



多光子成像技术的生物医学应用新进展

李少强 耿俊娴 李艳萍 刘雄波 彭晓 屈军乐 刘丽炜 胡睿

New advances in biomedical applications of multiphoton imaging technology

Li Shao-Qiang Geng Jun-Xian Li Yan-Ping Liu Xiong-Bo Peng Xiao Qu Jun-Le Liu Li-Wei Hu Rui

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 69, 228702 (2020) DOI: 10.7498/aps.69.20201039

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.69.20201039>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

双光子荧光与相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术的实验研究

Experimental study on two-photon fluorescence and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

物理学报. 2017, 66(10): 104204 <https://doi.org/10.7498/aps.66.104204>

荧光寿命显微成像技术及其应用的最新研究进展

Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application

物理学报. 2018, 67(17): 178701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180320>

给体位置和数目对四苯基乙烯衍生物双光子吸收性质的影响

Effects of donor position and number on two-photon absorption properties of tetraphenylethylene derivatives

物理学报. 2019, 68(18): 183101 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190471>

对甲氧基苯甲腈的单色共振双光子电离光谱

One color resonance two-photon ionization spectra of p-methoxybenzotrile

物理学报. 2017, 66(9): 093301 <https://doi.org/10.7498/aps.66.093301>

受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展

New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy

物理学报. 2020, 69(10): 108702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200168>

利用速度成像技术研究碘乙烷多光子电离解离动力学

Multiphoton ionization dissociation dynamics of iodoethane studied with velocity map imaging technique

物理学报. 2018, 67(20): 203301 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20181468>

综述

多光子成像技术的生物医学应用新进展*

李少强 耿俊娴 李艳萍 刘雄波 彭晓 屈军乐 刘丽炜 胡睿†

(深圳大学物理与光电工程学院, 教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 深圳 518060)

(2020年7月2日收到; 2020年8月3日收到修改稿)

多光子成像技术由于具有低侵入性、强穿透力、高空间分辨率等优点, 自问世以来便成为生物医学研究的有力工具, 在癌症病理、神经疾病及脑功能成像等方面取得了一系列较好的研究成果. 目前, 应用较为广泛的多光子成像技术是双光子激发荧光显微成像技术, 其在生物医学应用中具有较大的发展潜力. 本文详细阐述了多光子成像技术在多色成像、功能成像及成像深度等方面的生物医学应用新进展, 包括多色双光子激发荧光显微成像、双光子激发荧光寿命显微成像、双光子光纤内窥成像和三光子显微成像技术, 并简要介绍这几种多光子成像技术的原理与特性, 最后展望其未来发展前景.

关键词: 多色双光子成像, 双光子激发荧光寿命成像, 双光子光纤内窥, 三光子成像

PACS: 87.64.mm, 87.64.M-, 87.64.kv, 87.85.Pq

DOI: 10.7498/aps.69.20201039

1 引言

多光子激发是指在具有高光子密度的入射光激发下, 处于基态的分子/原子同时吸收多个光子后跃迁到激发态, 经过弛豫过程跃迁到亚激发态, 最后自发辐射回到基态, 释放出频率略小于多倍入射光频率的荧光光子^[1]. 1990年 Denk 等^[2]开发了第一台双光子激光扫描显微镜后, 多光子成像就以其低侵入性、高穿透性、高空间分辨率等优势走进人们的视野. 目前最常见的多光子成像技术是双光子激发荧光 (two-photon excited fluorescence, 2PEF) 和三光子激发荧光 (three-photon excited fluorescence, 3PEF) 成像, 它们对应的能级图如图 1 所示.

相较于单光子激发荧光、激光扫描共聚焦和宽场成像等技术, 多光子成像技术具有以下优点: 1) 多光子成像技术通常采用的激发光为波长较长的近红外光, 相比可见光, 近红外光在生物组织中的穿透能力更强, 能够观察到生物组织中更深层的

信息, 侵入性较低; 2) 多光子成像只有在激发光焦点附近的区域才能激发荧光, 因此多光子成像技术具有天然的光学层析能力, 能更好地对生物组织进行三维成像; 3) 多光子成像在样品的非焦点区域不产生荧光, 能自动抑制离焦信号, 因而相比宽场成像技术, 多光子成像能实现近乎衍射极限的空间

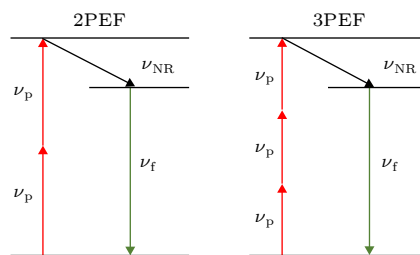


图 1 2PEF、3PEF 过程能级图. 2PEF 和 3PEF 都是非直接激发辐射过程, 存在非辐射能量转移. 图中 ν_p 为吸收光子频率, ν_f 为发射荧光频率, ν_{NR} 为非辐射能量转移.

Fig. 1. Energy level diagram of 2PEF and 3PEF process. Both 2PEF and 3PEF are indirect excitation radiation processes, and there is non-radiative energy transfer. In the figure, ν_p is the frequency of absorbed photons, ν_f is the frequency of emitted fluorescence, and ν_{NR} is the non-radiative energy transfer.

* 国家科技部重点研发项目 (批准号: 2017YFA0700402)、国家自然科学基金 (批准号: 61525503, 61722508, 61620106016, 61835009, 61935012, 61961136005) 和深圳市自由探索项目 (批准号: JCYJ20180305124902165) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: rhu@szu.edu.cn

