

近红外二区共聚焦显微技术的进展及应用 (特邀)

李怡霏^{1,2}, 何木斌^{1,2}, 吴天翔^{1,2}, 周 静^{1,2}, 冯 哲^{1,2}, 钱 骏^{1,2*}

- (1. 浙江大学 光电科学与工程学院 先进光子学国际研究中心, 浙江 杭州 310058;
2. 浙江大学 现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 共聚焦显微镜具有较高的空间分辨率和信号背景比, 能对生物样品进行三维层析成像, 在医学与生物学领域有着广泛的应用。近红外二区 (NIR-II, 900~1 880 nm) 波段的光在生物组织中具有适中的吸收、较低的散射, 以及非常弱的生物组织自发荧光, 因此, NIR-II 荧光活体成像具有大深度、高对比度等优势。点激发、点探测的 NIR-II 共聚焦显微技术结合了上述二者的优势, 在大深度生物成像中具有高空间分辨率和高信号背景比等优点, 因此在生物医学领域得到了广泛应用。此综述将从 NIR-II 共聚焦显微技术的原理出发, 阐述其发展进程、以及基于此项技术开展的生物医学成像应用, 探讨 NIR-II 共聚焦显微技术未来的改进和发展方向。

关键词: 共聚焦显微镜; 近红外二区; 活体生物成像

中图分类号: O43 文献标志码: A DOI: 10.3788/IRLA20220494

Progress and application of near-infrared II confocal microscopy (*invited*)

Li Yifei^{1,2}, He Mubin^{1,2}, Wu Tianxiang^{1,2}, Zhou Jing^{1,2}, Feng Zhe^{1,2}, Qian Jun^{1,2*}

- (1. International Research Center for Advanced Photonics, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentations, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Confocal microscopy has high spatial resolution and signal to background ratio, possessing the capability of three-dimensional tomography of biological samples, and thus has been widely used in medicine and biology areas. Light in near-infrared II (NIR-II, 900-1 880 nm) regions fulfils moderate absorption, low scattering in biological tissues, and weak autofluorescence of biological tissues. Therefore, NIR-II *in vivo* fluorescence imaging has the advantages of large depth and high contrast. Point-excitation and point-detection based NIR-II confocal microscopy combines the advantages of the two technologies mentioned above and features high spatial resolution and high signal to background ratio in large-depth biological imaging. Therefore, it has been widely used in the biomedical fields. This review summarizes the principle and the development progress of NIR-II confocal microscopy and the application of biological imaging based on it. The future improvement and development directions of NIR-II confocal microscopy are also discussed.

Key words: confocal microscopy; near-infrared II; *in vivo* bioimaging

收稿日期: 2022-07-19; 修订日期: 2022-09-02

基金项目: 国家自然科学基金 (61975172, 82001874, 61735016)

作者简介: 李怡霏, 女, 博士生, 主要从事近红外二区共聚焦荧光显微术方面的研究。

导师(通讯作者)简介: 钱骏, 男, 教授, 博士, 主要从事生物医学光子学、近红外二区荧光成像、高阶非线性光学显微成像、光学诊疗等方面的研究。

0 引言

荧光显微成像技术是使用荧光染料或荧光蛋白对待测样品进行标记并进行显微成像的技术。由于其具有实时性好、分辨率高、灵敏度高、无辐射等优点,常被用于检测特定生物结构的形态及生物组织内特定分子的存在与空间分布^[1]。相比于普通的宽场荧光显微镜,共聚焦显微镜是一种三点共轭的特殊荧光显微镜。在激发光路上,准直的激光光束经物镜聚焦在样品的单点上,减少了对焦平面上焦点之外区域的激发;在探测光路上,被激发点发射出的荧光通过物镜后,在到达探测面前被再次聚焦到探测针孔,非焦点外的杂散荧光由于无法经过探测针孔而被滤除,使得探测器只接收目标点发出的荧光,从而提高了成像的空间分辨率。在选定深度下通过移动样品台或使用扫描振镜扫描样品以改变激光光束的聚焦点坐标,共聚焦显微镜可以在样品特定深度下重建出高空间分辨率的二维图像,进一步垂直移动样品则可以获得不同深度下的二维图像,即实现光学切片。因此,共聚焦显微镜利用针孔获得了较好的层析能力和空间分辨率,可以在三维空间内对样本进行荧光成像。

共聚焦显微镜在医学与生物学领域有着广泛的应用,如特定分子的定位定量分析^[2]、活细胞实时监测^[3]、组织切片成像^[4]、微小动物成像^[5]等。然而,普通共聚焦显微镜通常应用于细胞和薄组织等样品的观测,很难实现大深度成像。究其原因,主要是普通共聚焦所用的激发光和荧光波长通常位于可见光波段(360~760 nm),此波段的光在生物组织内易受散射的干扰,激发光的散射导致它在大深度的组织中难以形成较好的聚焦光斑,荧光的散射导致深层信号捕捉困难,成像深度低;同时,生物组织在可见光波段具有很强的自发荧光,这会导致成像背景大且信号背景比低。近红外光(NIR, 760~2 500 nm)相比于可见光波段,在生物组织中有着更低的散射和自发荧光,这有利于提高生物成像中的信号背景比。2009年,斯坦福大学戴宏杰教授课题组利用发光波长在 1 100~1 700 nm 的单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, CNTs)实现了首例波长大于 1 000 nm 的活体荧光成像^[6],并将 1 000~1 700 nm 定义为近红外二区(NIR-II)窗口。研究发现,在 NIR-II 波段,荧光在生物组织中有更低的

散射,组织穿透率更高^[6]。自此,NIR-II 荧光生物成像掀起了一股研究热潮。起先,大多数研究者都试图在低光吸收波段中寻找光散射最低的窗口来得到较高的成像质量,因此 NIR-II 窗口被水吸收峰(1 400~1 500 nm)分隔开,并由此定义了 NIR-IIa(1 300~1 400 nm)和 NIR-IIb(1 500~1 700 nm)两个子窗口。2021年,浙江大学钱骏教授课题组^[7]的研究表明,适度的吸收可以优先耗尽传播路径更长的散射背景光,增大弹道光与散射光之比,提高 NIR-II 成像的信噪比,并重新将 NIR-II 定义为 900~1 880 nm,将 1 400~1 500 nm 和 1 700~1 880 nm 分别定义为 NIR-IIx 和 NIR-IIc 子窗口,完善了 NIR-II 的理论。

为实现生物组织中更大深度的成像,2017年,戴宏杰教授团队^[8]首次将共聚焦显微镜扩展到 NIR-II 窗口,对 170 μm 厚的脑组织切片进行了染色与成像,展示了 NIR-II 共聚焦显微成像深度大的潜力。自此,NIR-II 荧光共聚焦显微镜在生物组织中的应用得到快速发展——扫描方式由最初的样品台扫描改进为振镜扫描,成像速度加快;激发光由最初较长波长的 NIR-I 光变为波长更长的 NIR-II 光,发射光的波长则由 NIR-II 逐渐拓展到 NIR-IIb 区、NIR-IIc 区,成像深度得以提升;高灵敏度探测器——超导纳米线单光子探测器(Superconducting Nanowire Single Photon Detector, SNSPD)替代探测效率相对较低的光电倍增管(PMT),实现了深度更大、分辨率更高的活体成像及更精确的荧光寿命成像;以 NIR-II 共聚焦显微系统为基础、与时间相关单光子计数技术(TCSPC)相结合建立的荧光寿命成像系统,扩展了成像维度。文中将从 NIR-II 共聚焦显微技术的原理出发,阐述其发展进程以及基于此项技术开展的生物成像应用,探讨 NIR-II 共聚焦显微技术未来的改进和拓展方向。

1 共聚焦显微技术发展进程

1.1 从宽场荧光显微技术到共聚焦荧光显微技术

宽场荧光显微技术是一种基础且易搭建的荧光显微成像技术;系统由激发光源、二色镜、物镜、滤光片、面探测器组成。特定波长的激发光束经二色镜反射后通过物镜照射于待测样品上,样品中的荧光分子被激发后发射另一波段的荧光,荧光被物镜收集,经过滤光片后被二色镜选择性透过,面探测器只探测荧

光波段的信号,从而得到样品的荧光图像。宽场荧光显微技术采用面激发面探测的方式,时间分辨率高,可以进行实时成像,在脉管显微造影、肿瘤精确分析、炎症准确追踪、血液流速测量等方面有着良好的应用^[9-13]。但宽场荧光显微技术应用于生物医学领域中时,面临着低空间分辨率的问题:激发过程中激发光大面积地照射在样品上,非焦平面的失焦信号光也会被物镜收集形成背景,因此成像分辨率低,层析能力差,无法对样品进行清晰准确的 3D 结构成像。为降低非焦平面干扰信号的影响,目前发展出多种新型成像方法,包括光片显微镜、共聚焦显微镜、多光子显微镜等。其中,光片显微镜采用正交的面激发及面探测方式,使激发的区域局限于焦平面,而焦面外无法被有效激发,从而有效地抑制了背景。但光片显微镜中需要一束由柱面镜形成的平面光波穿过生物组织并在垂直方向上对穿过的薄层成像,因此对生物组织的透明度通常具有较高的要求^[14]。共聚焦荧光显微镜在宽场荧光显微镜的基础上,替换面激发面探测为点激发点探测,一方面增加了扫描装置(可移动的样品台或扫描振镜)以实现样品的三维成像;另一方面增加了针孔以滤除焦点外的背景荧光,降低非焦面信号的干扰,提高了荧光成像的空间分辨率及系统的层析能力。在共聚焦显微镜基础上发展起来的多光子显微镜中,荧光探针同时吸收多个较长波长的光子,发射出一个较短波长的光子,此过程为典型的非线性吸收过程,而多光子的吸收几率相比于单光子吸收几率非常低,因此多光子荧光成像只有在具有更高功率密度的位置即焦点才能发生,由此在焦点处形成天然的针孔,从而实现了层析效果。但与此同时,多光子显微镜需要能够在瞬间将光子集中发射的设备,即高峰值功率、短脉冲的激光——飞秒激光器。而飞秒光源设备比较昂贵,传统的掺钛蓝宝石飞秒激光器的波长调节范围在 690~1 000 nm,更长波段飞秒光的实现则需要采用光参量振荡或光参量放大技术,这限制了多光子显微镜的推广。相比之下,共聚焦显微技术无需昂贵的飞秒激光器,能实现较高空间分辨率的成像,使其在荧光生物样品研究中占有一席之地。

1.2 从可见光/NIR-I 共聚焦显微技术到 NIR-II 共聚焦显微技术

共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 于 1957 年由马

文·明斯基首次提出并获得专利^[15]。1967 年, Egger 和 Petran 成功地应用共聚焦显微镜产生了一个光学切面^[16]。1980 年, Wilson 将激光引入了共聚焦显微镜^[17]。此后,共聚焦显微镜开始逐渐广泛应用于生物样品的荧光成像^[18-21]。传统的可见光共聚焦显微镜用紫外或可见光激发可见光荧光分子,可以在亚细胞水平上观察诸如 Ca^{2+} 、pH 值、膜电位等生理信号、观测细胞中蛋白质的表达情况、得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像,还可以应用于微小生物如线虫的形态成像等^[22-25]。然而,生物组织如皮肤、肌肉、脂肪对短波长的紫外和可见光散射严重,且血红蛋白对 430 nm 左右的光又有着强烈的吸收,因此可见光共聚焦显微镜中位于紫外或可见光波段的激发光在组织中衰减大,难以激发深层组织中的荧光分子;由于可见光荧光分子的发射峰位于可见光波段,此波段的光在生物组织中的严重散射则会导致深层组织中的信号光探测困难,因此可见光共聚焦成像中激发和发射光的波段限制了共聚焦系统在大深度荧光成像中的应用,其观测对象常局限于细胞及厚度较薄的组织样品。

