落程度, 如图 18(b) 所示。最后, 加和所有赋予权重后的矢量, 可得到计算窗口中心像素的取向, 如图 18(c) 所示。通过该方法可以得到三维空间中每一个像素的二维或三维空间取向, 计算速度比傅里叶变换方法提高了近一倍。基于空间取向, Liu 等^[120] 进一步提出了方向方差这一指标以表征纤维状结构二维和三维空间的有序度, 该指标

的取值范围为 0~1。从图 18(f) 可以看出: 方向方差取值越接近于 0, 表明纤维状结构越接近于平行排布; 方向方差取值越接近于 1, 表明纤维状结构的空间取向越散乱。

基于纤维状结构空间取向定量表征方法, Liu 等^[120] 通过小鼠的乳腺癌模型研究了健康组织与肿瘤组织的胶原纤维三维空间结构的差异性。从正常和肿瘤组织的多光子成像与三维空间取向的分析发现, 胶原纤维在正常组织中呈篮状交叉分布, 而在肿瘤组织中展现出螺旋状的形貌特征。不同尺度下胶原纤维的三维方向方差分析结果表明, 肿瘤组织的三维方向方差更小, 胶原纤维排列更有序。这一发现与之前其他科研团队的相关研究结果相符^[121]。进一步, Liu 等^[120] 通过人体腹膜癌扩散模型研究了癌症发生时组织中胶原纤维空间取向的变化。分析结果表明, 胶原纤维在肿瘤组织中具有更强的空间取向性, 而在正常组织中更为散乱、无序。三维方向方差的定量分析表明, 在大于一定窗口尺寸的情况下肿瘤组织中胶原纤维的三维方向方差更小, 空间有序程度更高。该研究在腹膜癌

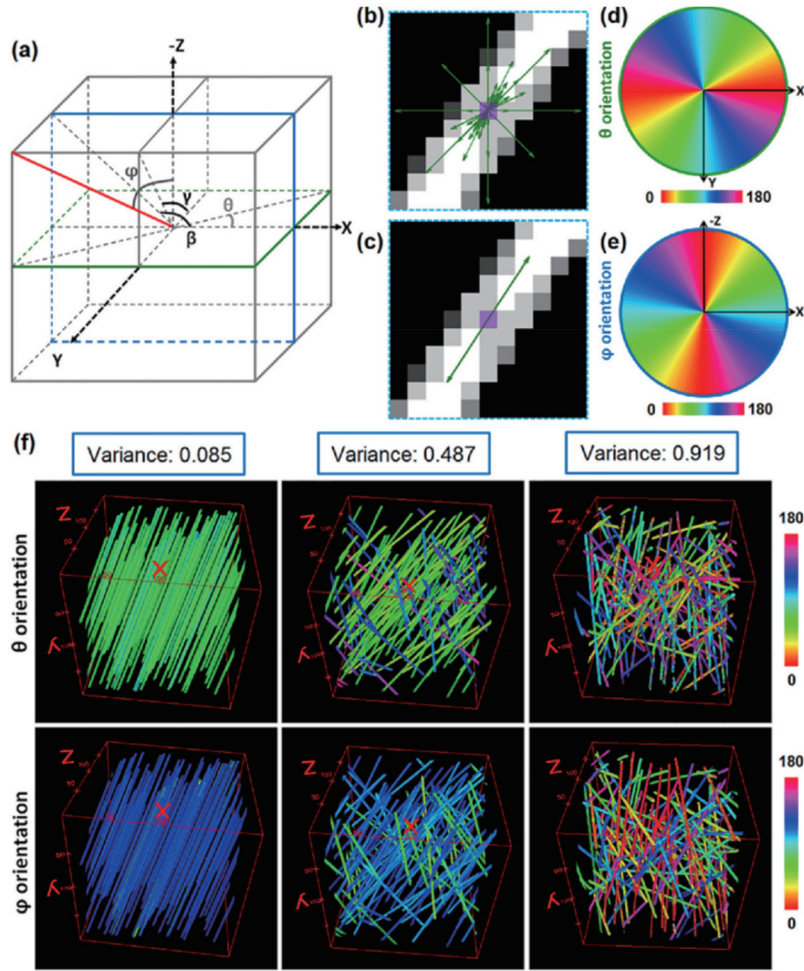


图 18 纤维状结构空间取向的定义^[120]。(a)三维空间纤维状结构取向的角度定义;(b)权重矢量求和法示意图;(c)经过权重矢量加和后的空间取向;(d)特定平面[图 18(a)中的绿色平面]的 θ 角图谱;(e)特定平面[图 18(a)中的蓝色平面]的 φ 角图谱;(f)基于三维空间取向获得的三维方向方差

Fig. 18 Definition of spatial orientation for fiber-like structures^[120]. (a) Definition of angles in orientation of three-dimensional space fiber-like structure; (b) schematic diagram of weighted vector summation algorithm; (c) spatial orientation obtained by summing weighted vectors; (d) θ orientation map for plane marked in green in Fig. 18(a); (e) φ orientation map for plane marked in blue in Fig. 18(a); (f) three-dimensional directional variance acquired by three-dimensional spatial orientation