分辨率, 因此能观察到组织内更细微的结构; 4) 与共聚焦成像技术相比, 多光子成像技术不需要使用针孔滤波, 荧光收集效率高。

2PEF 是目前最常见的多光子成像技术, 因其具有如上优点而被广泛应用于生物医学领域, 其对系统要求较简单, 许多活体内源性荧光团或光学探针都具有双光子吸收效应, 能进行双光子激发荧光显微成像。而且 2PEF 容易与其他光学手段如荧光寿命显微成像技术、光纤内窥成像技术、光片技术等结合, 实现样品信息更多维度信息或更高的成像指标。但其在应用时也存在缺陷, 致使其在多色成像、功能成像、成像深度等方面仍面临着巨大挑战。例如, 利用 2PEF 研究含有多种荧光团的样品时, 难以实现多种荧光团的同时最优激发。而多色双光子激发荧光显微成像通过增加激光器或采用连续光谱的方法, 可以实现对多色标记的细胞或蛋白质的同时成像和动态追踪。另外, 2PEF 虽然能对样品进行高分辨率成像, 但其获得的仅仅是荧光强度信号, 信息维度有限, 双光子激发荧光寿命显微成像通过探测荧光寿命信息, 可以在进行高分辨三维成像的同时获取生物组织的生化特性信息。此外, 2PEF 在生物医学成像的应用常局限在细胞、离体样品或者活体表层, 难以进行体内深层器官组织成像, 双光子光纤内窥成像通过减小系统尺寸, 能将成像延伸到活体内深处组织, 提供了低侵入性的解决方案。在进行活体脑功能成像时, 2PEF 虽然可以通过增加波长来减少组织散射, 但最终成像深度受限于信号背景比为 1 的条件^[3], 而三光子显微成像技术通过将波长拓展到 1600 nm 到 1820 nm, 在该波长范围内激发光的衰减最小, 由此在活体脑成像时能获得更高的成像深度和信噪比。可见, 多色双光子激发荧光显微成像、双光子光纤内窥成像、双光子激发荧光寿命显微成像和三光子显微成像技术这几种多光子成像技术能大大拓宽传统 2PEF 的生物医学应用范围, 具有极大的发展潜力。本文简要介绍了这几种多光子成像技术的成像原理及其生物医学应用, 最后对其未来发展趋势进行展望。

2 多色双光子激发荧光显微成像

监测人体微环境中细胞、蛋白质、DNA 等动态特性和相互作用, 对于活体成像和免疫治疗等研

究具有重大意义。多色荧光显微成像使用具有不同发射光谱的荧光团标记不同的细胞、蛋白质、DNA 等, 通过荧光团的光谱信息区分标记样品的类型和功能, 从而实现多种标记物的动态追踪^[4]。在共聚焦成像中, 单光子多色成像通常采用一个波长激发多种标记物, 但是由于荧光团的单光子激发光谱较窄, 不同荧光团的激发光谱可能相差很大, 所以一个波长难以激发多种荧光团^[5]。相比之下, 常见的荧光团的双光子激发光谱更宽^[6], 不同荧光团激发光谱重叠可能性大, 故多色双光子激发荧光显微成像更容易实现。图 2 所示为典型的激光扫描多色双光子激发荧光显微成像系统。

针对多色标记荧光团的实时动态监测, 需要同时有效地激发多色荧光标记物, 并且在成像时快速区分荧光标记物所标记的细胞、细胞器或蛋白质等。由于许多荧光物质的双光子吸收光谱较单光子吸收光谱要宽, 光谱重叠较高, 所以用单一波长的光源也可以同时激发多种荧光团, 实现多色双光子激发荧光显微成像, 但荧光团的最佳激发波长往往不一致, 单一波长的光源无法实现最优激发, 且当荧光团本身双光子吸收截面较小时, 为了获取多种荧光团的荧光信号, 往往需要增加功率来提高荧光强度, 这会引起光毒性和产生光漂白效应。此外, 增加激光功率也会使细胞产生内源性自发荧光, 其与所用荧光团发射的荧光可能存在光谱重叠现象, 这种光谱串扰会影响对于标记细胞或蛋白质的动态监测。

为了实现多种荧光团的同时最优激发, 提升多色双光子激发荧光显微成像的信号强度, 可以采用多个波长或宽带光谱的激发光源。前一种方法的实现可以采用两个或两个以上的飞秒激光器作为多波长激发光源^[7], 或采用拓展激发光的光谱波段的方法, 如光参量振荡器 (optical parametric oscillator, OPO)^[8]。利用钛蓝宝石振荡器作为抽运源, 可以使 OPO 输出 1200 nm 以上的近红外波段范围内连续调谐的超短脉冲激光。然而, 增加光源的成本很高, 成像光路也会由此变得复杂, 限制了这种多激励源技术在多色双光子激发荧光显微成像上的应用。后一种方法是利用宽带可压缩的连续光谱脉冲来实现多色双光子激发荧光显微成像, 主要包括两种: sub-20 fs 激光器发射的宽谱脉冲^[9]和基于 100 fs 激光器产生的光纤连续光谱^[10]。sub-20 fs 激光器产生的短脉冲具有 100 nm 以上相位稳定的

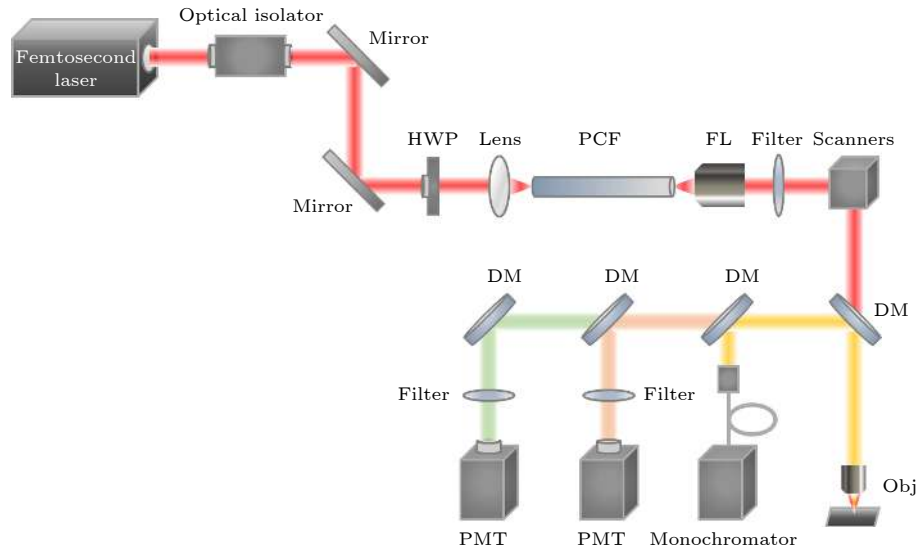


图2 激光扫描多色双光子激发荧光显微镜系统示意图. 图中各部分为: Femtosecond Laser, 飞秒激光器; Optical isolator, 光隔离器; Mirror, 反射镜; HWP (half-wave plate), 半波片; Lens, 透镜; PCF (photonic crystal fiber), 光子晶体光纤; FL (fiber launcher), 光纤耦合器; Filter, 滤光片; Scanners, 扫描振镜; DM (dichroic mirror), 二向色镜; PMT (photomultiplier tube), 光电倍增管探测器; Monochromator, 单色仪; Obj (objective), 物镜

Fig. 2. Schematic diagram of laser scanning multicolor two-photon fluorescence microscope system. The abbreviations in the figure are as follows: HWP, half-wave plate; PCF, photonic crystal fiber; FL, fiber launcher; DM, dichroic mirror; PMT, photomultiplier tube; Obj, objective.