相比于可见光波段,近红外一区 (NIR-I, 760~900 nm) 波段光的优势为大深度荧光生物成像提供了可能:首先, NIR-I 波段的光在生物组织中有着相对较小的散射,因此 NIR-I 激发光可以聚焦于更深层的样本区域, NIR-I 发射光在生物组织中损耗小,更有利于荧光信号捕获;且生物组织在 NIR-I 波段的自发荧光少,成像过程中背景噪声下降。2014 年,浙江大学钱骏教授课题组^[26]基于共聚焦显微成像系统,并结合 NIR-I 波段在生物成像中的优势,建立了一套 NIR-I 共聚焦荧光显微成像系统 (NIR-LSCM)。该系统基于商用共聚焦显微镜,并使用在 400~1 600 nm 光波段具有良好透过率的物镜进行成像。成像所用的激发光波长为 635 nm,这比传统共聚焦的蓝光、绿光激发光波长更长,在生物组织中散射小,能够在较大深度的生物样品中实现良好聚焦;同时,相比于传统共聚焦中的可见光发射波段,所使用的近红外荧光染料 IR-820 纳米颗粒发射的 NIR-I 荧光在生物组织中同样损耗小,这有助于探测到深层组织的信号。最终,他们使用 NIR-LSCM 系统对活体小鼠脑部血管实现了 500 μm 深度的显微成像 (图 1),达到了可见光共聚焦

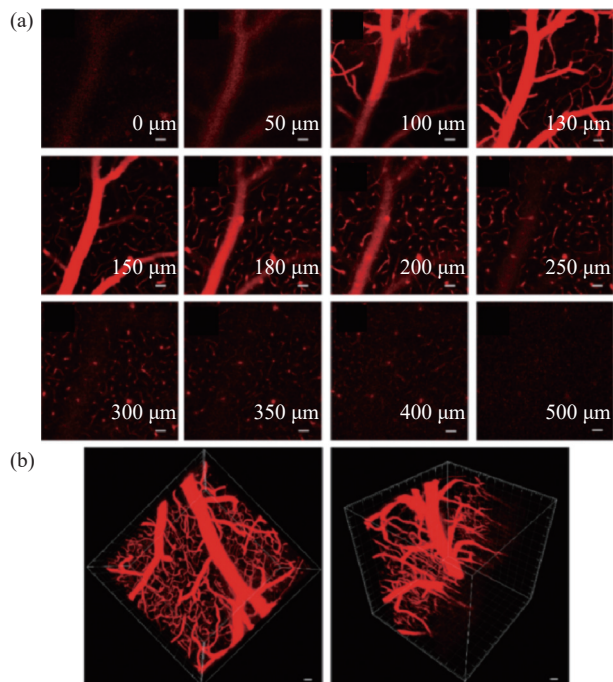


图 1 IR820 标记的小鼠大脑血管的 NIR-I 荧光共聚焦显微成像^[26]。(a) 不同垂直深度下 (0~500 μm) 的小鼠脑血管荧光显微镜图像; (b) 小鼠脑血管的三维重建图像, 比例尺: 50 μm

Fig.1 NIR-I fluorescence confocal microscopic images of blood vessels of the mouse brain stained with IR820^[26]. (a) Fluorescence microscopic images of blood vessels in the mouse brain at various vertical depths (0-500 μm); (b) 3D reconstructive images of blood vessels of the mouse brain. Scale bar: 50 μm

荧光显微成像系统难以获得的对比度和深度。

在 NIR-II 波段中, 生物组织中水吸收的存在抑制了散射背景, 弹道光与散射光之比可以更高, 进而提升了成像的信号背景比。基于 NIR-II 窗口相较于 NIR-I 窗口和可见光波段的优势, 共聚焦显微技术也在向 NIR-II 波段拓展。NIR-II 荧光共聚焦显微镜的激发通常采用波长更长、散射更小的 NIR-I 窗口光 (如 785 nm、793 nm 或 808 nm), 并使用发射波段在 NIR-II 窗口的荧光分子。在此过程中, 探测器的改进与发展也为共聚焦系统中的波长扩展打下了基础。最初适用于可见光共聚焦系统的探测器为 GaAs PMT, 其量子效率仅有 20%, 随后磷化砷化镓 (GaAsP) PMT 的出现提供了一种提高灵敏度的方法, 但也仅在 400~650 nm 范围内有较高的探测效率 (QE 为 40%), 难以探测 NIR-II 波段的荧光^[27]。之后出现的在近红外区域具有灵敏度的热电冷却 InGaAs 光电倍增

管 H12397-75 PMT, 可以以相对较高的效率实现 950~1700 nm 波段光信号的探测, 这为 NIR-II 荧光共聚焦显微技术在生物成像中的应用打下基础。2017 年, 斯坦福大学戴宏杰院士团队^[8]基于该 PMT 将 NIR-II 窗口与共聚焦显微技术结合, 收集了 1100 nm 以上波段的荧光, 实现了小鼠脑组织切片的 NIR-II 荧光共聚焦显微成像, 拉开了 NIR-II 荧光共聚焦显微技术的序幕。此后, NIR-II 共聚焦显微技术因其能更清晰地展示出深层生物组织形态特征的优势, 在动物脑血管、肿瘤、组织切片等的观测上逐渐获得广泛的应用。

1.3 转盘式共聚焦

激光扫描共聚焦显微镜通过激光逐点扫描样品激发目标点的荧光分子, 用点探测器 PMT 来探测荧光, 虽然成像清晰, 但是点扫描的过程及 PMT 的低光电转换效率导致成像速度比较慢。为了进行快速成像, 转盘式共聚焦显微镜 (SDCM) 逐渐发展起来。1884 年, Nipkow 首次提出了使用旋转圆盘生成图像的概念^[28], 1968 年以此概念为基础实现了第一台商业转盘式共聚焦仪器^[29]。1992 年, 横河电力公司 (日本东京) 发明了一种微透镜阵列盘, 并将其完美耦合在针孔阵列盘之中, 使得光通过微透镜聚焦到针孔阵列中, 这成为后续多数转盘式共聚焦系统的结构 (美国专利号 5162941)^[27]。目前的转盘式共聚焦系统通常也包括一个微透镜阵列盘和一个针孔阵列盘, 激发光通过多个微透镜 (~1000 个) 后形成多个微光束, 穿过针孔阵列照射在样品上, 同时激发样品上的多个目标点, 激发出的光信号再次通过小孔滤除杂散光, 所得到的焦平面信号最终成像在电子倍增相机 (EMCCD) 上^[30]。随着转盘转动, 针孔就扫描图像上对应的一块区域, 以此来实现对样品的完整扫描。转盘式共聚焦通过转动转盘的方式实现了多点同步扫描, 不仅大大提高了采集速度, 也意味着可以使用量子效率较高的面阵相机取代 PMT, 从而可以降低激发光功率, 减小对荧光分子的光漂白和对生物样品的光损伤。

转盘式共聚焦在生物中的应用不局限于可见光波段, 在 NIR-II 窗口也有应用: 2018 年, Vitalijs Zubkovs 等人^[31]使用 NIR-II 转盘式共聚焦成像系统 (图 2(a)) 对荧光珠进行成像 (图 2(b)), 实现了 (0.5±0.1) μm 的横向分辨率和 (0.6±0.1) μm 的轴向分辨率, 与相应的

宽场显微成像相比,横向和轴向分辨率分别提高了 17% 和 45%,层析能力也显著提升(图 2(c))。这项工作利用转盘式共聚焦快速成像的特点,使系统的最大理论采集速度可以达到 18000 fps,实际的成像速度受

限于 InGaAs 探测器的响应速度以及荧光团的亮度,而并不受限于扫描过程。然而,这项工作中使用的微透镜转盘仍为普通商用可见光增透的微透镜转盘,对红外光的透过率较低,且并未应用于活体成像之中。

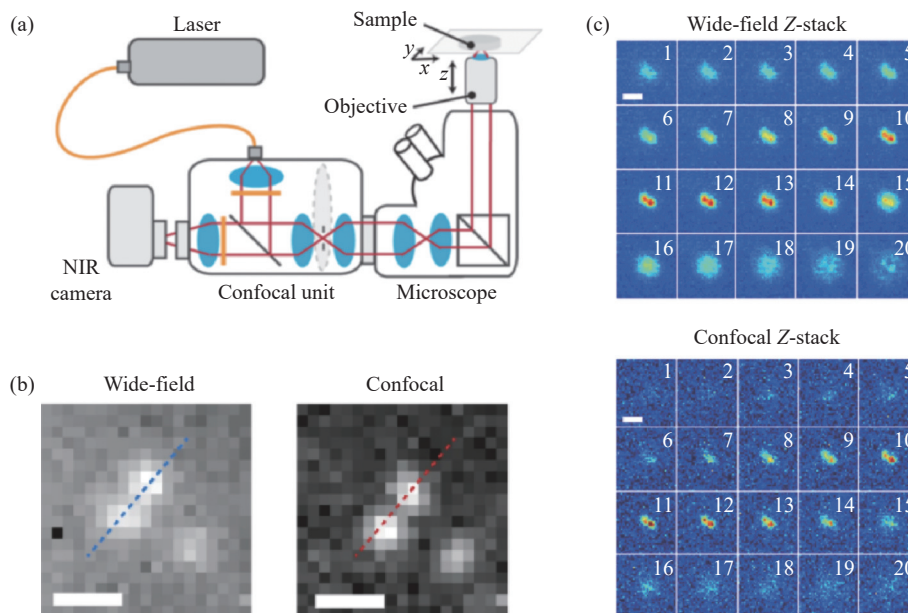


图 2 NIR-II 转盘式共聚焦显微技术的应用^[31]。(a) NIR-II 转盘式共聚焦显微技术的光路示意图; (b) 宽场(左)和转盘式(右)共聚焦显微镜对 (186±48) nm NIR 荧光珠成像的比较,比例尺: 1 μm; (c) 荧光珠的宽场(上)和共聚焦(下)显微成像的层析图,比例尺: 2 μm

Fig.2 The application of NIR-II spinning-disc confocal microscopy^[31]. (a) Optical layout of the NIR-II spinning-disc confocal microscopy; (b) Comparison of wide-field (left) and spinning-disc(right) confocal microscope imaging for (186±48) nm NIR fluorescent beads. Scale bar: 1 μm; (c) Z-stack projection of wide-field (top) and confocal (bottom) microscopic images of the fluorescent beads. Scale bar: 2 μm

相比于逐点扫描式共聚焦,转盘式共聚焦具有成像速度快、光损伤小等独特的优势,但它也存在很多问题,例如系统中的针孔转盘以及微透镜转盘需要实时一一对应、系统昂贵、控制过程复杂且困难;而且转盘式共聚焦系统中针孔大小不可调节,无法调节成像的空间分辨率。因此,转盘式共聚焦发展历程相对缓慢。

2 点激发点探测 NIR-II 荧光共聚焦显微技术的发展

相比于转盘式共聚焦显微镜,逐点激发逐点探测的扫描式共聚焦系统更为简单,发展更为迅速。扫描式共聚焦显微镜是一种光学、机械、电子组件和图像采集软件组合而成的系统,包括激光源、共聚焦扫描显微镜(包括物镜、针孔、扫描振镜和光学显微镜

等)、探测器、计算机、图象输出设备以及相关分析软件。成像过程中,激光源通过物镜聚焦于样品的某一点,该样品点的荧光分子被激发后,所产生的荧光通过针孔和滤光片被光电探测器所接收,并记录下该样品点的荧光强度。通过扫描单元改变激发点照射在样品上的位置,记录下每一个样品点的荧光强度并通过相关分析软件重构出整个样品的荧光强度图像。