扩散的早期诊断、癌症的阶段划分、癌症的程度界定和癌症的治疗方案确定等方面都具有重要的意义。

3.2 纤维状结构空间曲率定量表征

空间曲率是纤维状结构另一个重要的空间形态特征,与生物组织的力学性能密切相关^[122]。基于对纤维状结构空间取向的定量表征,Qian等^[123]最近提出了一种像素级的纤维状结构空间曲率(paWav)定量表征方法。

图 19(a)展示了空间曲率的计算原理。首先,对图像进行二值化处理,从背景中识别出纤维状结构,得到纤维-背景二值矩阵。然后,使用权重矢量求和法计算纤维状结构的取向以得到取向矩阵。接着,在二值矩阵和取向矩阵中以每个纤维像素为中心创建计算窗口。二值矩阵中心像素值被定义为 $-N(N+1)$ 是计算窗口中有效纤维像素的总数量),其他像素值不变,再将窗口内的所有像素值乘以 $1/N$;对于取向矩阵,计算窗口中纤维像素值的取值范围为 $0^\circ\sim 180^\circ$ 。

最后,将这两个窗口进行互相关,计算所有非中心纤维像素与中心纤维像素取向值的差值并取平均值。互相关的结果是 $0^\circ\sim 90^\circ$ 纤维像素值取值范围内的取向差值,进行归一化后可得到取值范围为 $0\sim 1$ 的曲率矩阵,该矩阵可提供像素级的纤维状结构曲率信息。

由图 19可以发现:在模拟计算纤维状结构空间曲率时,靠近弯曲程度较大的尖端区域整体为红色色调,显示出较高的空间曲率水平;平整区域整体为蓝色色调,对应较低的空间曲率水平。该现象验证了算法的准确性。该算法还可以扩展到三维空间中,用于更精准地描述实际情况下的纤维状结构曲率特征,如图 19(b)所示。结合空间取向、方向方差和空间曲率这三个指标,对小鼠全身血管进行了多参数分析,从不同角度为小鼠的血管系统提供了互补的形态学特征信息,如图 19(c)所示。该研究进一步地论证了空间曲率在鼠脑血管空间形态研究、胰腺癌诊断等方面是一项高灵敏的指标^[123]。

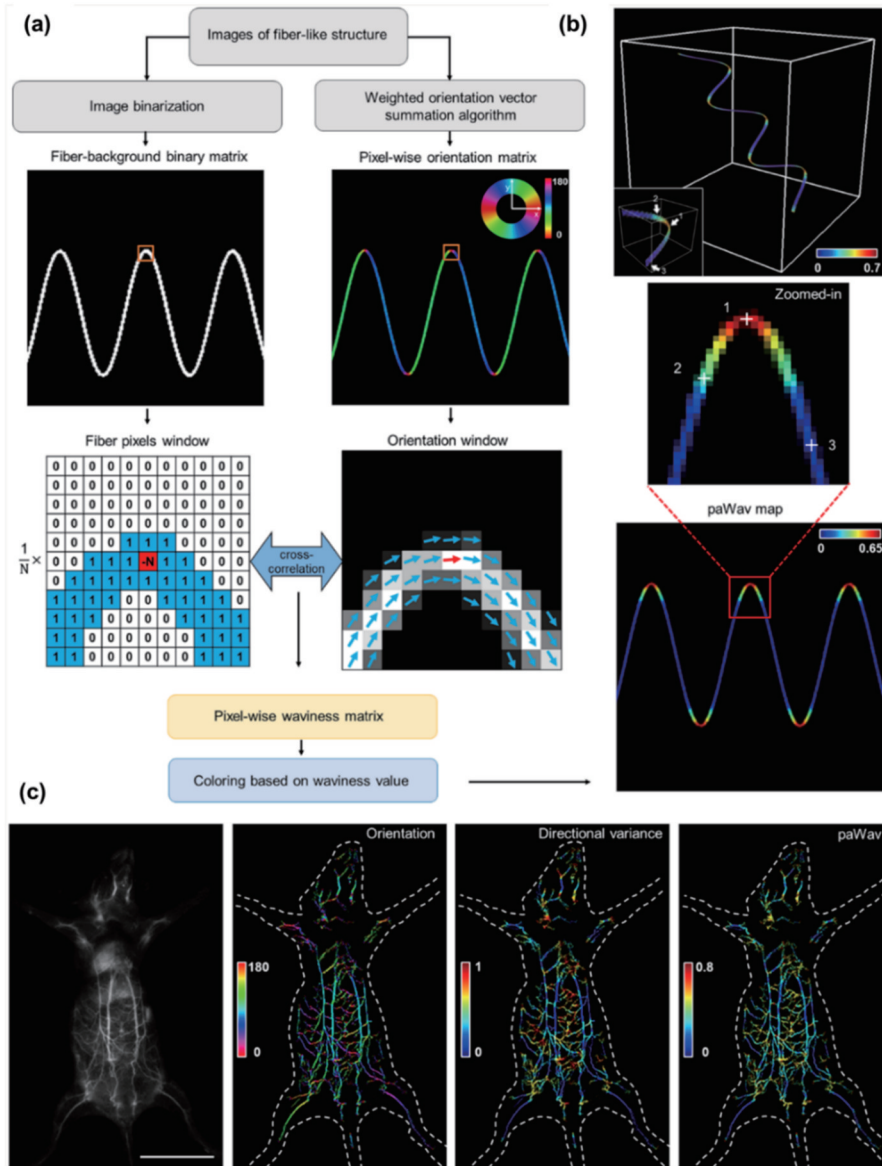


图 19 纤维状结构空间曲率的计算原理图^[123]。(a)空间曲率的算法流程图;(b)将空间曲率算法从二维扩展到三维;(c)小鼠体内血管的原始强度图、空间取向图、方向方差图和空间曲率图