光谱带宽. 通过脉冲整形引入的相位函数改变该脉冲光谱的相位相干性, 从而改变脉冲频率, 进一步提升荧光团的双光子激发效率, 实现对应荧光团的选择性激发. 该方法无需调节光路来选择激发波长, 但系统同样复杂, 且需要特定的激光器. 而采用光纤产生超连续光来实现多色双光子激发荧光显微成像则只需常用的 100 fs 激光器, 其原理是利用激光器的飞秒脉冲在光纤中的非线性传输特性, 结合脉冲压缩技术产生宽带光谱、短脉宽的飞秒脉冲. 该技术不仅能实现多色双光子荧光团的最优激发, 还能显著提升双光子激发荧光的效率. 早期的连续光谱是用激光在普通单模光纤的正常色散区传输产生的^[11], 但光源系统十分复杂. 而目前人们则采用具有零色散点的光子晶体光纤 (photonic crystal fiber, PCF) 来产生连续光谱. 利用孤子效应可以产生较宽光谱范围的连续光谱, 且选择合适的 PCF 的参数可有效控制零色散点的位置. 但由于孤子效应通常发生在 PCF 的反常色散区, 因而其产生的连续光谱对振动和噪声十分敏感, 即使是很微弱的振动也会使光谱结构发生极大变化, 光谱相干性剧烈下降. 因此, 设计更为简单的系统来实现多种荧光团的同时最优波长激发, 同时在一定程度上保证双光子激发效率和避免光谱串扰问题, 仍

是多色双光子激发荧光显微成像技术发展的重要方向.

多色双光子激发荧光显微成像技术在癌症诊断方面发挥着重要作用. 在早期的疾病诊断与病理学研究中, Li 等^[12]通过采用 PCF 产生波长范围为 600—700 nm 的连续光谱激发细胞内源性荧光, 对细胞内的 NADH 和色氨酸成像. 以色氨酸的荧光作为参考, 对比色氨酸与 NADH 两者的信号强度, 从而实现正常细胞与癌细胞的区分, 继而通过研究细胞代谢活性与蛋白质的表达, 实现非侵入性癌症诊断. 此后, Li 等^[13]还使用 OPO 技术来获得超短飞秒脉冲, 在 600 nm 波段进行双光子激发, 并通过对 NADH, FAD 和色氨酸的多色双光子荧光成像, 成功地检测了皮肤癌症炎症. Le Dévédec 等^[14]采用多色双光子激发荧光显微成像来实现诱导基因表达, 利用小鼠模型研究了乳腺癌细胞群体的转移行为. 其结果证明了该系统可用于研究个体候选转移基因在体内外的作用, 并在研究癌症转移中的细胞事件也可发挥作用. Entenberg 等^[15]利用两个钛蓝宝石激光器, 对用 CFP, EGFP, TagRFP657 等荧光蛋白标记的小鼠乳腺癌肿瘤细胞实现多色双光子荧光成像. Piatkevich 等^[16]开发了两种红色荧光蛋白 LSS-mKate1 和 LSS-mKate2, 它们具

有较大的斯托克斯位移, 激发/发射最大值分别在 463/624 nm 和 460/605 nm. 通过将这些荧光蛋白应用于乳腺癌的小鼠异种移植模型进行多色双光子激发荧光显微成像, 该小组观察到乳腺癌细胞在活体小鼠血管中显示出明显的极化作用, 其成像结果如图 3 所示.

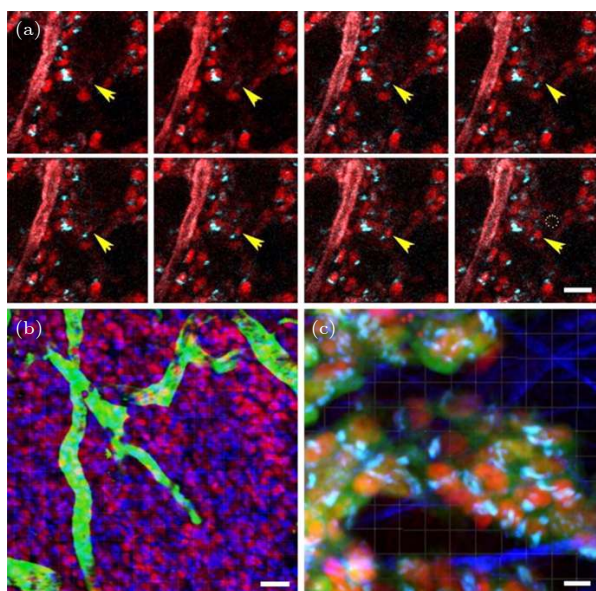


图 3 NLS-LSS-mKate1 标记细胞核 (红色) 和 GalT-ECFP 标记高尔基 (蓝色) 的肿瘤细胞的多色双光子激发荧光显微成像^[16]. 比例尺: 10 μm

Fig. 3. Multicolor two-photon excited fluorescence microscopy of tumor cells with NLS-LSS-mKate1 labeled nucleus (red) and GalT-ECFP labeled Golgi (blue)^[16]. Scale bar: 10 μm .