逐点激发逐点探测的扫描式共聚焦系统最初是通过移动样品台的方式完成对整个样品的扫描,这种扫描方式不需要激光扫描模块,所对应的光学系统相对简单,但扫描速度受限于样品台的移动速度,一个像素通常需要停留几个毫秒的时间,成像速度相对较慢。2017年,戴宏杰院士课题组^[8]搭建了基于移动样品台完成扫描的 NIR-II 荧光共聚焦显微装置,使用发射波长约 1100 nm、量子产率(QY)为 1.9%的 NIR-

II 荧光团-抗体偶联物 IR-FGP 对神经元进行标记, 采用自制的样品台扫描共聚焦显微装置进行扫描。然而, 受限于荧光染料的亮度, 需要延长积分时间以获得良好的探测效率及成像效果, 最终以 2.5 ms/pixel 的低扫描速度完成了 170 μm 厚脑组织切片的 3D 成像。对于发射波长在 NIR-II 的 IR-FGP 通道, 使用 785 nm 的激光器进行激发, 采用 100 \times 物镜 (型号: UPLFLN100 XOI2, 奥林巴斯) 以提高空间分辨率, 并

使用 H12397-75 PMT 探测 1 050~1 300 nm 的荧光。在样品台扫描共聚焦显微装置 (图 3 (a)) 的帮助下, 戴宏杰院士课题组^[32] 还使用 NIR-II 荧光探针 IR-FEPC 在小鼠卵巢模型中实现了 900 μm 穿透深度和微米级空间分辨率的 NIR-II 荧光结构成像, 区分了细胞膜细胞、颗粒细胞和黄体富集细胞这三个不同的卵巢发育阶段。

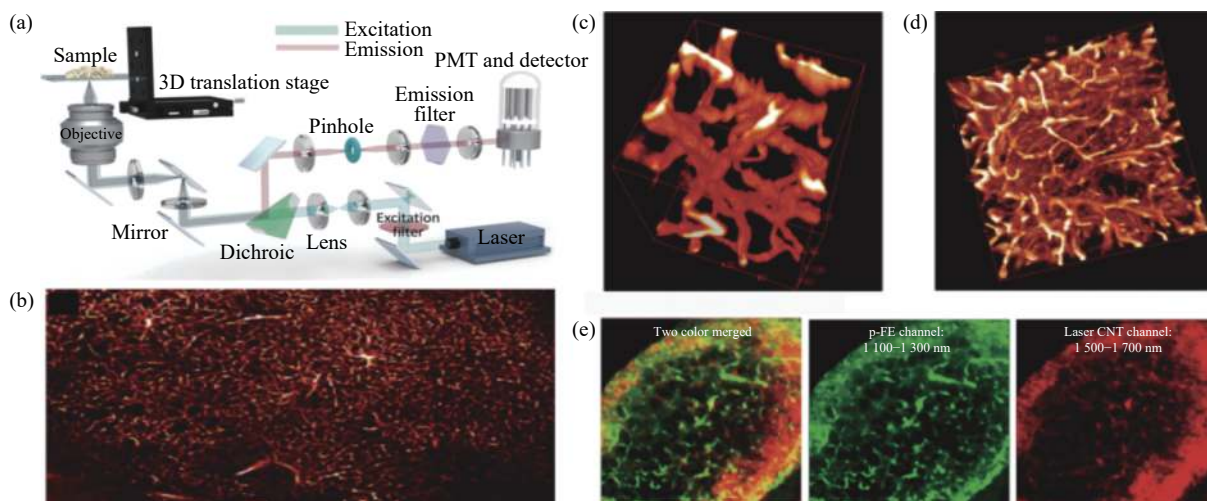


图 3 (a) 移动样品台扫描的 NIR-II 荧光共聚焦显微装置的光路图^[32]; (b) 小鼠脑血管的离体 NIR-II 荧光共聚焦大面积 (3 000 μm \times 2 000 μm) 成像^[33]; (c) 小鼠脑血管的离体 NIR-II 荧光共聚焦小体积 (左侧, 200 μm \times 200 μm \times 200 μm) 和 (d) 大体积 (右侧, 400 μm \times 400 μm \times 400 μm) 3D 重构图像^[33]; (e) NIR-II 荧光共聚焦显微镜下肿瘤组织和血管的双色成像^[33]

Fig.3 (a) Optical diagram of the stage-scanning NIR-II fluorescence confocal microscopic device^[32]; (b) *Ex vivo* NIR-II fluorescence confocal imaging in large area (3 000 μm \times 2 000 μm) of brain in a mouse injected with p-FE^[33]; (c) 3D reconstruction of *ex vivo* NIR-II fluorescence confocal imaging of vasculatures in brain of mouse within a small volume (left side, 200 μm \times 200 μm \times 200 μm) and (d) a large volume (right side, 400 μm \times 400 μm \times 400 μm)^[33]; (e) Two-color fluorescence confocal microscope imaging of a tumor tissue and blood vessels in the NIR-II window^[33]

2018 年, 戴宏杰院士课题组^[33] 开发了一个 QY 为 16.5% 的有机纳米荧光载体 p-FE, 基于与图 3(a) 类似的共聚焦显微系统光路, 依赖于样品台的移动完成了对浸泡在甘油中的离体小鼠脑血管 3 000 μm \times 2 000 μm 的共聚焦大面积成像 (图 3(b)) 以及 400 μm \times 400 μm \times 400 μm 的三维成像 (图 3(d))。之后, 为了评价 p-FE 的肿瘤成像能力, 他们给小鼠接种了 4 T1 乳腺肿瘤 (大小约 33 mm^3), 并给小鼠注射了 p-FE 和具有 NIR-II 荧光发射的 CNTs, 利用 p-FE 在 1 100~1 300 nm 波段的荧光突出肿瘤血管, 利用碳纳米管在 1 500~1 700 nm 波段的荧光突出肿瘤组织, 完成了肿瘤监测。由于 CNTs 的 QY 远低于 p-FE, 在 NIR-II 窗口的肿瘤组织成

像的 CNTs 通道中必须使用更大的小孔以提高 NIR-II 共聚焦系统的采集效率。最终, 以 15 min/帧的扫描速度通过移动样品台进行了 740 μm \times 740 μm \times 220 μm 的肿瘤双色成像 (图 3(e))。

移动样品台的扫描方式系统简单, 可以进行长时间积分, 且可以实现较大的视场。然而移动样品台的方式扫描速度受限于样品台的机械运动, 每像素停留时间为通常为几个毫秒, 因此需要十几分钟才能采集到一个 512 pixel \times 512 pixel 的图像, 如果想要在一个 z 堆栈中使用多张图像来重构出整个体积图像, 每个 3D 图像就可能需要几十分钟。而激光扫描共聚焦显微镜的激发又依赖于一个高度空间定位的激光光斑,

因此在生物成像过程中,低扫描速度会引起较强的光毒性。为缩短每个点的扫描停留时间,可以使用扫描振镜在较小的视场下快速扫描和成像:其中一个振镜沿 x 轴水平扫描激光束、第二个振镜沿 y 轴逐渐缓慢地推进激光束,同时垂直移动样品台进行 z 轴扫描即可得到样品的三维图像。使用扫描振镜的扫描方式成像速度快,对生物样本的光损伤小,有助于实现快速成像。受益于 p-FE 的高 QY 及 H12397-75 PMT 探测器的较高灵敏度,戴宏杰院士课题组^[33]还使用了扫描振镜在 $200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}$ 的区域内进行 2 s/帧的快速扫描和成像,在小面积范围内得到了脑血管的三维图像(图 3(c))。

2019 年,浙江大学钱骏教授课题组^[34]对振镜扫描共聚焦显微光路进行了红外增透的优化,如图 4(a)所示,793 nm 的激发光经二向色镜反射后进入扫描振镜,之后再通过红外增透的扫描透镜和套筒透镜,最终被一个红外增透的水浸物镜(型号:XLPLN25 XWMP25,奥林巴斯)聚焦到小鼠大脑中激发荧光染料 ICG,最终 ICG 在 1000 nm 以上的拖尾荧光被 NIR-II 响应的 H12397-75 PMT 探测。成像过程中振镜以 $20\ \mu\text{s}/\text{pixel}$ 的速度对样品进行扫描以提高时间分辨率,更好地获得实时性成像,最终实现了对活体小鼠脑血管的 NIR-II 荧光共聚焦快速扫描成像(图 4(b))。

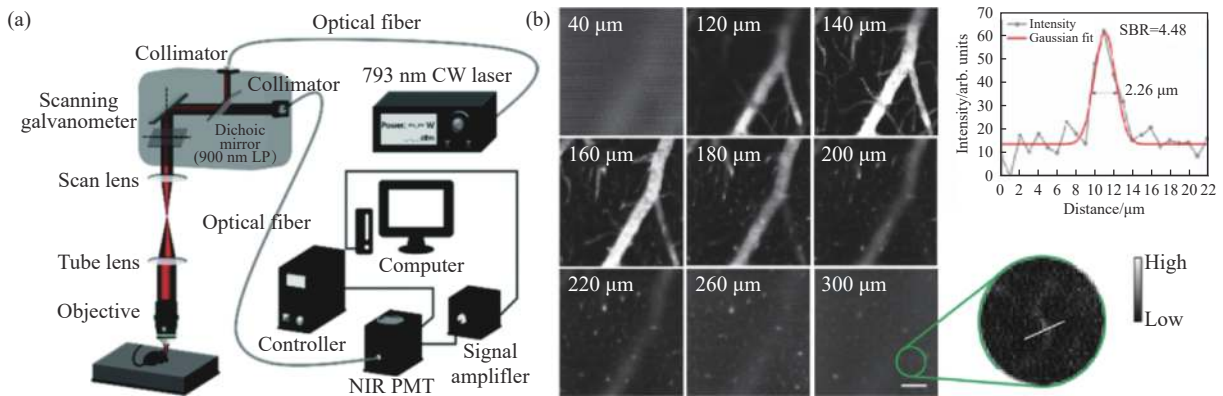


图 4 (a) NIR-II 荧光共焦扫描显微成像系统的原理图; (b) 活体 NIR-II 荧光共聚焦扫描显微镜下小鼠在 40~300 μm 不同深度的开颅脑血管成像^[34]
 Fig.4 (a) Schematic illustration of NIR-II fluorescence confocal scanning microscopic imaging system; (b) *In vivo* NIR-II fluorescence confocal scanning microscopic imaging of cerebrovasculature in a mouse with craniotomy at various depths from 40 to 300 μm ^[34]

除此之外,钱骏教授课题组^[35]还使用了具有聚集诱导发光特性(AIE)^[36-37]的 TB1 有机纳米颗粒作为 NIR-II 荧光探针,利用其在 1000 nm 以上的荧光拖尾,同样采用振镜扫描的方法实现了基于 NIR-II 荧光共聚焦显微术的活体鼠脑血管成像。所使用的系统如图 5(a)所示,793 nm 的连续激发光通过振镜以 $10\ \mu\text{s}/\text{pixel}$ 的扫描速度进行扫描,并经过扫描透镜和套筒透镜对激发光进行扩束后进入红外增透物镜;被激发处的 1000 nm 以上的荧光通过 $300\ \mu\text{m}$ 直径的小孔后经光纤耦合进 H12397-75 PMT,最终实现了 $800\ \mu\text{m}$ 深度的高分辨率三维活体鼠脑血管成像,在 $700\ \mu\text{m}$ 深度处的空间分辨率为 $8.78\ \mu\text{m}$ (图 5(b))。