Fig. 19 Schematic diagram of paWav calculation for fiber-like structures^[123]. (a) Flow chart of paWav algorithm; (b) extension of paWav algorithm from two-dimensional format to three-dimensional format; (c) raw intensity, spatial orientation, directional variance, and paWav maps of blood vessels in mice

基于高分辨的细胞图像, Qian 等^[124]开展了细胞器(内质网)和细胞骨架(细胞微管)空间形态的定量研究, 希望深入理解如癌症等疑难疾病的根源。通过对结构光照明获取的超分辨图像开展的定量研究发现, 空间曲率指标能够高灵敏地反映内质网的空间重塑特征^[124]。进一步地, 将空间取向、方向方差和空间曲率等定量表征指标进行融合, 综合获取形态学的变化特征。通过上述多指标融合的定量研究, 首次发现了一种全新的与微管相关的内质网生长机制, 并将其命名为 Hooking, 如图 20 所示。这种机制在形态学特征上与现有的三种被广泛承认的内质网生长机制具有显著的差异。

3.3 纤维状结构直径定量表征

对于某些特定的纤维状结构, 如血管等, 其尺寸信息的改变能高灵敏地反映出生理病理的变化。近期, Meng 等^[125]提出了一种纤维状结构二维和三维直径定量表征方法, 并将其用于鼠脑血管空间形态的研究中。该算法先进行二值化处理以从背景中识别出血管像素, 并计算每一个血管像素点到背景的最小距离, 再执行自适应直径传输算法, 让垂直于血管的不同像素点有近似相同的直径值。为模拟血管直径的连续变化, 使用自适应相关算子对结果进行平滑处理, 最终利用伪彩色编码得到血管的直径图。进一步地, 通过模拟的三维纤维状结构测试了该算法的准确性。分析结果显示, 当纤维状结构倾角小于 5.14° 时, 算法误差小于

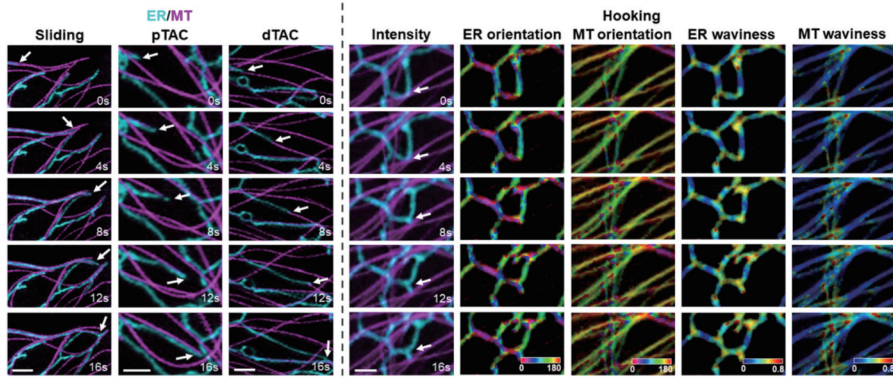


图 20 全新内质网生长机制 Hooking^[124]

Fig. 20 New endoplasmic reticulum growth mechanism named Hooking^[124]

5%。然而,通常锥形血管的倾斜度在 2° 左右,故该算法在血管定量表征的实际应用中足够精准。

基于直径定量表征方法,研究分析了脑血管血栓形成对邻近血管的影响^[125]。实验诱导小鼠体内光血栓产生,并观察血栓产生和恢复过程中血管的形态学变化,如图 21(a) 所示。从图 21(b)、(c)可知,直径定量表征算法可获得光血栓形成前后的血管直径信息,

并用白色虚线圈标出两个血栓的形成部位。血液的高速流动会使得这些轻微的阻塞最终被冲走,故最终两个被阻塞的毛细血管一个接一个地恢复,如图 21(d)、(e)所示。血管的定量直径图谱清楚地表明,该分析方法不仅可以描述生理活动的形态学特点,还能准确捕捉病变血管在不同阶段的动态变化,对于研究血栓的形成和变化具有重要意义。