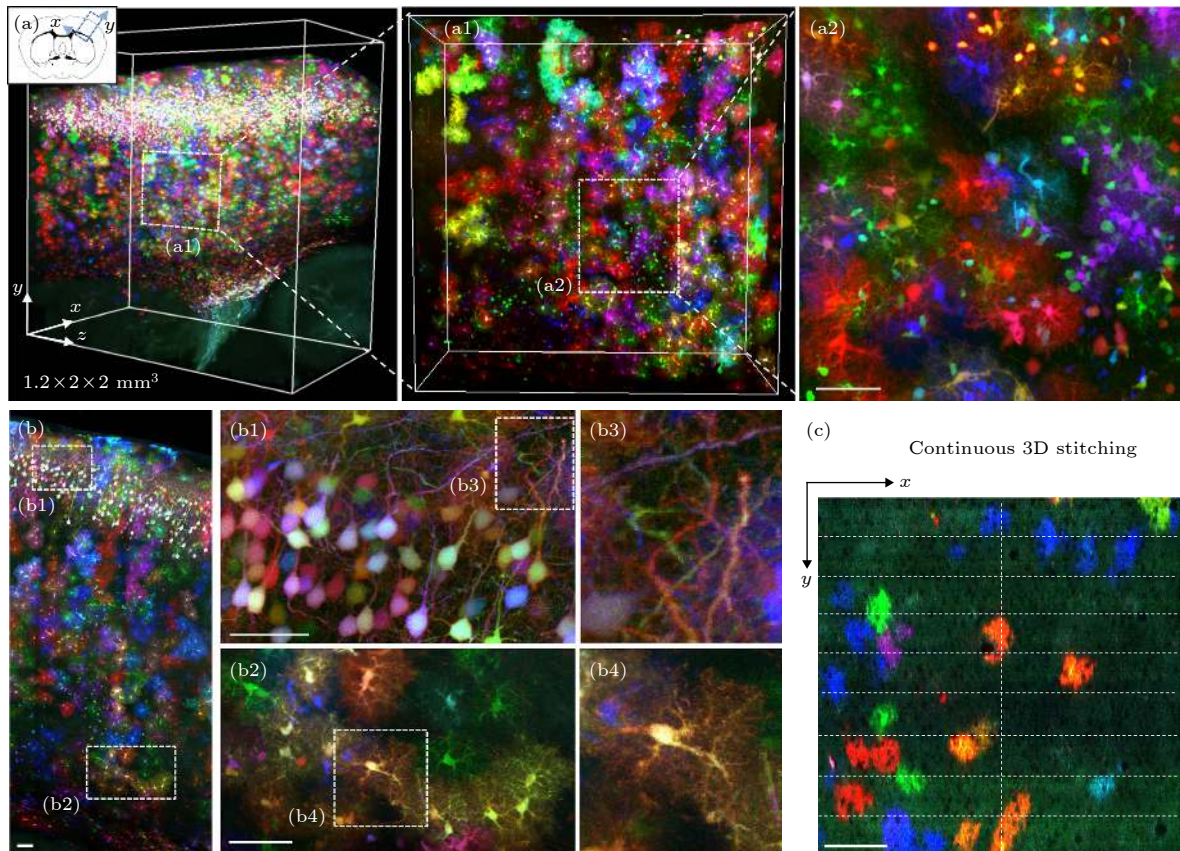
如今, 多色双光子激发荧光显微成像已被越来越多地应用到神经科学领域研究中, 可实现在亚细胞水平记录生命活动信息. Collot 等^[17] 开发了用于细胞和组织中脂质滴的多色成像的超亮荧光探针, 实现了对小鼠肝脏的多色双光子激发荧光显微成像. Garaschuk 等^[18] 通过在小鼠脑内注射多种染料混合物并进行多色成像, 可得到小鼠大脑表面 500 μm 处不同神经元及神经胶质细胞的成像, 该方法适用于不同物种的各个发育阶段脑组织染色, 还能对进行活体实时钙信号记录. Hayakawa 等^[19] 发现当细胞质中游离的 Ca^{2+} 浓度超过 15 $\mu\text{mol/L}$ 时会立即诱导线粒体去极化, 这个过程与线粒体中 NADH 的氧化有关. 通过采用多色双光子显微成像来表征单个神经元中的线粒体反应, 实现了对小鼠神经元中的单个线粒体的多色荧光显微成像, 证明了哺乳动物中枢神经元中线粒体去极化介导

的快速的 Ca^{2+} 依赖性的氧消耗. Mahou 等^[20] 利用飞秒激光器与 OPO 产生的同步脉冲, 实现了具有不同吸收光谱的 3 个荧光团的多色双光子激发荧光显微成像. 利用荧光团来标记细胞, 实现了小鼠脑组织的实时多色成像及果蝇胚胎中的多色荧光与三次谐波成像. 2014 年, Mahou 等^[21] 又将先前的工作进行了拓展, 将双光子光片照明与混合波长激发相结合, 实现了用 28 MHz 像素速率来记录斑马鱼胚胎中跳动心脏的四维多色荧光显微成像, 且光漂白几乎忽略不计. 2017 年, 该团队利用波长混合 (wavelength mixing) 技术, 对 NADH 和 FAD 这两种内源性荧光团实现高效双色双光子成像, 同时结合双光子激发荧光寿命成像技术对人皮肤和线虫中 NADH 和 FAD 的寿命梯度进行重建^[22]. 随后, 2019 年, 该团队又提出彩色多光子串行显微镜 (chromatic multiphoton serial microscopy, ChroMS)^[23], 通过波长混合技术将三色双光子激发与自动连续组织切片结合, 能达到微米级分辨率的多色成像效果, 由此还实现了小鼠脑内的三维多色成像. 图 4 展示了用 ChroMS 对小鼠皮层组织进行连续三维成像的结果.

随着荧光探针和激光光源技术的不断发展, 多色双光子激发荧光显微成像技术也在生物医学中得到越来越多的应用. 而与其他光学成像技术的结合, 如光片显微技术、荧光寿命成像显微技术 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 等, 能不断拓宽多色双光子激发荧光显微成像技术的功能及应用领域. 未来随着超短脉冲激光器和信号探测技术的不断发展, 多色双光子激发荧光显微成像技术将会具有更好的应用前景.

3 双光子激发荧光寿命成像

荧光寿命是指当组成物质的分子在受到光脉冲的激发跃迁到高能级后, 回到基态前在激发态的平均停留时间, 大约为 ns 量级, 常用 τ 表示^[24]. 荧光寿命是荧光物质的自身属性, 通常与激光的激发强度、光照时间和染料浓度等因素无关, 而与物质自身所处微环境及其本身的结构等条件有关. 由于荧光寿命是荧光分子的固有性质, FLIM 技术可以提供比强度、光谱更清晰的荧光染料标记, 并且它包含关于荧光标记的局部分子环境和发色团光物理学的信息, 因此, FLIM 技术在成像时具有特异

图 4 小鼠皮层组织的连续三维多色成像^[23]Fig. 4. Continuous three-dimensional multicolor imaging of mouse cortical tissue^[23].