物模型。相比于小鼠,灵长类动物(包括人类和非人类灵长类动物)的大脑皮层依据神经元功能被分为不同的模块单元(称为列或域)^[38-39],这种特异性的功能模块表明灵长类动物的血管网络结构具有特殊性以满足不同区域的代谢和血流动力学需求^[40]。浙江大学钱骏教授、Anna Wang Roe 教授^[1]开发了一种适合非人灵长类动物的 NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统,利用 ICG 作为 NIR-II 荧光探针,首次实现了对恒河猴柱状和层流状微血管网络的 NIR-II 结构成像。这项工作解决了恒河猴成像的不少难点:首先,恒河猴相比于常用的小鼠体积较大,需要在显微镜的载物台预留更大的操作空间;其次,恒河猴的脑组织弧度大,成像过程中稍微水平移动聚焦点就会在很大程度上改变光斑在猴脑中的聚焦深度,因此实际成像中使用了

除了小鼠脑血管成像, NIR-II 荧光共聚焦显微术同样可用于观测构造类似于人类大脑皮层结构的动

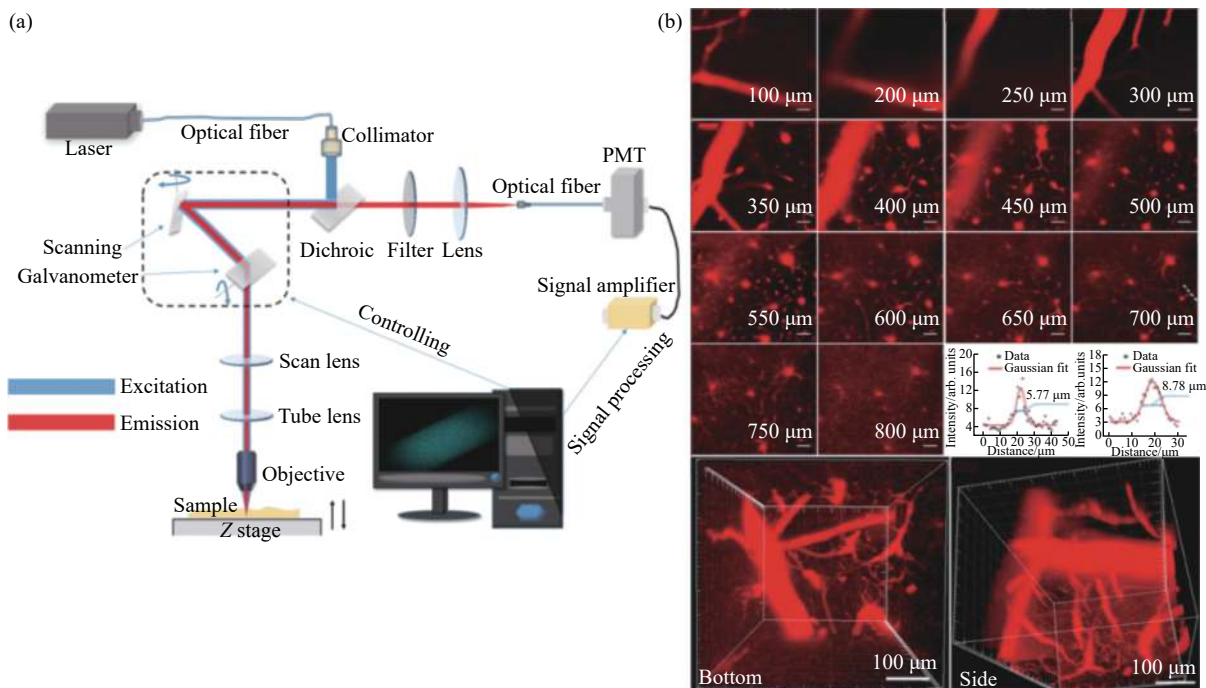


图 5 (a) NIR-II 荧光共聚焦扫描显微成像系统的原理图; (b) NIR-II 荧光共聚焦显微镜下活体小鼠脑血管的三维图像^[35]

Fig.5 (a) Schematic illustration of NIR-II fluorescence confocal scanning microscopic imaging system; (b) Three-dimensional images of cerebral vessels of a living mouse using NIR-II fluorescence confocal microscope^[35]

一个多自由度的调节架以保证成像过程中物镜始终垂直于颅窗;另外,恒河猴更为珍贵,对 NIR-II 探针的生物兼容性要求更高,因此实验中选用了临床可用且具有 NIR-II 荧光拖尾的 ICG 作为荧光探针。成像过程中,扫描单元内的振镜可以在 x 、 y 方向上实现精细的逐点扫描,同时通过电机驱动的电动位移平台调整显微系统的垂直位置,实现 z 方向的扫描;整个共聚焦显微系统固定在一个多方向可调的架子上,方便地平移和旋转物镜使之在成像过程中始终垂直于颅窗。最终,该共聚焦显微系统以 $20 \mu\text{s}/\text{pixel}$ 的扫描速度实现了恒河猴皮质血管中 $8 \mu\text{m}$ 的横向分辨率以及 $470 \mu\text{m}$ 的成像深度,得到了活体恒河猴三维脑血管图像(图 6(b))。

上述几项工作中使用的 NIR-II 荧光探针的发射波长不够长,通常只收集 1000 nm 或 1100 nm 长通的拖尾荧光,在此波段范围内的活体单光子共聚焦显微成像仍受到光散射和吸收的限制而无法达到理想的成像效果。为了进一步提高成像深度,戴宏杰院士课题组^[42]合成并使用了发射峰在 1600 nm 的量子点(CSQDs)荧光探针。相比于之前的 NIR-II 荧光探针,

CSQDs 荧光探针发射峰进一步增长,因此在生物组织中的散射进一步减小,荧光穿透深度更大;另外,在此波段内水对光的吸收进一步增加,更多地抑制了散射光,弹道光与散射光之比显著提升,理论上有着更好的成像质量。戴宏杰院士课题组使用 785 nm 波长的激发光及与图 3(a) 基本一致的光路结构,收集量子点 1500 nm 以上的荧光,在活体情况下实现了对小鼠后肢皮下肿瘤 1.2 mm 深度的共聚焦三维血管成像(图 7)。

NIR-II 荧光共聚焦显微成像的深度、速度等主要受限于荧光探针的亮度、激发和发射波长,以及探测器的灵敏度。至此,NIR-II 荧光共聚焦显微镜的发展已相对完善:在 NIR-II 灵敏度相对较高的 H12397-75 PMT 基础上,NIR-II 荧光亮度更高的探针得以开发、共聚焦显微系统的近红外透过率得到优化、扫描方式从缓慢移动样品台的扫描方式改进为振镜扫描方式;与此同时,探针的发光波段由 NIR-II 延伸至 NIR-IIb,共聚焦显微系统的成像深度得以显著增大。

在 NIR-II 窗口的基础上,进一步增长激发光及发

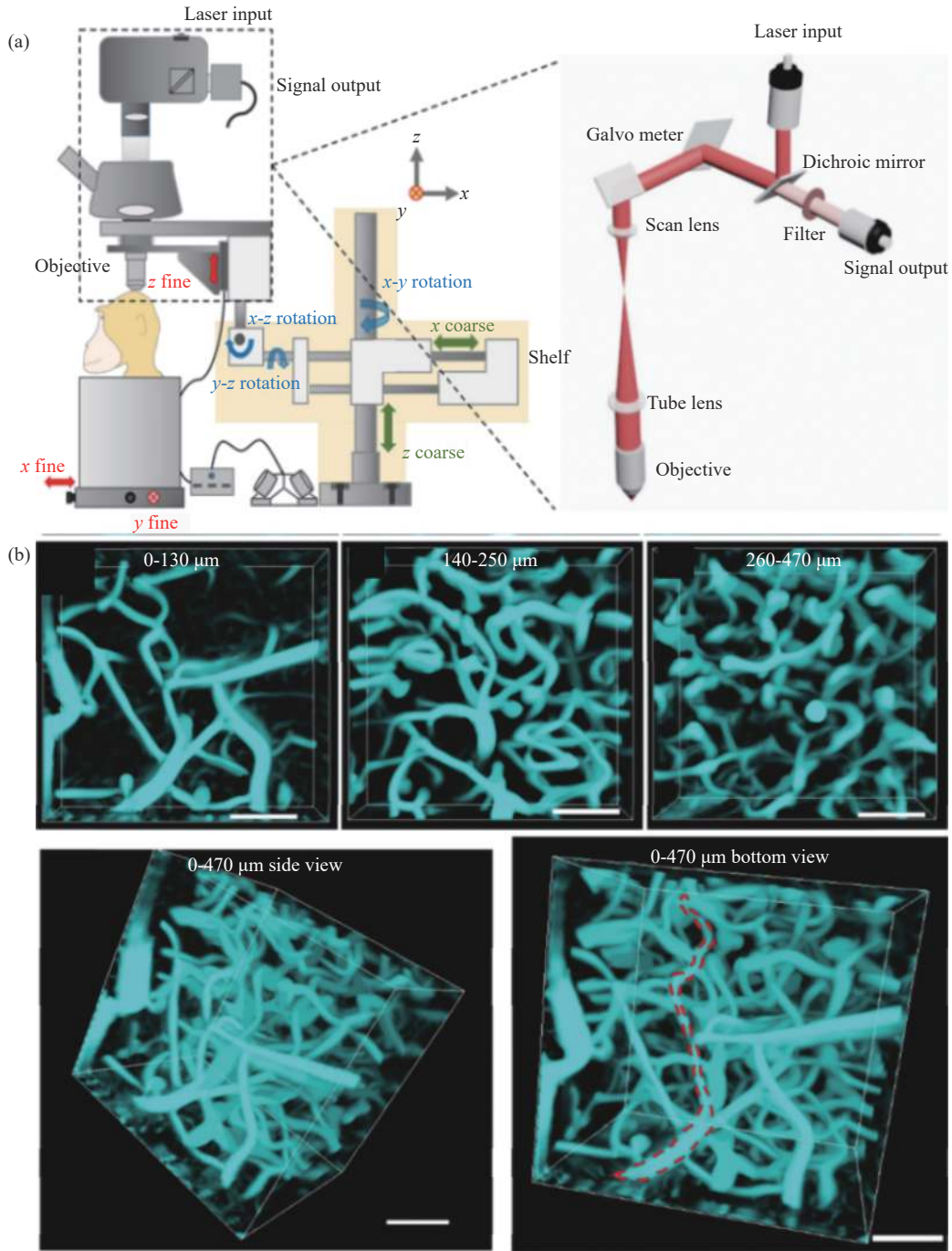


图 6 (a) NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统示意图 (红色箭头: 微调。蓝色箭头: 旋转。绿色箭头: 粗调整。右侧图是激发光路和成像光路); (b) NIR-II 荧光共聚焦显微镜下恒河猴大脑血管的大深度活体成像^[41](比例尺: 100 μm)

Fig.6 (a) The schematic illustration of the NIR-II fluorescence confocal microscopic imaging system. Red arrows: fine adjustment. Blue arrows: rotation. Green arrows: coarse adjustment. The excitation and imaging light paths are showed on the right panel; (b) *In vivo* NIR-II fluorescence confocal microscopic imaging of cerebral blood vessels of the rhesus macaque with large penetration depth^[41](Scale bar: 100 μm)

射光波长, 能使激发光穿透深度更大, 发射光中弹道光与散射光比例增大, 进而提升成像质量。另外, 近红外探测中最常用的 InGaAs 光电二极管或光电倍增管虽然在长波长窗口具有高增益, 但探测波段均小于

1650 nm, 且存在低光电转化效率和高暗计数等问题。若想进一步改进 NIR-II 共聚焦显微成像效果, 就需要在延伸激发、发射光波长的同时引入对长波长荧光具有高光电转换效率、低暗计数、高增益的探测