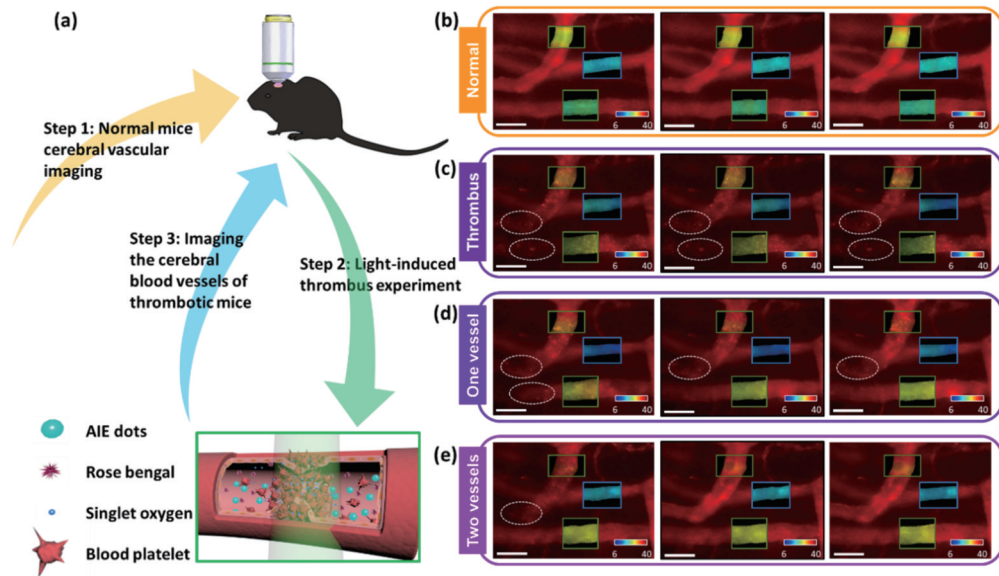


图 21 光性血栓的形成与恢复示意图^[125]。(a)激光诱导小鼠脑血管血栓形成示意图;光性血栓(b)发生前和(c)发生后不同时间点的脑血管直径表征结果,白色虚线圈表示血栓形成区域;(d)高速血液流动导致一个轻微阻塞被冲走过程中的血管直径图谱;(e)两处轻微阻塞均被血流冲走时相应区域的血管直径图谱

Fig. 21 Schematic diagram of generation and recovery of photothrombotic obstruction^[125]. (a) Schematic diagram of laser-induced cerebrovascular thrombosis in mice; thickness characterization results of cerebrovascular at different time points (b) before and (c) after photothrombotic obstruction, with white dashed circles indicating choked regions; (d) corresponding thickness maps of blood vessels, with one slight obstruction flushed away due to high-speed blood flow; (e) thickness quantification results of corresponding regions, with both slight obstructions flushed away by blood flow

4 结束语

对生物组织大深度定量光学成像的研究进行了相关阐述,重点介绍了浙江大学光电科学与工程学院近年来在 OCT、三光子荧光成像、AO 和图像定量表征领

域中的一些研究和成果。在结构 OCT 的基础上,重点拓展了功能性 OCT,特别是在血流成像/血管造影 OCT 方面开展了积极尝试,对于揭示生物组织的生理病理具有重要价值。在三光子荧光成像研究方面,通过引入聚集诱导发光材料,显著提高了荧光信号强度,

从而拓展了成像深度。在软硬件方面的有益探索为 AO 技术的相关研究注入了新的活力。这些工作为生物组织大深度成像未来的发展提供了参考和借鉴。由此可见,先进的光学成像手段辅以特定的光学材料、波前探测元器件和深度学习等算法使得生物组织的成像深度不断拓展,进一步延展了人们对生命活动的观测能力。与此同时,对这些光学图像进行高精度、高灵敏的定量表征,能够精准揭示生物组织在生理病理过程中所发生的微小改变,进而提高人们对疾病的认知水平,并为多种重要疾病的诊疗提供新的视角和方法。