性强和灵敏度高的优点,能增强生物样品的图像对比度,而且还可以获取荧光分子所在的微环境中的物理、化学及生物信息.该技术目前已成为生物学、生物物理学和生命科学领域中研究样品生化性质的有力工具.

测量荧光寿命的方法主要包括频域法和时域法^[25].频域法又称相位调制法,主要有外差法和零差法.如图 5(a)所示,它利用强度按正弦规律调制的激光激发样品,从而使得样品发出的荧光强度也具有相同的正弦调制频率.通过测量荧光和激发光之间的解调系数及两者之间的相位差 $\Delta\varphi$ 后可以计算得到荧光寿命值.而时域法,也称作脉冲法,主要有时间相关单光子计数法(time-correlated single photon counting, TCSPC)、门控探测法(time-gated detection)和条纹相机测量法(streak camera)3种实现方式.时域法测量荧光寿命的方法是利用超短脉冲光源来激发被测样品,以测量出样品荧光强度的时间衰减规律,再通过计算或拟合得到寿命^[26].TCSPC是目前测量荧光寿命最常用的方法,如图 5(b)所示,其原理是通过记录激发脉冲过后

首个荧光光子到达探测器的时间,并记录到对应的时间通道中,多次重复建立一个正比于荧光衰减曲线的光子数-时间分布直方图.常见的频域法及 TCSPC 法测量荧光寿命的原理及双光子 TCSPC-FLIM 成像系统如图 5 所示.

双光子 FLIM 是将双光子成像技术与 FLIM 技术的结合,可获取生物组织的生化特性信息,同时进行高分辨三维成像,实现功能和结构的精确定量表征.两种技术结合的特点在于:1)双光子 FLIM 使用的激发波段较长,穿透深度更大,能够获取生物样品深层的荧光寿命信息;2)双光子显微成像技术使用的是脉冲激发光源,荧光激发效率高,能满足荧光寿命探测的需要,而双光子显微成像所固有的层析能力,能在测量厚样品时避免不同深度信号之间的干扰^[27].可见,将双光子成像技术与 FLIM 技术结合,拓宽了荧光信息探测模式的维度,具有广阔的应用前景,能为生物医学领域提供强有力的研究手段.

与传统基于荧光强度的活体成像方法相比,双光子 FLIM 技术可以提供更多的生化和医学诊断

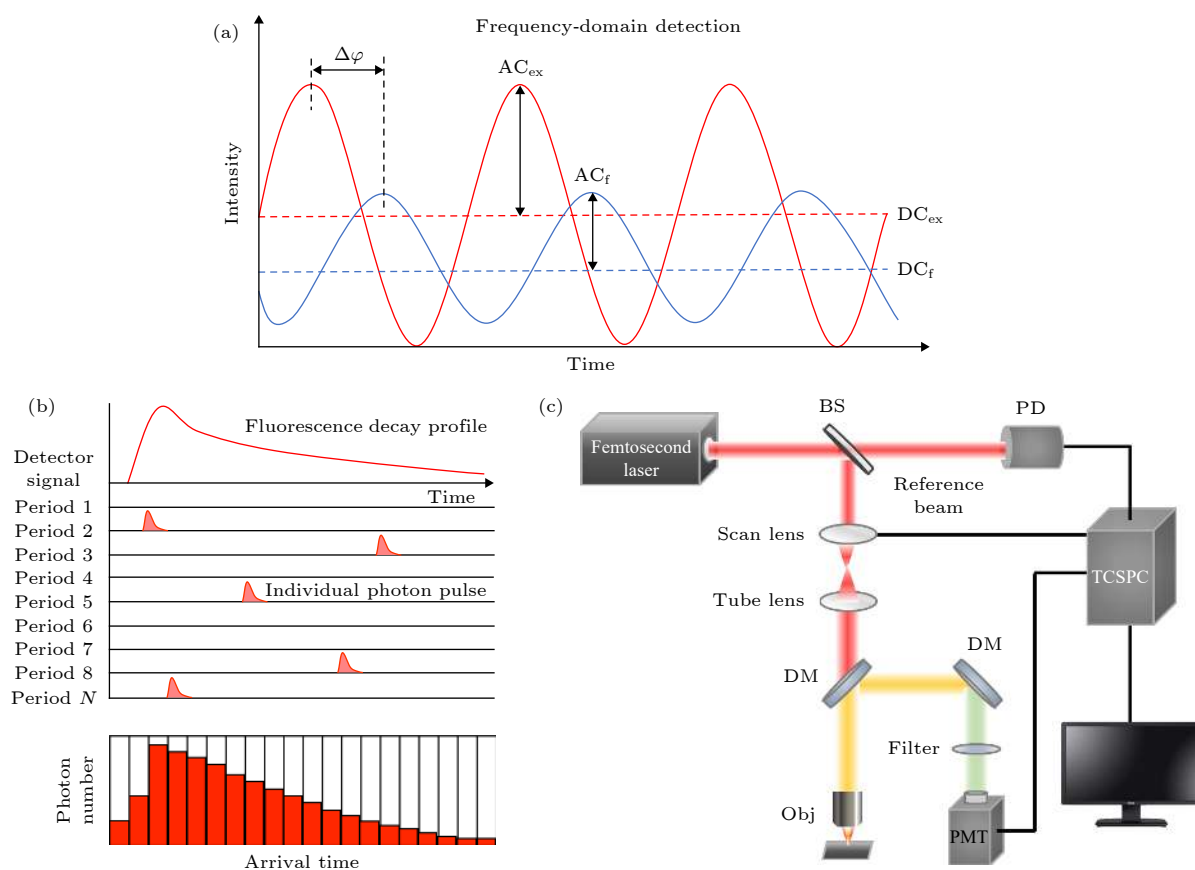


图 5 常见的荧光寿命测量方法及双光子 TCSPC-FLIM 成像系统示意图 (a) 频域法; (b) TCSPC 法; (c) 基于 TCSPC 的双光子 FLIM 成像系统示意图. 图中各部分为: Femtosecond Laser, 飞秒激光器; BS (beam splitter), 分光镜; Scan Lens, 扫描镜; Tube Lens, 镜筒透镜; DM (dichroic mirror), 二向色镜; Obj (objective), 物镜; Filter, 滤光片; PMT (photomultiplier tube), 光电倍增管探测器; Reference Beam, 参考光; PD (photodiode), 光电二极管; TCSPC, 时间相关单光子计数法

Fig. 5. Schematic diagram of common fluorescence lifetime measurement methods and imaging systems: (a) Frequency domain method; (b) TCSPC method; (c) schematic diagram of a two-photon FLIM imaging system based on TCSPC. The abbreviations in the figure are as follows: BS, beam splitter; DM, dichroic mirror; Obj, objective; PMT, photomultiplier tube; PD, photodiode; TCSPC, time-correlated single photon counting.