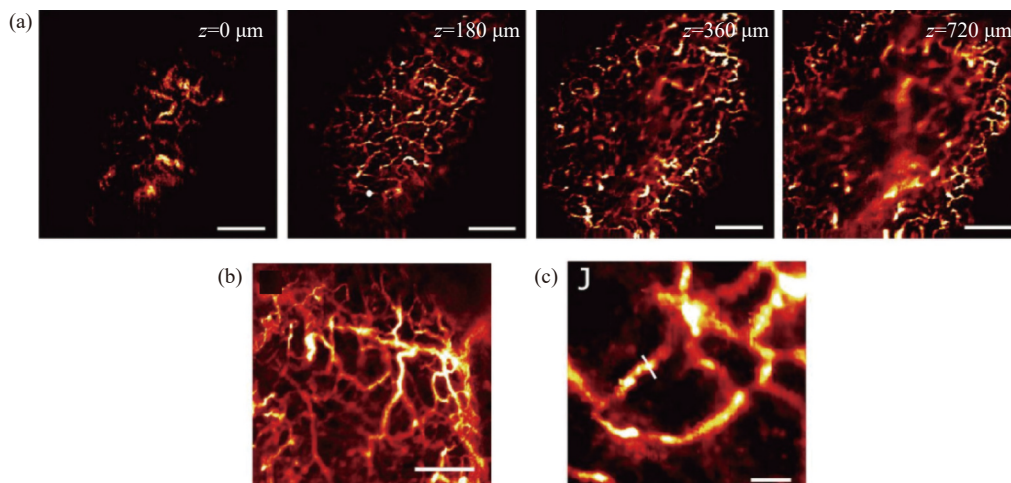


图 7 (a) NIR-IIb 窗口小鼠肿瘤活体无创荧光共聚焦显微成像^[42](比例尺: 500 μm); (b)~(c)180μm 深度下肿瘤血管的高分辨率荧光共聚焦图像: (b) 比例尺: 200 μm; (c) 比例尺: 50 μm

Fig.7 (a) *In vivo* noninvasive NIR-IIb fluorescence confocal imaging of the mouse tumor^[42]. Scale bar: 500 μm. (b)-(c) High-resolution fluorescence confocal imaging of tumor vessels at a depth of 180 μm: (b) Scale bar: 200 μm; (c) Scale bar: 50 μm

器,降低荧光探测的阈值。

3 NIR-II 共聚焦显微系统的改进

3.1 反射式 NIR-II 共聚焦显微系统

NIR-II 共聚焦显微系统的激发光与发射光是逐渐由可见光向 NIR-I 再向 NIR-II 扩展的,随着光波长的增加,激发光的散射减小,能更好地聚焦在目标点上;当发射光在 NIR-IIx、NIR-IIa 或 NIR-IIb 波段时,信号收集过程中能收集到更高比例的弹道光子,从而提升成像质量和成像深度。第二部分中所展示的工作都是基于荧光发射的 NIR-II 共聚焦显微系统,此类共聚焦显微系统依赖于 NIR-II 荧光发射的探针,成像深度很大程度上受限于探针的亮度和吸收发射波段。反射式共聚焦显微镜采用单个波长激发,收集同一个波长反射回来的信号,可在一定程度上摆脱对探针的依赖,激发光聚焦样品之后收集反射的信号,在延长信号光波长的同时相应延长激发光波长,使其在生物组织大深度成像中具有天然优势。

2018 年,Chris Xu 组^[43]将 NIR-II 激光引入反射式共聚焦系统(RCM)。RCM 面临的一个挑战是光束路径中光学元件的杂散反射,他们在光路中引入偏振来滤除非样品上的反射信号。如图 8(a)所示,他们使用 5 mm² 的方形 λ/4 波片代替普通的盖玻璃作为颅窗的盖玻片,光路中的杂散反射光返回经过 λ/2 波片后

仍然为 P 偏振光;而只有两次经过 λ/4 波片的样品上的反射信号再经过 λ/2 波片之后转化为 S 偏振光后才能在 PBS 中反射并被 PMT1 或 PD 探测收集。他们使用 1650 nm 的脉冲激光器作为入射光源,并使用 InGaAs PMT(H10330 C-75,滨松)作为探测器。系统中,后向散射光通过一个 75 mm 的透镜重新聚焦到作为共聚焦针孔的 25 μm 直径的多模光纤中,在脑表面以下 1.2~1.3 mm 的深度观察到了海马体的神经纤维(图 8(c))。在这项工作中,Chris Xu 组还使用反射式共聚焦显微系统展示了在 1310 nm、1610 nm 和 1630 nm 的连续波和 1650 nm 的脉冲激光照射下小鼠的白质共聚焦图像,并利用不同波长采集图像,证实了长波长照射下反射式共聚焦显微成像效果更好(图 8(b))。

3.2 SNSPD 辅助探测的 NIR-II 共聚焦显微系统

SNSPD 是一类用单个光子打破库珀对从而产生电流电压信号的量子极限超导光检测器^[43]。Kadin 等人于 1996 年观察到了超导薄膜中的非平衡热点效应,并以此为基础首次提出了 SNSPD 的概念^[44]。2001 年,俄罗斯 Goltsman 团队利用 NbN 薄膜制备的超导单光子纳米线实现了 810 nm 波长光的探测,成功证明了 SNSPD 的概念^[45]。自此,SNSPD 在各种应用方面的巨大潜力吸引了世界各地的研究人员。研究人员通过改进材料、设计、制造工艺和理论等,

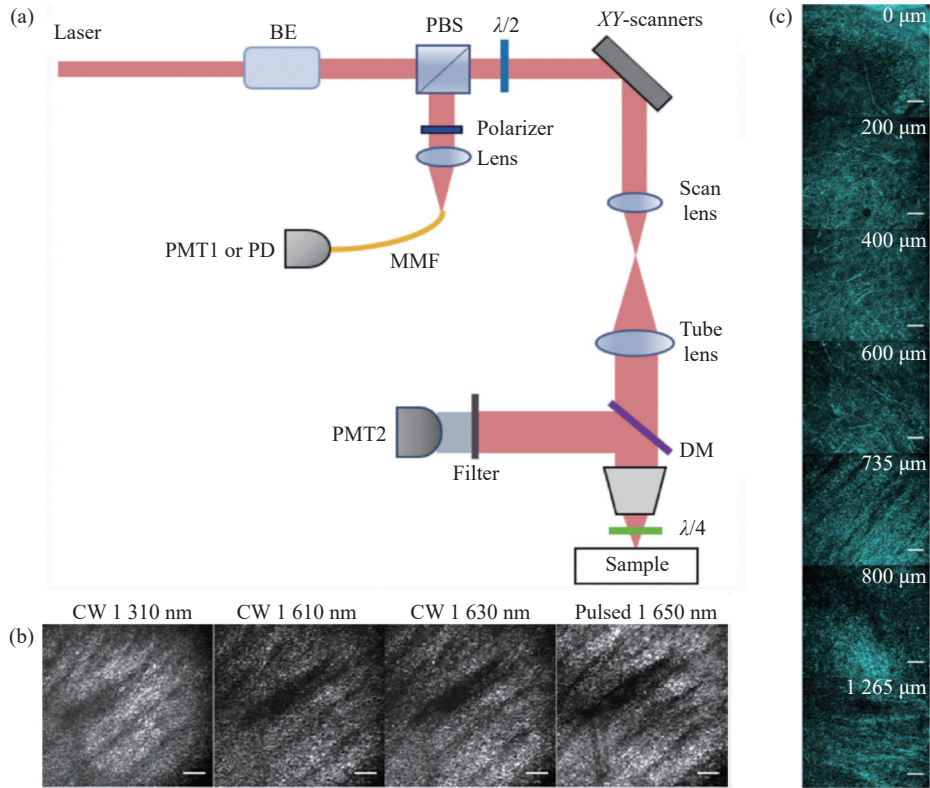


图 8 (a) NIR-II 反射式共聚焦显微镜示意图; (b) 相同功率, 不同波长连续脉冲激光 (1 310 nm, 1 610 nm, 1 630 nm 和 1 650 nm) 激发下白质的 RCM 共聚焦图像; (c) 不同深度下的活体 RCM 图像^[43](比例尺: 30 μm)

Fig.8 (a) Schematic illustration of the NIR-II reflectance confocal microscope; (b) Confocal images of white matter under CW and pulsed laser illumination with the same power at 1310 nm, 1610 nm, 1630 nm, and 1650 nm; (c) *In vivo* reflectance confocal microscope images at various depths^[43] (Scale bars: 30 μm)

使 SNSPD 的性能得到了有效的提高。其中, 系统探测效率 (SDE) 是最受关注的性能, 它通常可以被表示为光耦合效率、吸收效率和本征探测效率三者的乘积。成熟的光学技术 (光学薄膜、透镜光学、光学仿真计算等) 和超导薄膜及微纳加工技术, 使得以上三个因素都能够做到近乎理想^[46]。在 2019 年的罗彻斯特相干和量子光学会议上, Reddy 等人报道了 SDE 为 98% 的 SNSPD, 这是 SNSPD 当时所达到的最高效率^[47]。此后, 上海微系统所、美国 NIST、荷兰 TU Delft 三个团队都先后报道了在 1550 nm 波段 SDE 接近 100% 的 SNSPD^[48-50]。与此同时, SNSPD 对更长波长光信号 (1 900~2 000 nm) 也有较高灵敏度 (检测效率 >50%), 这种长波长高探测效率器件的出现使得近红外二区的生物成像应用得到了拓展。除了探测效率的明显优势, SNSPD 的快速时间响应 (~109 ps)、低定时抖动 (~50 ps) 和低暗计数率 (<100 cps) 等特点都使

其十分有利于 NIR-II 生物成像。

2020 年, 中国科学院深圳先进技术研究院郑炜研究员团队^[51]利用了 SNSPD 高灵敏度的特点开发了一种 NIR-II 荧光共聚焦介观成像系统。如图 9(a) 所示, 波长为 808 nm 的飞秒激发光被扩束后由二色镜反射到二维振镜扫描仪上进行扫描, 相比于共聚焦显微系统, 此系统将原本用于聚焦的短焦距显微物镜换成了单一的扫描透镜 (LSM02-BB, $f=18$ mm, Thorlabs), 从而创造了一个更大的平面成像场。相比于显微成像, 介观成像中聚焦光斑大, 功率密度低, 激发出的荧光信号更加微弱, 需要用高探测效率的探测器即 SNSPD 弥补。文中所使用的 SNSPD 在 2.5 K 温度下工作, 对 1064 nm (无偏振) 波长的检测效率大于 50%, 暗计数率仅 100 次/s, 它为实现同时具备较大视场、高分辨率、大穿透深度及光学切片能力的介观成像提供了探测的基础。在这项工作中, 他们开发出了 FOV 为 7.5 mm×7.5 mm、横向分辨

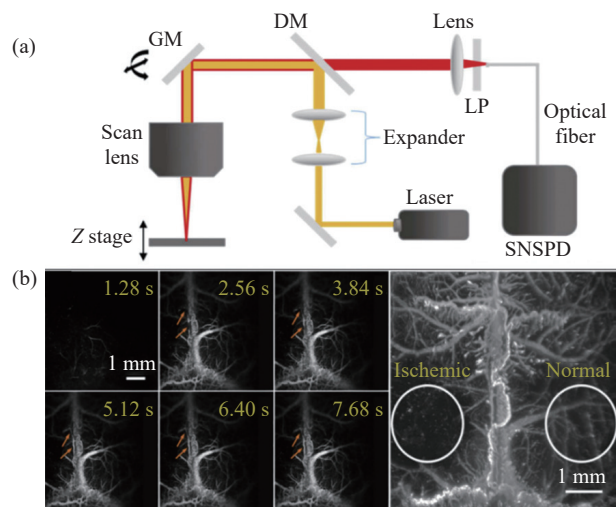


图 9 (a) NIR-II 荧光共聚焦介观显微镜系统示意图; (b) 光化学诱导血栓形成的局部脑缺血小鼠的体内颅骨脑血管成像^[51]