参 考 文 献

- [1] Fercher A F, Drexler W, Hitzenberger C K, et al. Optical coherence tomography-principles and applications [J]. Reports on Progress in Physics, 2003, 66(2): 239-303.
- [2] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [3] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. Nature Photonics, 2013, 7(3): 205-209.
- [4] Wang K, Horton N G, Xu C. Going deep: brain imaging with multi-photon microscopy[J]. Optics and Photonics News, 2013, 24(11): 32-39.
- [5] Pearson J E, Hansen S. Experimental studies of a deformable-mirror adaptive optical system[J]. Journal of the Optical Society of America, 1977, 67(3): 325-333.
- [6] Hardy J W. Active optics: a new technology for the control of light[J]. Proceedings of the IEEE, 1978, 66(6): 651-697.
- [7] Grosso R P, Yellin M. The membrane mirror as an adaptive optical element[J]. Journal of the Optical Society of America, 1977, 67(3): 399-406.
- [8] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(3): 161-174.
- [9] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2(11): 793-805.
- [10] Abbott N J, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2006, 7(1): 41-53.
- [11] Tomlins P H, Wang R K. Theory, developments and applications of optical coherence tomography[J]. Journal of Physics D, 2005, 38(15): 2519-2535.
- [12] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography[J]. Science, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [13] 李培, 杨姗姗, 丁志华, 等. 傅里叶域光学相干层析成像技术的研究进展[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207011. Li P, Yang S S, Ding Z H, et al. Research progress in Fourier domain optical coherence tomography[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207011.
- [14] Wang C, Ding Z H, Mei S T, et al. Ultralong-range phase imaging with orthogonal dispersive spectral-domain optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2012, 37(21): 4555-4557.
- [15] Li P, Ding Z H, Ni Y, et al. Visualization of the ocular pulse in the anterior chamber of the mouse eye *in vivo* using phase-sensitive optical coherence tomography[J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(9): 090502.
- [16] Sharma U, Kang J U. Common-path optical coherence tomography with side-viewing bare fiber probe for endoscopic optical coherence tomography[J]. Review of Scientific Instruments, 2007, 78(11): 113102.
- [17] Moon S, Piao Z L, Kim C S, et al. Lens-free endoscopy probe for optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2013, 38(12): 2014-2016.
- [18] Lee J, Chae Y, Ahn Y C, et al. Ultra-thin and flexible endoscopy probe for optical coherence tomography based on stepwise transitional core fiber[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(5): 1782-1796.
- [19] Ding Z, Qiu J, Shen Y, et al. Lens-free all-fiber probe with an optimized output beam for optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2017, 42(14): 2814-2817.
- [20] Li P, Reif R, Zhi Z W, et al. Phase-sensitive optical coherence tomography characterization of pulse-induced trabecular meshwork displacement in *ex vivo* non-human primate eyes[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(7): 076026.
- [21] Gao S S, Jia Y L, Zhang M, et al. Optical coherence tomography angiography[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2016, 57(9): OCT27-OCT36.
- [22] Xing F J, Lee J H, Polucha C, et al. Three-dimensional imaging of spatio-temporal dynamics of small blood capillary network in the cortex based on optical coherence tomography: a review[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2019, 13(11): 2030002.
- [23] Zhang A Q, Zhang Q Q, Chen C L, et al. Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison[J]. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20(10): 100901.
- [24] Kashani A H, Chen C L, Gahm J K, et al. Optical coherence tomography angiography: a comprehensive review of current methods and clinical applications[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2017, 60: 66-100.
- [25] Chen C L, Wang R K. Optical coherence tomography based angiography[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(2): 1056-1082.
- [26] Jia Y L, Bailey S T, Wilson D J, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration[J]. Ophthalmology, 2014, 121(7): 1435-1444.
- [27] Chu Z D, Lin J, Gao C, et al. Quantitative assessment of the retinal microvasculature using optical coherence tomography angiography[J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(6): 066008.
- [28] Chalam K V, Sambhav K. Optical coherence tomography angiography in retinal diseases[J]. Journal of

- Ophthalmic & Vision Research, 2016, 11(1): 84-92.
- [29] Roisman L, Zhang Q Q, Wang R K, et al. Optical coherence tomography angiography of asymptomatic neovascularization in intermediate age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(6): 1309-1319.
- [30] Liew Y M, McLaughlin R A, Gong P J, et al. *In vivo* assessment of human burn scars through automated quantification of vascularity using optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(6): 061213.
- [31] Baran U, Choi W J, Wang R K. Potential use of OCT-based microangiography in clinical dermatology[J]. *Skin Research and Technology*, 2016, 22(2): 238-246.
- [32] Ulrich M, Themstrup L, de Carvalho N, et al. Dynamic optical coherence tomography in dermatology[J]. *Dermatology*, 2016, 232(3): 298-311.
- [33] Baran U, Wang R K. Review of optical coherence tomography based angiography in neuroscience[J]. *Neurophotonics*, 2016, 3(1): 010902.
- [34] Shin P, Choi W, Joo J, et al. Quantitative hemodynamic analysis of cerebral blood flow and neurovascular coupling using optical coherence tomography angiography [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2019, 39(10): 1983-1994.
- [35] Jia Y L, Li P, Wang R K. Optical microangiography provides an ability to monitor responses of cerebral microcirculation to hypoxia and hyperoxia in mice[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(9): 096019.
- [36] Jia Y L, Wang R K. Label-free *in vivo* optical imaging of functional microcirculations within meninges and cortex in mice[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2010, 194(1): 108-115.
- [37] Park K S, Shin J G, Qureshi M M, et al. Deep brain optical coherence tomography angiography in mice: *in vivo*, noninvasive imaging of hippocampal formation [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 11614.
- [38] Yang S S, Liu K Z, Yao L, et al. Correlation of optical attenuation coefficient estimated using optical coherence tomography with changes in astrocytes and neurons in a chronic photothrombosis stroke model[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(12): 6258-6271.
- [39] Yang S Z, Liu L W, Chang Y X, et al. *In vivo* mice brain microcirculation monitoring based on contrast-enhanced SD-OCT[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2019, 12(1): 1950001.
- [40] Vakoc B J, Lanning R M, Tyrrell J A, et al. Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment *in vivo* using optical frequency domain imaging[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(10): 1219-1223.
- [41] Braaf B, Donner S, Nam A S, et al. Complex differential variance angiography with noise-bias correction for optical coherence tomography of the retina [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(2): 486-506.
- [42] Enfield J, Jonathan E, Leahy M. *In vivo* imaging of the microcirculation of the volar forearm using correlation mapping optical coherence tomography (cmOCT) [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(5): 1184-1193.
- [43] Gao S S, Jia Y L, Liu L, et al. Compensation for reflectance variation in vessel density quantification by optical coherence tomography angiography[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(10): 4485-4492.
- [44] de Carlo T E, Romano A, Waheed N K, et al. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA) [J]. *International Journal of Retina and Vitreous*, 2015, 1: 5.
- [45] Li P, Huang Z Y, Yang S S, et al. Adaptive classifier allows enhanced flow contrast in OCT angiography using a histogram-based motion threshold and 3D Hessian analysis-based shape filtering[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(23): 4816-4819.
- [46] Nam A S, Chico-Calero I, Vakoc B J. Complex differential variance algorithm for optical coherence tomography angiography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(11): 3822-3832.
- [47] Zhang A Q, Wang R K. Feature space optical coherence tomography based micro-angiography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(5): 1919-1928.
- [48] Cheng Y X, Guo L, Pan C, et al. Statistical analysis of motion contrast in optical coherence tomography angiography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11): 116004.
- [49] Guo L, Li P, Pan C, et al. Improved motion contrast and processing efficiency in OCT angiography using complex-correlation algorithm[J]. *Journal of Optics*, 2016, 18(2): 025301.
- [50] Huang L Z, Fu Y M, Chen R X, et al. SNR-adaptive OCT angiography enabled by statistical characterization of intensity and decorrelation with multi-variate time series model[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2019, 38(11): 2695-2704.
- [51] Li H K, Liu K Y, Cao T T, et al. High performance OCTA enabled by combining features of shape, intensity, and complex decorrelation[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(2): 368-371.
- [52] Yang S S, Liu K Z, Ding H J, et al. Longitudinal *in vivo* intrinsic optical imaging of cortical blood perfusion and tissue damage in focal photothrombosis stroke model[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2019, 39(7): 1381-1393.
- [53] Chen R X, Yao L, Liu K Y, et al. Improvement of decorrelation-based OCT angiography by an adaptive spatial-temporal kernel in monitoring stimulus-evoked hemodynamic responses[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2020, 39(12): 4286-4296.
- [54] Deng X F, Liu K Y, Zhu T P, et al. Dynamic inverse SNR-decorrelation OCT angiography with GPU acceleration[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(6): 3615-3628.
- [55] Zhang Y, Yao L, Yang F, et al. INS-fOCT: a label-free, all-optical method for simultaneously manipulating and mapping brain function[J]. *Neurophotonics*, 2020, 7(1): 015014.