信息. 目前用双光子 FLIM 技术监测细胞组织的代谢状态常用的手段是对 NADH 和 FAD 等内源性荧光标记物进行寿命信息探测. 表 1 给出了双光子 FLIM 监测 NADH 和 FAD 的工作原理.

在肿瘤的形成和发展过程中, 细胞的代谢情况也会发生相应变化. 与正常细胞相比, 癌变前细胞中的 NADH 和 FAD 的荧光寿命及氧化还原比存在较大差异^[29]. NADH 的生化特性对于确定细胞代谢活性至关重要. 利用双光子 FLIM 测量游离或结合蛋白质的 NADH 的荧光寿命有助于我们推导细胞内氧化还原的状态, 这已成为分析诊断癌症的一种有效工具. Anh 等^[30]发现与普通的二维的细胞培养方法相比, 在三维的胶原蛋白基质中培养的癌细胞中 NADH 寿命更长, 原因在于三维培养时更多的 NADH 与酶结合, 此外该团队还对比了二维

和三维培养形式下的 4T1 细胞对靶向线粒体和氧化磷酸化途径的新型 MCT 抑制剂 (MD1) 和 TPPBr 的代谢反应. 深圳大学屈军乐教授课题组^[31]开展了双光子 FLIM 技术的生物医学应用研究, 已将该技术与肿瘤的机理与诊断方法研究结合起来, 取得了初步的进展. 2019 年, 该团队利用双光子 FLIM 技术从基底细胞癌切片中提取荧光寿命信息, 构建了 LSVM 模型, 能更精确评估皮肤癌症的发展阶段^[32]. 之后, 该团队又将共聚焦、双光子、FLIM 技术相结合构建了多模态成像系统^[33], 可快速得到生物样品中的谐波及寿命信息. 如图 6 所示, 通过将 FLIM 与相量分析法结合, 该团队揭示了肝癌切片中癌转移的能量代谢变化. 另外, 前列腺癌是男性的主要癌症之一, 目前仍缺乏能够预测前列腺癌治疗反应的实验方法. 而癌症中的线粒体功能障

碍(如缺陷性氧化磷酸化)通过调节活性氧(reactive oxide species, ROS)产生和细胞信号传导来抑制细胞凋亡提供了前列腺癌的评估手段,其纠正和凋亡的诱导是癌症治疗的可行方法之一. 据此, Alam

等^[34]利用FLIM测量NADH, FAD及色氨酸(Trp)三者及其与酶结合部分的寿命来定量描述前列腺癌细胞中的线粒体代谢反应,并评估抗癌药阿霉素对前列腺癌细胞的作用. 在治疗之后, NADH与酶

表1 双光子FLIM监测NADH和FAD的工作原理^[28]

Table 1. Working principle of NADH and FAD monitoring by two-photon FLIM^[28].

名称	本质	主要分布	工作原理	与FLIM联系	生理功能
NADH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的还原态, 一种还原型辅酶	线粒体和细胞质	在氧化还原反应中, NADH作为氢和电子的供体, NAD作为氢和电子的受体	NAD与脱氢酶结合时, 激发和发射都有蓝移, 同时荧光量子产率增加. NADH跟蛋白质结合后显示较长的寿命成分. FLIM还可以计算这些物质的相对含量	改善能量水平、保护细胞、促进神经递质的产生等
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸, 某些氧化还原酶的辅基	线粒体	FAD参与体内各种氧化还原反应, 在生物氧化化系统中起传递氢的作用	游离的FAD分子显示较长的寿命成分, 和蛋白质结合的FAD分子显示较短的寿命成分	可做成活性型维生素B2, 用于神经性耳鸣、脑动脉硬化等