Fig.9 (a) Schematic of NIR-II fluorescence mesoscopic system; (b) *In vivo* through-skull cerebral vascular imaging of a local cerebral ischemia mouse with photochemically induced thrombosis^[51]

率为 6.3 μm 、成像深度可达小鼠颅骨表面以下 2.5 mm 的介观成像系统,并利用该系统对小鼠进行了活体三维脑血管成像,实现了局部缺血的动态脑血管成像(图 9(b))。

2021 年, Chris Xu 教授团队^[52]基于与图 4、5 类似的荧光共聚焦系统光路将长波长发射的荧光探针 PbS/CdS 量子点(激发波长为 1310 nm, 荧光发射波长 >1600 nm)与定制的 SNSPD(检测范围在 1300~2000 nm)相结合,使用低功率连续波激光进行激发,在开颅成年小鼠体内获得了约 1.7 mm 深度的脑血管共聚焦荧光显微图像(图 10)。在这项工作中,量子点荧光探针的激发和发射波长都很长, NIR-II 激发、发射的共聚焦荧光显微成像得以首次实现,并达到了可以与双光子成像相媲美的成像深度。同时,他们使用了在长波长处有着更高灵敏度的探测器 SNSPD,达到了远超以往的 NIR-II 荧光共聚焦成像深度。

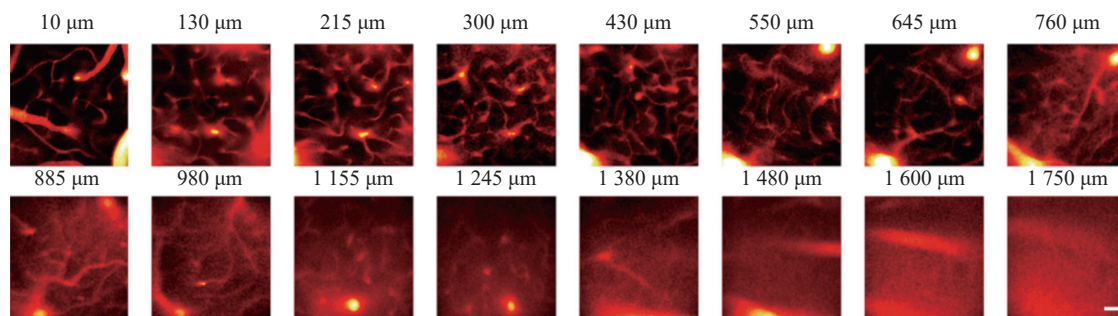


图 10 用 PbS/CdS 量子点对不同深度的成年小鼠脑血管体内成像^[52]。比例尺: 50 μm

Fig.10 *In vivo* imaging of an adult mouse brain vasculature at various depths with PbS/CdS quantum dots^[52]. Scale bar: 50 μm

2022 年, 戴宏杰院士课题组^[53]合成了发射峰在 1880 nm 的生物相容核壳 PbS/CdS 量子点, 系统中 1700 nm 以上波长的荧光被耦合进单模光纤并采用高灵敏度的 SNSPD 探测, 其余光路结构与图 4、5 所示的荧光共聚焦光路基本一致。与较短波长的激光(800 nm、1000 nm、1319 nm 和 1540 nm)相比, 文中所使用的 1650 nm 的长波长激发光在生物组织中的散射进一步降低, 有助于在深层组织中实现良好聚焦; NIR-IIc 区发射光在生物组织中的散射进一步降低, 可以实现大深度穿颅成像。最终, 他们使用迄今为止最长激发和发射波长的共聚焦荧光显微术, 实现了穿颅条件下小鼠脑血管约 1100 μm 的成

像深度(图 11(a)~(b)), 并在小鼠体内腹股沟淋巴结中实现了直径约 6.6 μm 的高内皮小静脉、以及淋巴结中 CD169+巨噬细胞和 CD3+T 细胞的高分辨率成像, 极大推动了近红外共聚焦显微术的发展。如图 11(c) 所示, 这项工作中还对比了在 NIR-IIb 或 NIR-IIc 窗口内使用 PMT 或 SNSPD 作为探测器时, 小鼠脑部不同深度血管的荧光共聚焦显微图像, 进一步验证了长波长激发光以及高灵敏度 SNSPD 在共聚焦显微成像中的优势。至此, NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统得到了进一步的发展。文中所介绍的所有 NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统的具体参数如表 1 所示。

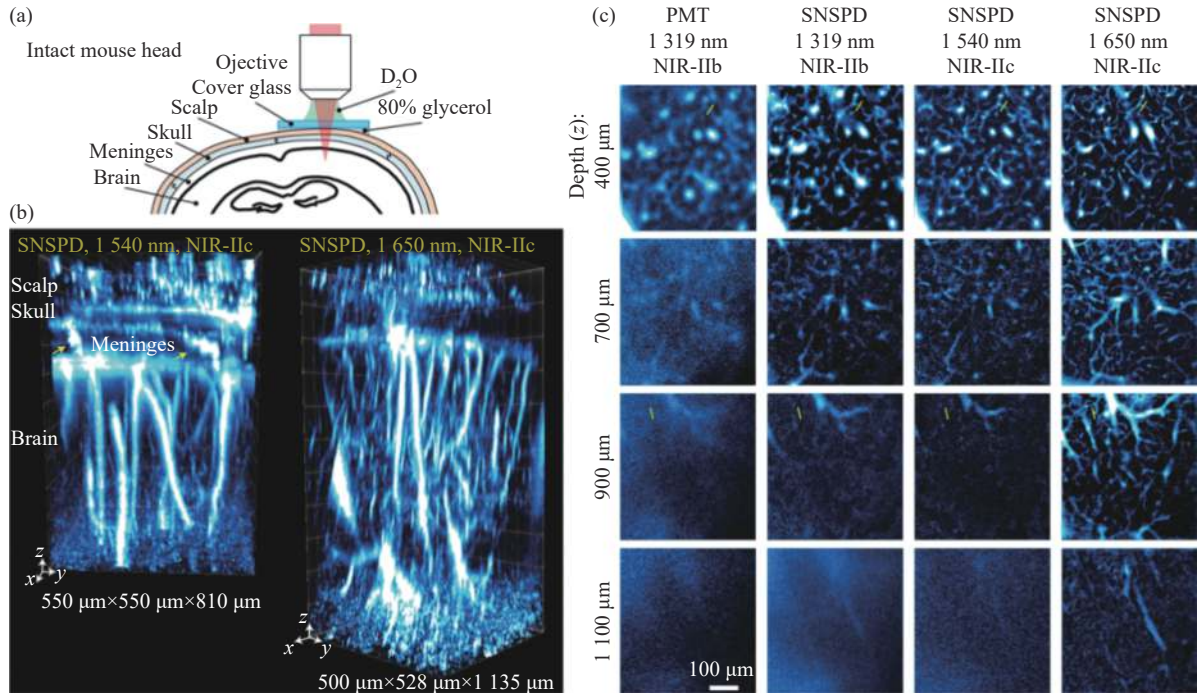


图 11 NIR-IIc 窗口无创活体共聚焦显微镜穿颅观察小鼠脑血管^[53]。(a) NIR-IIc 窗口小鼠穿颅共聚焦显微成像示意图；(b) 小鼠脑部血管的穿皮三维共聚焦图像；(c) 在 NIR-IIb 或 NIR-IIc 窗口内使用 PMT 或 SNSPD 作为探测器时，小鼠脑部不同深度血管的高分辨率荧光共聚焦显微图像

Fig.11 Non-invasive *in vivo* confocal microscopic imaging of intact mouse head in NIR-IIc window^[53]. (a) Schematic of intact mouse confocal microscopic head imaging in NIR-IIc window; (b) Three-dimensional volumetric images of blood vessels in an intact mouse head visualized through the scalp; (c) High-resolution fluorescence confocal images of blood vessels at various depths through intact mouse head imaged with a PMT or SNSPD in NIR-IIb or NIR-IIc window

表 1 所引用文献中 NIR-II 共聚焦显微成像系统的相关参数

Tab.1 Related parameters of the NIR-II confocal microscopic imaging system introduced in this paper

Applications	Fluorescence probe	Excitation (wavelength/power)	Scanning mode	Scanning rate	Detector	Emission	Imaging depth
Imaging of braintissues sections ^[8]	IR-FGP	785 nm (~160 mW)	Stage scanning	2.5 ms/pixel	H12397-75 PMT	1 050-1 300 nm	170 μm
Imaging of cerebral vessels in mouse <i>ex vivo</i> ^[33]	p-FE	785 nm (~30 mW)	Stage scanning Galvanometer scanning	7.5 min/frame 2 s/frame	H12397-75 PMT	1 100 LP	1 350 μm
Imaging of tumor <i>in vivo</i> ^[33]	p-FE CNTs	785 nm (~30 mW)	Stage scanning	15 min/frame	H12397-75 PMT	1 100-1 300 nm 1 500-1 700 nm	220 μm
Imaging of cerebral vessels in mouse <i>in vivo</i> (craniotomy) ^[34-35]	ICG TB1	793 nm (~40 mW) 793 nm (~70 mW)	Galvanometer scanning	20 μs/pixel 10 μs/pixel	H12397-75 PMT	1 000 LP 1 000 LP	300 μm 800 μm
Imaging of cerebral vessels in non-human primates <i>in vivo</i> ^[41]	ICG	793 nm (~20 mW)	Galvanometer scanning	20 μs/pixel	H12397-75 PMT	900 LP	470 μm
Imaging of tumor <i>in vivo</i> ^[42]	PEG-CSQDs	785 nm (~40 mW)	Stage scanning	5-7 min/frame	H12397-75 PMT	1 500 LP	1.2 mm
Imaging of cerebral vessels in mouse <i>in vivo</i> (craniotomy) ^[52]	PbS/CdS QDs	1 310 nm (≤25 mW)	Galvanometer scanning	1-50 s/frame	SNSPD	1 300-1 700 nm	1.7 mm
Imaging of cerebral vessels in mouse <i>in vivo</i> (through the scalp) ^[53]	P ³ -QDc	1 650 nm (~28.5 mW)	Galvanometer scanning	5-20 s/frame	SNSPD	1 800-2 000 nm	1.1 mm

4 基于 NIR-II 共聚焦显微技术的寿命成像

荧光成像中,经常需要对不同的荧光分子同时观察,例如观测不同免疫细胞在淋巴结中的相对位置、在脑切片中同时观测多种蛋白质的分布、同时识别不同类型的神经元等。荧光成像中的多通道研究通常从波长入手,即探测时通过不同发射波长将不同靶点的荧光分子区分开。然而,近红外发射的荧光探针发光光谱通常较宽且容易存在长波长拖尾,因此不同荧光探针的发光容易存在光谱重叠,导致信号串扰。为了解决这个问题,研究者们把目光转向了时间域的荧光寿命成像。当荧光分子被一束激光激发后,原子核外的电子吸收能量后从基态能级跃迁到能量较高的激发态,一部分激发态的电子会发生辐射跃迁并以荧

光的形式释放能量后回到基态,当去掉激发光后,分子的荧光强度降到激发时荧光最大强度的 $1/e$ 所需要的时间被称为荧光寿命。荧光物质的荧光寿命与其本身的结构特性、所处环境的 pH、极性等相关,即使是发光波长接近的不同荧光分子,也可以通过荧光寿命的不同区分开来。