- [56] McNichols R J, Cote G L. Optical glucose sensing in biological fluids: an overview[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2000, 5(1): 5-16.
- [57] Shokrehodaie M, Quinones S. Review of non-invasive glucose sensing techniques: optical, electrical and breath acetone[J]. *Sensors*, 2020, 20(5): 1251.
- [58] De Pretto L R, Yoshimura T M, Ribeiro M S, et al. Optical coherence tomography for blood glucose monitoring *in vitro* through spatial and temporal approaches[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(8): 086007.
- [59] Larin K V, Motamedi M, Ashitkov T V, et al. Specificity of noninvasive blood glucose sensing using optical coherence tomography technique: a pilot study[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2003, 48(10): 1371-1390.
- [60] Liu K Y, Zhu T P, Yao L, et al. Noninvasive OCT angiography-based blood attenuation measurements correlate with blood glucose level in the mouse retina[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(8): 4680-4688.
- [61] Yao L, Li H K, Liu K Y, et al. Endoscopic optical coherence tomography angiography using inverse SNR-amplitude decorrelation features and electrothermal micro-electro-mechanical system raster scan[J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2022, 12(6): 3078-3091.
- [62] Yao L, Zhou Y, Liu K Y, et al. Endoscopic OCT angiography using clinical proximal-end scanning catheters[J]. *Photonics*, 2022, 9(5): 329.
- [63] Wang T Y, Xu C. Three-photon neuronal imaging in deep mouse brain[J]. *Optica*, 2020, 7(8): 947-960.
- [64] Cheng L C, Horton N G, Wang K, et al. Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3427-3433.
- [65] Ouzounov D G, Wang T Y, Wang M R, et al. *In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 388-390.
- [66] Wang T Y, Ouzounov D G, Wu C Y, et al. Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(10): 789-792.
- [67] Chen D X, Chen G, Jiang W, et al. Association of the collagen signature in the tumor microenvironment with lymph node metastasis in early gastric cancer[J]. *JAMA Surgery*, 2019, 154(3): e185249.
- [68] Cheng H, Tong S, Deng X Q, et al. *In vivo* deep-brain imaging of microglia enabled by three-photon fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(18): 5271-5274.
- [69] Liu H J, Deng X Q, Tong S, et al. *In vivo* deep-brain structural and hemodynamic multiphoton microscopy enabled by quantum dots[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(8): 5260-5265.
- [70] Wang Y L, Chen M, Alifu N, et al. Aggregation-induced emission luminogen with deep-red emission for through-skull three-photon fluorescence imaging of mouse [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(10): 10452-10461.
- [71] Alifu N, Zebibula A, Zhang H Q, et al. NIR-IIb excitable bright polymer dots with deep-red emission for *in vivo* through-skull three-photon fluorescence bioimaging[J]. *Nano Research*, 2020, 13(10): 2632-2640.
- [72] Qin W, Alifu N, Lam J W Y, et al. Facile synthesis of efficient luminogens with AIE features for three-photon fluorescence imaging of the brain through the intact skull [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(23): 2000364.
- [73] Ni H W, Xu Z C, Li D Y, et al. Aggregation-induced emission luminogen for *in vivo* three-photon fluorescence lifetime microscopic imaging[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2019, 12(5): 1940005.
- [74] Li D Y, Zhang H Q, Chu L L, et al. Photosensitizer doped colloidal mesoporous silica nanoparticles for three-photon photodynamic therapy[J]. *Optical and Quantum Electronics*, 2015, 47(8): 3081-3090.
- [75] Wang S W, Li X Q, Chong S Y, et al. *In vivo* three-photon imaging of lipids using ultrabright fluorogens with aggregation-induced emission[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(11): 2007490.
- [76] Choe K, Hontani Y, Wang T Y, et al. Intravital three-photon microscopy allows visualization over the entire depth of mouse lymph nodes[J]. *Nature Immunology*, 2022, 23(2): 330-340.
- [77] Streich L, Boffi J C, Wang L, et al. High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(10): 1253-1258.
- [78] Zhang C, Feng W, Zhao Y J, et al. A large, switchable optical clearing skull window for cerebrovascular imaging [J]. *Theranostics*, 2018, 8(10): 2696-2708.
- [79] Li D Y, Zheng Z, Yu T T, et al. Visible-near infrared-II skull optical clearing window for *in vivo* cortical vasculature imaging and targeted manipulation[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(10): e202000142.
- [80] He M B, Li D Y, Zheng Z, et al. Ultra-deep through-skull mouse brain imaging via the combination of skull optical clearing and three-photon microscopy[EB/OL]. (2021-12-21)[2022-02-04]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.20.473469v1.full.pdf+html>.
- [81] Xu Z R, Zhang Z J, Deng X Q, et al. Deep-brain three-photon imaging enabled by aggregation-induced emission luminogens with near-infrared-III excitation[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(4): 6712-6724.
- [82] Ni H W, Wang Y L, Tang T, et al. Quantum dots assisted *in vivo* two-photon microscopy with NIR-II emission[J]. *Photonics Research*, 2022, 10(1): 189-196.
- [83] Li B, Wu C Y, Wang M R, et al. An adaptive excitation source for high-speed multiphoton microscopy[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 163-166.
- [84] Muth F, Healy S D. The role of adult experience in nest building in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*[J]. *Animal Behaviour*, 2011, 82(2): 185-189.
- [85] 姜文汉. 自适应光学发展综述[J]. *光电工程*, 2018, 45(3): 170489.