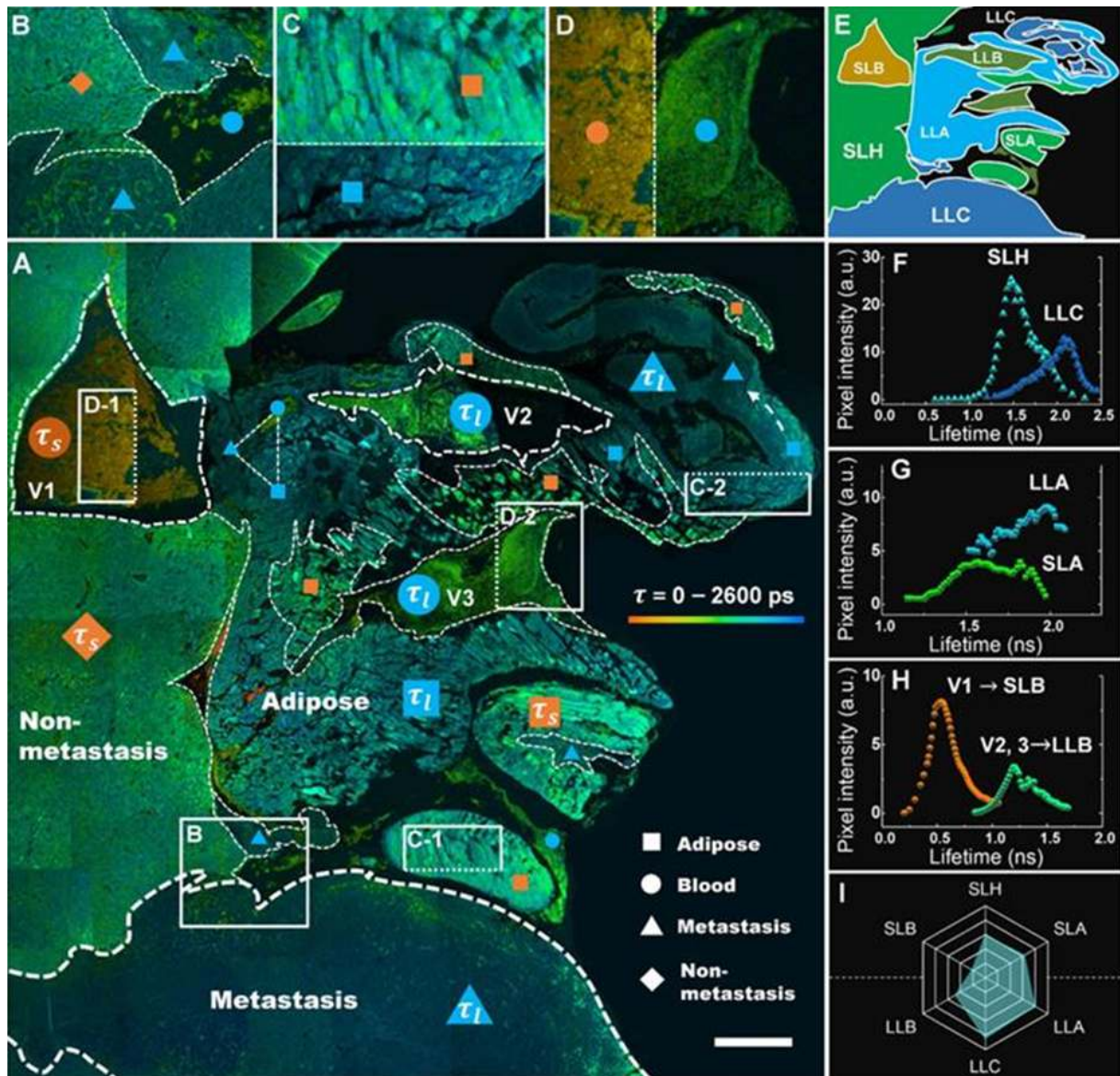


图6 利用双光子FLIM技术揭示肝脏切片上的癌症转移^[33]

Fig. 6. Using two-photon FLIM technology to reveal cancer metastasis on liver slices^[33].

结合的寿命贡献增加, 而 FAD 与酶结合的寿命贡献减少, 通过 FLIM 分析推断 NADH/FAD 和细胞内 ROS 的氧化还原比增加, 随后诱导了细胞凋亡活性. 脑肿瘤也是常见的癌症之一, 由于脑肿瘤无明显边界, 在切除肿瘤组织时容易伤及正常脑区域, 肿瘤难以彻底切除. FLIM 由于具有高特异性和非侵入性等优点, 已逐渐成为脑肿瘤研究的热点之一. Poulon 等^[35]通过对人脑肿瘤样品的内源性荧光团进行分析, 证实了双光子 FLIM 具有分辨肿瘤与非肿瘤脑组织及肿瘤转移的能力. Kantelhardt 等^[36]首次将双光子 FLIM 应用到胶质母细胞瘤的手术成像中, 该团队在活体中观察发现了蛛网膜和实体瘤组织的显微结构和荧光寿命存在差异, 证明了双光子 FLIM 技术用于脑肿瘤检测的潜力. 在口腔癌研究中, Teh 等^[37]通过建立二甲基苯并蒽诱导的仓鼠颊囊黏膜癌模型, 同样基于 NADH 和 FAD, 从细胞代谢角度出发, 证实了双光子 FLIM 技术具有分辨口腔癌及其他早期癌症癌前病变的能力. Rück 等^[38]从能量代谢角度研究人口腔黏膜细胞, 发现相比正常细胞, 恶性的口腔黏膜细胞平均荧光寿命更长, NADH 含量降低. 除 NADH 和 FAD 外, 研究人员也在积极进行其他内源性荧光团的研究, 如 Shen 等^[39]通过双光子 FLIM 技术对内源性胆红素的荧光寿命信息进行口腔癌的检测研究, 研究表明口腔癌细胞中的胆红素荧光寿命更长. 在胃癌研究中, Li 等^[40]用双光子 FLIM 对新鲜人胃窦黏膜的胃癌样本进行成像, 结果表明通过荧光寿命可以清晰分辨健康胃黏膜与癌症区域的亚结构, 包括表皮结构、固有层、胃癌的间质组织及粘液上皮细胞、杯状细胞等多种细胞类型, 通过提取子结构的光谱和寿命信息, 还能区分胃癌的多个阶段.

双光子 FLIM 技术也逐渐成为神经科学领域

研究的有力工具之一. 阿尔兹海默症是一种神经系统退行性疾病, 其发病机理被认为与淀粉样蛋白 ($A\beta$) 有关. Tyurikova 等^[41]用双光子 FLIM 技术结合膜片钳电生理学监测脑切片中星形胶质细胞和神经元中的 Ca^{2+} 浓度, 发现在切片中注射亚微摩尔的 $A\beta$ 会引发相邻星形胶质细胞中 Ca^{2+} 浓度显著提高, 该现象反映 $A\beta$ 对于脑细胞生理作用存在一定影响. 之后该团队又采用双光子 FLIM 技术对钙离子荧光指示剂 OGB-1 成像^[42], 开发了一种监测单细胞内 Ca^{2+} 离子的方法, 在脑切片与原位神经细胞上证明了该方法具有更高的信噪比与灵敏度. Feeks 等^[43]将自适应光学与双光子 FLIM 结合, 对小鼠视网膜中的非固有荧光团进行成像, 如图 7 所示. 通过在小鼠模型中使用遗传编码的钙指示剂, 观测双光子自发荧光和荧光寿命的变化, 可以探测多种功能反应. 这项研究还为分子靶向的进一步应用和疾病进展的研究打开了大门, 通过观察视网膜的荧光寿命变化, 可以为患有糖尿病性视网膜病和斯塔加特病的较早阶段患者检测疾病进展. 帕金森氏症是目前最困扰人类的病症之一, Chakraborty 等^[44]通过双光子 FLIM 研究神经元细胞中 NADH 和 FAD 的荧光寿命成分, 以及在 MPP+ (1-甲基-4 苯基吡啶) 处理后寿命的变化. 该团队发现, 在经 MPP+ 处理的细胞中, 游离和结合蛋白的 NADH 及游离和结合蛋白的 FAD 的荧光寿命都有统计学上的显著降低. 这些结果表明, 在 MPP+ 处理的细胞中能量产生从氧化磷酸化向厌氧糖酵解的转变, 这可以潜在地用作细胞代谢指标, 以评估细胞水平上帕金森氏症的情况.