2019 年,浙江大学钱骏教授课题组^[35]将荧光共聚焦显微镜与 TCSPC 相结合建立了 NIR-II 荧光寿命成像系统 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) (图 12(a))。TCSPC 是实现 FLIM 成像的一种常用方法,它可以探测每个激发脉冲下第一个光子到达的时间,通过长时间连续探测多个脉冲周期,即可按照光子数量的时间分布拟合出荧光衰减曲线并计算得到荧光寿命。系统中,810 nm 飞秒脉冲激光器

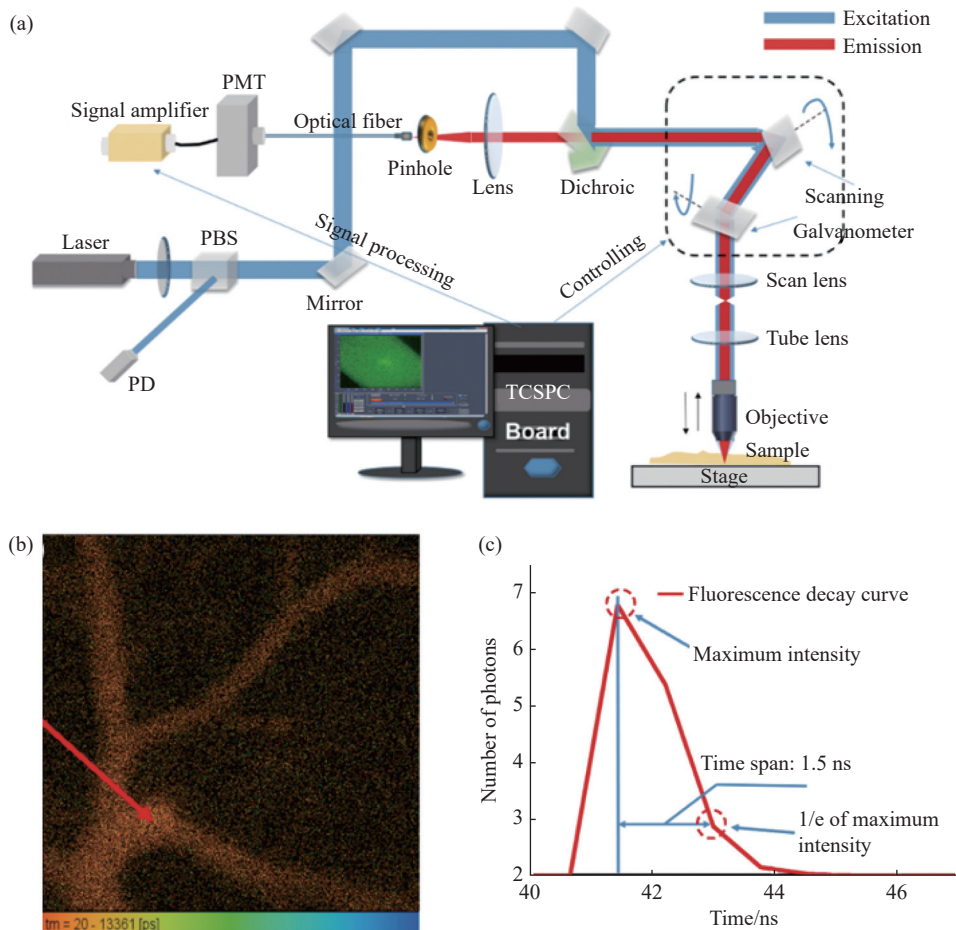


图 12 (a) NIR-II 共聚焦荧光寿命显微成像系统的光路图; (b) 静脉注射 TB1 后的小鼠大脑血管的活体 NIR-II FLIM 图像; (c) 在 (b) 箭头处测量的荧光衰减曲线,得到 TB1 在血管中的荧光寿命为 1.5 ns^[35]

Fig.12 (a) A simplified optical diagram of NIR-II confocal fluorescence lifetime microscopic imaging system; (b) An *in vivo* NIR-II FLIM image of cerebral vessels in mouse, which was intravenously injected with TB1 dots; (c) Fluorescence decay curves measured at the arrow in (b), showing the fluorescence lifetime of TB1 dots in vessels is 1.5 ns^[35]

(Mantis-5 钛蓝宝石振荡器)发出的光一分为二,其中一束被引入光电二极管(PD)中作为同步脉冲信号,一束被引入商业共聚焦显微镜(FV1000+BX61,奥林巴斯)作为激发源并采用 NIR(950~1700 nm)响应的 H12397-75 PMT 检测样品 980 nm 以上的荧光信号。最终,集成在计算机中的 TCSPC 模块会根据 PD 的同步信号以及经 PMT 探测、放大器放大得到的电信号计算出每个点的荧光寿命,并在扫描振镜的辅助下构建完整的 NIR-II FLIM 图像。如图 12(b)所示,钱骏教授课题组利用此 NIR-II FLIM 系统以 40 s/帧的成像速度,利用 TB1 纳米颗粒首次实现了活体小鼠脑血管 NIR-II 共聚焦荧光寿命显微成像,测得的 TB1 纳米颗

粒的 NIR-II 荧光寿命约为 1.5 ns (图 12(c))。

2020 年,中国科学院深圳先进技术研究院郑炜研究员团队^[54]采用长波长高灵敏度(检测效率>50%)、快速时间响应(~109 ps)、低定时抖动(~50 ps)和低暗计数率(<100 cps)的 SNSPD 进行 NIR-II 荧光寿命测量,对活体 BALB/c 裸鼠耳朵进行了活体三维血管成像(图 13)。在这项工作中对比了 SNSPD 和商用 PMT 的定时抖动,分别为~109 ps 和~367 ps, SNSPD 探测器较低的定时抖动极大地提高了荧光寿命检测的时间分辨率,显著提高了短荧光寿命的测量能力和荧光寿命的测量精度,在 NIR-II 窗口中可以测量短至~100 ps 的荧光寿命。

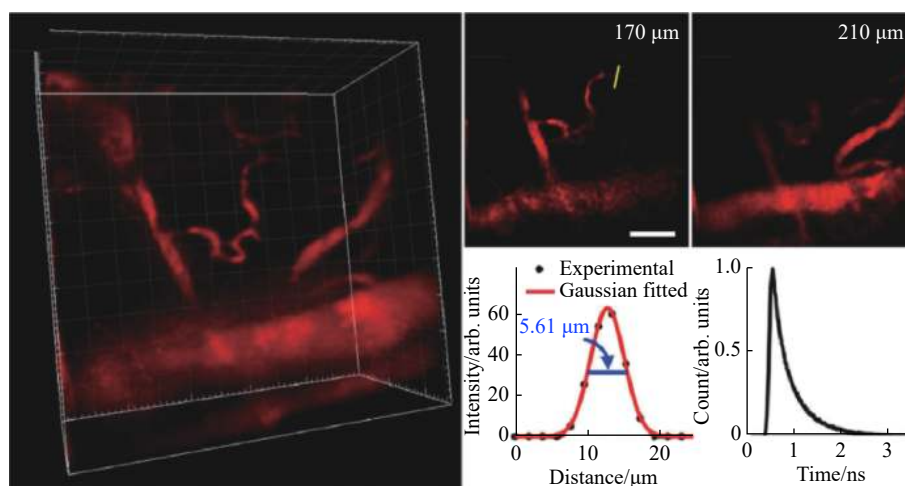


图 13 用 IR820-BSA 标记的小鼠耳朵血管的活体三维 NIR-II 荧光成像^[54]。其中,右下角图为黄线处血管的荧光强度衰减曲线

Fig.13 *In vivo* three-dimensional NIR-II fluorescence imaging of mouse ear vessels labeled with IR820-BSA^[54]. The fluorescence intensity attenuation curve of the blood vessel at the yellow line is shown in the lower right corner

5 总结与展望

NIR-II 共聚焦显微系统经历了技术的演变与发展如下:

首先,受限于荧光探针的亮度,其扫描最初采用了移动样品台的方式,扫描速度受限于位移台的机械运动速度,每个像素的扫描速度通常为毫秒级。随着高亮度的 NIR-II 荧光探针的出现,成像过程中对系统的依赖也逐步降低,扫描时不需要在同一点停留过长时间,扫描方式转变为振镜扫描,成像速度加速到 10~20 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ 。其中,目前 NIR-II 共聚焦显微成像中所使用的 NIR-II 荧光探针主要有两大类:(1)有机染料:包括小分子荧光染料、有机纳米颗粒等。小分子

染料如 ICG 具有良好生物代谢性能,已通过美国食品药品监督管理局(FDA)认证,并被广泛地应用于临床诊疗,它在 NIR-II 有明亮的荧光拖尾信号,可被用于 NIR-II 共聚焦显微成像。同时,一系列具有强 NIR-II 拖尾信号的有机纳米颗粒如 TB1 纳米颗粒也被应用于 NIR-II 共聚焦大深度显微成像之中。(2)无机染料:包括单壁碳纳米管、量子点等。CNTs 作为 NIR-II 荧光生物成像的开创性荧光探针,随着深入的研究其发射波长也被逐渐红移,因此常被用于长波长荧光成像中,但其低的量子产率限制了 NIR-II 共聚焦显微成像深度。量子点则具有激发和发射波长可调谐、高荧光亮度等优势,因此常被用于更快速、更高分辨

率、更大深度的 NIR-II 共聚焦显微成像。

其次, NIR-II 共聚焦显微技术中的激发光, 由最初较长波长的 NIR-I 光变为波长更长的 NIR-II 光, 激发波长的增加减小了激发光在生物组织中的散射, 使得其可以在大深度生物组织中实现良好聚焦; 而发射光的波长由 NIR-II 逐渐拓展到 NIR-IIb、NIR-IIc, 这使得成像过程中荧光信号在生物组织中散射减小, 背景降低, 同时水吸收适当增大, 更大程度上优先耗尽了传播路径更长的散射光, 增加了弹道信号光的比例。此外, NIR-II 共聚焦显微技术的应用场景也从最初的离体组织切片成像拓展到活体肿瘤成像、活体小鼠脑血管成像、以及对系统空间和灵活度要求更高的非人类灵长类动物脑血管成像。

若想利用 NIR-II 共聚焦显微系统实现更大的成像深度, 研究者们会考虑进一步红移激发光和发射光波长。在此过程中, 长波长探测器的改进是必不可少的一环。在近红外区域具有探测灵敏度的热电冷却光电倍增管 H12397-75 的出现, 可以以相对较高的效率实现 950~1 700 nm 波段的探测, 这是最初 NIR-II 共聚焦显微技术在生物成像中得以应用的基础。然而, 为了追求更大深度的成像, 研究者们对探测器在更长波段的响应灵敏度提出了更高要求。SNSPD 利用单光子拆散库珀对从而产生电阻的效应, 实现了对长波长近红外光的高探测效率 (1 700~2 000 nm 波段检测效率>50%), 这为进一步拓展 NIR-II 共聚焦显微成像的激发和探测波长、探索成像深度极限提供了可能。Chris Xu 教授团队^[52]和戴宏杰教授团队^[53]相继将 SNSPD 应用于 NIR-II 共聚焦显微成像系统之中, 并采用 NIR-II 激发、NIR-II 发射的荧光探针分别实现了 1.7 mm 的开颅小鼠脑血管成像和 1.1 mm 的穿颅小鼠脑血管成像, 共同证实了 SNSPD 应用于 NIR-II 共聚焦显微成像的巨大优势。

另外, 将 TCSPC 模块和飞秒激光引入 NIR-II 荧光共聚焦系统、实现荧光寿命成像, 为 NIR-II 共聚焦显微技术拓展了多维度的观测方法, 可以为揭示深层组织的更多信息提供补充; 此外, SNSPD 探测器具有低定时抖动的特性, 与 PMT 相比, 提高了短荧光寿命的测量能力和荧光寿命的测量精度。NIR-II 共聚焦荧光寿命成像有望在复杂多变的生物场景中实现更多通道的探测以及更弱信号的检测。