- Jiang W H. Overview of adaptive optics development[J]. Opto-Electronic Engineering, 2018, 45(3): 170489.
- [86] Booth M J, Débarre D, Jesacher A. Adaptive optics for biomedical microscopy[J]. Optics and Photonics News, 2012, 23(1): 22-29.
- [87] Ragazzoni R. Pupil plane wavefront sensing with an oscillating prism[J]. Journal of Modern Optics, 1996, 43(2): 289-293.
- [88] Tyson R K, Wizinowich P L. Principles of adaptive optics[J]. Physics Today, 1992, 45(2): 100.
- [89] Hampson K M, Turcotte R, Miller D T, et al. Adaptive optics for high-resolution imaging[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2021, 1: 68.
- [90] Albert O, Sherman L, Mourou G, et al. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy [J]. Optics Letters, 2000, 25(1): 52-54.
- [91] Booth M J, Neil M A A, Juskaitis R, et al. Adaptive aberration correction in a confocal microscope[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(9): 5788-5792.
- [92] Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy[J]. Optics Express, 2008, 16(13): 9290-9305.
- [93] Débarre D, Botcherby E J, Watanabe T, et al. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy[J]. Optics Letters, 2009, 34(16): 2495-2497.
- [94] Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens[J]. Optics Express, 2012, 20(19): 20998-21009.
- [95] Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues[J]. Nature Methods, 2010, 7(2): 141-147.
- [96] Ji N, Sato T R, Betzig E. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during *in vivo* imaging in the mouse cortex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(1): 22-27.
- [97] Cui M. Parallel wavefront optimization method for focusing light through random scattering media[J]. Optics Letters, 2011, 36(6): 870-872.
- [98] Tang J Y, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8434-8439.
- [99] Kong L J, Cui M. *In vivo* fluorescence microscopy via iterative multi-photon adaptive compensation technique [J]. Optics Express, 2014, 22(20): 23786-23794.
- [100] Yan W, Yang Y L, Tan Y, et al. Coherent optical adaptive technique improves the spatial resolution of STED microscopy in thick samples[J]. Photonics Research, 2017, 5(3): 176-181.
- [101] Wu C X, Chen J J, Si K, et al. Aberration corrections of doughnut beam by adaptive optics in the turbid medium [J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(11): e201900125.
- [102] Paine S W, Fienup J R. Machine learning for improved image-based wavefront sensing[J]. Optics Letters, 2018, 43(6): 1235-1238.
- [103] Jin Y C, Zhang Y Y, Hu L J, et al. Machine learning guided rapid focusing with sensor-less aberration corrections[J]. Optics Express, 2018, 26(23): 30162-30171.
- [104] Nishizaki Y, Valdivia M, Horisaki R, et al. Deep learning wavefront sensing[J]. Optics Express, 2019, 27(1): 240-251.
- [105] Hu S W, Hu L J, Gong W, et al. Deep learning based wavefront sensor for complex wavefront detection in adaptive optical microscopes[J]. Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering, 2021, 22(10): 1277-1288.
- [106] Zheng Y, Chen J J, Wu C X, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy based on deep learning [J]. Cytometry Part A, 2021, 99(6): 622-631.
- [107] Hu L J, Hu S W, Gong W, et al. Image enhancement for fluorescence microscopy based on deep learning with prior knowledge of aberration[J]. Optics Letters, 2021, 46(9): 2055-2058.
- [108] Hu L J, Hu S W, Gong W, et al. Learning-based Shack-Hartmann wavefront sensor for high-order aberration detection[J]. Optics Express, 2019, 27(23): 33504-33517.
- [109] 林宏心, 左宁, 卓双木, 等. 多光子显微技术在医学诊断中的应用[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207014.
Lin H X, Zuo N, Zhuo S M, et al. Application of multiphoton microscopy in disease diagnosis[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207014.
- [110] 刘智毅, 孟佳, 邱建榕, 等. 生物组织纤维状结构空间取向的精准表征与应用[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207002.
Liu Z Y, Meng J, Qiu J R, et al. Accurate characterization of spatial orientations of fiber-like structures in biological tissues and its applications[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207002.
- [111] Napadow V J, Chen Q, Mai V, et al. Quantitative analysis of three-dimensional-resolved fiber architecture in heterogeneous skeletal muscle tissue using NMR and optical imaging methods[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(6): 2968-2975.
- [112] Altendorf H, Decencièrre E, Jeulin D, et al. Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils[J]. Journal of Microscopy, 2012, 247(2): 161-175.
- [113] Schriebl A J, Zeindlinger G, Pierce D M, et al. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries[J]. Journal of the Royal Society, 2012, 9(71): 1275-1286.
- [114] Barnes C, Speroni L, Quinn K P, et al. From single cells to tissues: interactions between the matrix and human breast cells in real time[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93325.
- [115] Zemel A, Rehfeldt F, Brown A E X, et al. Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells[J]. Nature Physics, 2010, 6(6): 468-473.

- [116] Sivaguru M, Durgam S, Ambekar R, et al. Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging[J]. *Optics Express*, 2010, 18(24): 24983-24993.
- [117] Bancelin S, Nazac A, Ibrahim B H, et al. Determination of collagen fiber orientation in histological slides using Mueller microscopy and validation by second harmonic generation imaging[J]. *Optics Express*, 2014, 22(19): 22561-22574.
- [118] Lau T Y, Ambekar R, Toussaint K C. Quantification of collagen fiber organization using three-dimensional Fourier transform-second-harmonic generation imaging [J]. *Optics Express*, 2012, 20(19): 21821-21832.
- [119] Liu Z Y, Quinn K P, Speroni L, et al. Rapid three-dimensional quantification of voxel-wise collagen fiber orientation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(7): 2294-2310.
- [120] Liu Z Y, Pouli D, Sood D, et al. Automated quantification of three-dimensional organization of fiber-like structures in biological tissues[J]. *Biomaterials*, 2017, 116: 34-47.
- [121] Ambekar R, Lau T Y, Walsh M, et al. Quantifying collagen structure in breast biopsies using second-harmonic generation imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(9): 2021-2035.
- [122] Nair S N, Dasari A, Yue C Y, et al. Failure behavior of unidirectional composites under compression loading: effect of fiber waviness[J]. *Materials*, 2017, 10(8): 909.
- [123] Qian S H, Meng J, Feng Z, et al. Mapping organizational changes of fiber-like structures in disease progression by multi-parametric, quantitative imaging[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2022, 16(6): 2100576.
- [124] Qian S H, Meng J, Liu W J, et al. Identification of endoplasmic reticulum formation mechanism by multi-parametric, quantitative super-resolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(2): 357-360.
- [125] Meng J, Feng Z, Qian S H, et al. Mapping physiological and pathological functions of cortical vasculature through aggregation-induced emission nanoprobe assisted quantitative, *in vivo* NIR-II imaging[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 136: 212760.

约稿专家简介:



丁志华(1967—), 博士, 教授, 博士生导师, 入选教育部“新世纪优秀人才支持计划”。1985年考入浙江大学光学仪器工程学系学习, 1989年6月本科毕业并获学士学位。现任浙江大学激光生物医学研究所所长、中国光学学会生物医学光子学专业委员会副主委、《激光生物学报》副主编, 以及 *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 和 *Journal of Lasers, Optics & Photonics* 编委。长期从事生物医学光子学方面的教学和科研工作, 主要研究方向为光学相干层析成像、光学精密检测等。主持国家高技术研究发展计划课题2项、国家自然科学基金重点项目2项等, 参编教材3部。E-mail: zh_ding@zju.edu.cn。