总的来看, 激发光及发射光波长的拓展、高亮度 NIR-II 荧光探针的开发、高探测效率 SNSPD 以及荧光寿命的引入, 使得 NIR-II 共聚焦显微系统的成像速度、成像深度以及成像维度得到逐步提升。目前 NIR-II 共聚焦显微系统的问题主要在于其相对单一的应用场景, 受限于 NIR-II 探针的种类及修饰方法, 其应用大多仍局限于血管结构成像。因此, 拓展 NIR-II 探针的种类、构建各类 NIR-II 探针的表面修饰方法使之能够实现针对特定细胞 (例如神经元)、蛋白质等的特异性标记, 将进一步拓展 NIR-II 共聚焦显微系统的功能成像应用。在此基础上, NIR-II 共聚焦显微系统还有望与自适应光学技术^[55-56]、多光子显微成像系统相整合进行优势互补, 优化 NIR-II 共聚焦显微成像效果并扩展成像的维度。另外, NIR-II 探针的低亮度和探测器的低灵敏度限制了 NIR-II 共聚焦显微成像系统的成像速度和成像深度, 随着对其深入的研究, NIR-II 共聚焦显微成像系统在成像速度和深度上必将进一步提升, 这将其应用于活体组织和器官的大深度、高时间分辨率监测提供条件。与此同时, NIR-II 共聚焦显微成像系统目前仍处于实验室使用阶段, 探索其面向生物医学的应用潜能、寻找其临床实际应用的最佳场景也将是 NIR-II 共聚焦显微技术的主要研究方向之一。

参考文献:

- [1] Cai Z C, Zhu L, Wang M Q, et al. NIR-II fluorescence microscopic imaging of cortical vasculature in non-human primates [J]. *Theranostics*, 2020, 10(9): 4265-4276.
- [2] Pettit E J, Hallett M B. Dynamic imaging of cytosolic free Ca^{2+} in human neutrophils using confocal laser scanning microscopy [J]. *Cell Biology International*, 1997, 21(10): 649-654.
- [3] Panzer J A, Song Y Q, Balice-Gordon R J. In vivo imaging of preferential motor axon outgrowth to and synaptogenesis at prepatterned acetylcholine receptor clusters in embryonic zebrafish skeletal muscle [J]. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(3): 934-947.
- [4] Forest F, Cinotti E, Yvorel V, et al. Ex vivo confocal microscopy imaging to identify tumor tissue on freshly removed brain sample [J]. *Journal of Neuro-oncology*, 2015, 124(2): 157-164.
- [5] Kim H M, Lee D K, Long N P, et al. Uptake of nanopolystyrene particles induces distinct metabolic profiles and toxic effects in

- Caenorhabditis elegans [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 246: 578-586.
- [6] Welscher K, Liu Z, Sherlock S P, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(11): 773-780.
- [7] Feng Z, Tang T, Wu T X, et al. Perfecting and extending the near-infrared imaging window [J]. *Light-Science & Applications*, 2021, 10(1): 197.
- [8] Zhu S J, Yang Q L, Antaris A L, et al. Molecular imaging of biological systems with a clickable dye in the broad 800-to 1,700-nm near-infrared window [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(5): 962-967.
- [9] Feng Z, Yu X M, Jiang M X, et al. Excretable IR-820 for in vivo NIR-II fluorescence cerebrovascular imaging and photothermal therapy of subcutaneous tumor [J]. *Theranostics*, 2019, 9(19): 5706-5719.
- [10] Qi J, Sun C W, Zebibula A, et al. Real-time and high-resolution bioimaging with bright aggregation-induced emission dots in short-wave infrared region [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(12): e1706856.
- [11] Li C, Li F, Zhang Y, et al. Real-time monitoring surface chemistry-dependent in vivo behaviors of protein nanocages via encapsulating an NIR-II Ag₂S quantum dot [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(12): 12255-12263.
- [12] Bruns O T, Bischof T S, Harris D K, et al. Next-generation in vivo optical imaging with short-wave infrared quantum dots [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1(4): 56.
- [13] He Y, Wang S F, Yu P, et al. NIR-II cell endocytosis-activated fluorescent probes for in vivo high-contrast bioimaging diagnostics [J]. *Chemical Science*, 2021, 12(31): 10474-10482.
- [14] Feng Zhe, Qian Jun. Advances on in vivo fluorescence bioimaging in the second near-infrared window [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617001. (in Chinese)
- [15] Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope [J]. *Scanning*, 1988, 10(4): 128-138.
- [16] Egger M D, Petráň M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells [J]. *Science*, 1967, 157(3786): 305-307.
- [17] Wilson T. Imaging properties and applications of scanning optical microscopes [J]. *Applied Physics*, 1980, 22(2): 119-128.
- [18] Frigault M M, Lacoste J, Swift J L, et al. Live cell imaging: Tips and tools [J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(3): 30A.
- [19] Waters J C. Chapter 6 Live-Cell Fluorescence Imaging[M]// Sluder G, Wolf D E. *Methods in Cell Biology*. Salt Lake City, UT, USA: Academic Press, 2013: 114, 125-150.
- [20] Lacoste J, Young K, Brown C M. Live-cell migration and adhesion turnover assays [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 931: 61-84.
- [21] Nagerl U V, Willig K I, Hein B, et al. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy [J]. *PNAS*, 2008, 105(48): 18982-18987.
- [22] Cabrera J, Olmo R, Ruiz-Ferrer V, et al. A phenotyping method of giant cells from root-knot nematode feeding sites by confocal microscopy highlights a role for CHITINASE-LIKE 1 in arabidopsis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 429.
- [23] Shen Jiabin, Chen Yaowen, Han Taizhen. Confocal imaging of Ca²⁺ transients and cell contractions simultaneously in heart cells [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2004, 13(3): 182-185.
- [24] O'Connell K F, Golden A. Confocal Imaging of the Microtubule Cytoskeleton in C. elegans Embryos and Germ Cells[M]// Paddock S W. *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer, 2014, 1075: 257-272.
- [25] Chisholm K I, Ida K K, Davies A L, et al. In vivo imaging of flavoprotein fluorescence during hypoxia reveals the importance of direct arterial oxygen supply to cerebral cortex tissue [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 876: 233-239.
- [26] Chu L L, Wang S W, Li K H, et al. Biocompatible near-infrared fluorescent nanoparticles for macro and microscopic in vivo functional bioimaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(11): 4076-4088.
- [27] Jonkman J, Brown C M. Any way you slice it-A comparison of confocal microscopy techniques [J]. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 2015, 26(2): 54-65.
- [28] Nipkow P. Electric telescope: Germany: 30105[P]. 1885-01-15.
- [29] Petráň M, Hadravský M, Egger M D, et al. Tandem-scanning reflected-light microscope [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1968, 58(5): 661.
- [30] Zhang Yanli, Dai Yali, Chen Yalan, et al. New methods for rapid experiment using spinning disk confocal microscope [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 19(19): 3784-3788. (in Chinese)
- [31] Zubkovs V, Antonucci A, Schuergers N, et al. Spinning-disc confocal microscopy in the second near-infrared window (NIR-II) [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 13770.
- [32] Zhu S J, Herraiz S, Yue J Y, et al. 3D NIR-II molecular imaging distinguishes targeted organs with high-performance NIR-II bioconjugates [J]. *Advances Materials*, 2018, 30(13): e1705799.
- [33] Wan H, Yue J Y, Zhu S J, et al. A bright organic NIR-II

- nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1171.
- [34] Yu X, Feng Z, Cai Z, et al. Deciphering of cerebrovasculatures via ICG-assisted NIR-II fluorescence microscopy [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(42): 6623-6629.
- [35] Yu W B, Guo B, Zhang H Q, et al. NIR-II fluorescence in vivo confocal microscopy with aggregation-induced emission dots [J]. *Science Bulletin*, 2019, 64(6): 410-416.
- [36] Qian J, Tang B Z. AIE luminogens for bioimaging and theranostics: From organelles to animals [J]. *Chem*, 2017, 3(1): 56-91.
- [37] Luo J D, Xie Z L, Lam J W Y, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1, 2, 3, 4, 5-pentaphenylsilole [J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1740-1741.
- [38] Hubel D H, Wiesel T N. Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences*, 1977, 198(1130): 1-59.
- [39] Rakic P. Specification of cerebral cortical areas [J]. *Science*, 1988, 241(4862): 170-176.
- [40] Que Bujun, Peng Shiyi, Geng Weihang, et al. The fluorescence in vivo wide-field microscopic imaging technology and application in the second near-infrared region [J]. *Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 2022, 41(1): 166-183. (in Chinese)
- [41] Zhang M, Yue J, Cui R, et al. Bright quantum dots emitting at $\sim 1, 600$ nm in the NIR-IIb window for deep tissue fluorescence imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(26): 6590-6595.
- [42] Xia F, Wu C, Sinefeld D, et al. In vivo label-free confocal imaging of the deep mouse brain with long-wavelength illumination [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6545-6555.
- [43] You L X. Superconducting nanowire single-photon detectors for quantum information [J]. *Nanophotonics*, 2020, 9(9): 2673-2692.
- [44] Kadin A M, Johnson M W. Nonequilibrium photon induced hotspot: A new mechanism for photo detection in ultrathin metallic films [J]. *Applied Physics Letters*, 1996, 69(25): 3938-3940.
- [45] Gol'tsman G N, Okunev O, Chulkova G, et al. Picosecond superconducting single-photon optical detector [J]. *Applied Physics Letters*, 2001, 79(6): 705-707.
- [46] You Lixing. A powerful tool for quantum information — superconducting nanowire single-photon detectors [J]. *Physics*, 2021, 50(10): 678-683. (in Chinese)
- [47] Reddy D V, Lita A E, Nam S W, et al. Achieving 98% system efficiency at 1550 nm in superconducting nanowire single photon detectors[C]//Rochester Conference on Coherence and Quantum Optics, 2019.
- [48] Hu P, Li H, You L, et al. Detecting single infrared photons toward optimal system detection efficiency [J]. *Optics Express*, 2020, 28(24): 36884-36891.
- [49] Reddy D V, Nerem R R, Nam S W, et al. Superconducting nanowire single-photon detectors with 98% system detection efficiency at 1550 nm [J]. *Optica*, 2020, 7(12): 1649-1653.
- [50] Chang J, Los J, Tenorio-Pearl J O, et al. Detecting telecom single photons with (99.5(-2.07)(+0.5))% system detection efficiency and high time resolution [J]. *APL Photonics*, 2021, 6(3): 036114.
- [51] Liao J L, Yin Y X, Yu J, et al. Depth-resolved NIR-II fluorescence mesoscope [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(5): 2366-2372.
- [52] Xia F, Gevers M, Fognini A, et al. Short-wave infrared confocal fluorescence imaging of deep mouse brain with a superconducting nanowire single-photon detector [J]. *ACS Photonics*, 2021, 8(9): 2800-2810.
- [53] Wang F, Ren F, Ma Z, et al. In vivo non-invasive confocal fluorescence imaging beyond 1, 700 nm using superconducting nanowire single-photon detectors [J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(6): 653-660.
- [54] Yu J, Zhang R L, Gao Y F, et al. Intravital confocal fluorescence lifetime imaging microscopy in the second near-infrared window [J]. *Optics Letters*, 2020, 45(12): 3305-3308.
- [55] Mao Yan, Tao Louis, Chen Liangyi. Application and development of adaptive optics to three-dimensional in vivo deep tissue fluorescent microscopy [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(6): 0602001. (in Chinese)
- [56] Wang Huawei, Cao Jianzhong, Ma Caiwen, et al. Design of infrared imaging system with adaptive correction function [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2014, 43(1): 61-66. (in Chinese)