尽管双光子 FLIM 技术已经取得了一系列的研究进展, 但在实际应用中仍面临着一些挑战. 如:

1) 双光子 FLIM 技术系统较为复杂, 成本昂贵, 对

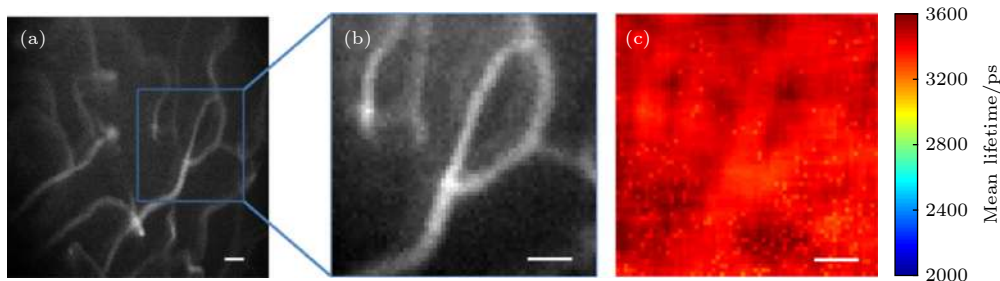


图 7 小鼠视网膜毛细血管成像^[43] (a) 双光子荧光强度图像; (b) 图 7(a) 中的局部血管; (c) 图 7(b) 对应的荧光寿命图像. 比例尺: 25 μm

Fig. 7. Imaging of mouse retinal capillaries^[43]: (a) Two-photon fluorescence intensity image; (b) local blood vessel in Fig. 7 (a); (c) fluorescence lifetime image corresponding to Fig. 7 (b). Scale bar: 25 μm .

激发光源和探测器都有着较高要求, 庞大昂贵的硬件系统限制了双光子 FLIM 技术在临床医学上的应用; 2) 双光子 FLIM 技术的穿透深度仍限制在几百微米以内, 难以探测生物组织深层信息; 3) 双光子 FLIM 技术在数据采集与处理上都较为耗时, 采集一张高分辨率的图像往往要耗时几秒甚至几分钟, 大大限制了该技术的应用. 未来随着激发光源技术、信号采集及数据处理技术的进一步发展, 双光子 FLIM 技术的性能有望得到进一步的提升.

4 双光子光纤内窥成像

传统的 2PEF 虽然能为我们提供生物细胞组织的清晰成像, 但由于其成像系统较复杂, 器件较多, 体积庞大. 并且在现阶段, 大部分对于生物细胞组织的成像仍局限在离体细胞培养, 亦或是局限在生物体表层一定深度. 而生物体内的微环境十分复杂, 体内环境与离体环境差别巨大, 在离体环境下观察得到的结果可能与体内环境相差甚远. 而通过腹窗手术等方法^[45]虽然可以实现活体的细胞组织成像, 但这些方法具有高侵入性, 对生物体损害较大, 也不能实现长时间的活体成像, 这些因素都限制了双光子显微镜在活体成像中的应用. 随着光纤内窥技术的不断发展, 双光子光纤内窥成像技术逐渐克服了传统光学显微镜的物理限制, 为长时间活体成像提供了一种有效手段.

光纤内窥成像技术是将光纤或光纤束从管腔伸入活体内部组织器官的一种成像技术, 由于光纤体积小, 弯曲性好, 对生物体的侵入性较小, 使用上也比较便捷, 特别适合长时间活体内部成像. 该技术通过光纤导入激发光激发组织器官产生荧光, 然后使用微型探头收集荧光并传递到体外的光电探测器进行成像. 双光子光纤内窥成像技术则是集合了 2PEF 和光纤内窥成像两者的优势, 由于 2PEF 采用的波长较长, 在组织中的散射较少, 穿透能力更强, 与光纤内窥的结合能够获得更深组织的成像, 且图像对比度也能有所提高^[46], 在活体成像领域具有良好的发展前景. 最早用于双光子光纤内窥成像的光纤是单模光纤, Bird 和 Gu 等^[47]首次将单模光纤耦合器与 2PEF 结合起来, 证明了单模光纤耦合器能传输近红外波段的超短脉冲激发光并收集荧光. 但单模光纤在使用上存在缺点. 一是单

模光纤具有自相位调制效应, 光纤色散系数也比较高, 飞秒脉冲经过单模光纤传输后会出现严重畸变, 脉冲会变宽, 使得在焦点处的荧光激发效率变低. 二是单模光纤的纤芯较小, 数值孔径小, 荧光的收集效率比较低. 为了突破单模光纤带来的局限, 人们开始采用 PCF 来进行脉冲光的传输^[48]. 相较于单模光纤, PCF 的光引导方式比较独特, 比如现阶段使用较多的双包层光子晶体光纤 (double-clad photonic crystal fiber, DC-PCF), 具有较大的模场半径, 脉冲光的传输效率和荧光的采集效率都很高, 包层光纤还可并入管状压电致动器中, 实现双光子光纤内窥系统的微型化. 此外, 光纤耦合器也是双光子光纤内窥成像系统中的重要器件, 光纤耦合器可以实现光束在两根甚至多根光纤之间的耦合传输, 将激发光和收集光进行分束, 使系统在结构上更加灵活简便^[49]. 图 8 为双光子光纤内窥成像系统示意图.

随着 PCF 和微电机系统 (micro-electro-mechanical system, MEMS) 扫描器等技术的不断发展, 双光子光纤内窥成像技术在成像速度、分辨率及系统体积等方面都取得了长足的进步. Tang 等^[50]设计了使用双轴 MEMS 镜和 DC-PCF 的多光子内窥镜系统, 其中 MEMS 扫描仪反射镜尺寸仅为 2 mm, 扫描角度达到 20°, 在 x 和 y 轴上的最大可分辨焦点数目为 720 × 720, 采集得到了牛膝关节软骨的多光子显微图像. Piyawattanametha 等^[51]开发了一种基于 MEMS 二维微型扫描仪的双光子光纤微型内窥镜, 重量仅为 2.9 g, 可用于对活体小鼠大脑的微脉管系统的体内成像. 该团队通过将光纤附着在活体小鼠的颅骨上来收集体内新皮层微血管的双光子荧光图像, 此外还可用于追踪流过观察血管的红细胞. Wu 等^[52]开发了一种紧凑的全光纤扫描内窥镜系统, 用于生物样品的双光子荧光和二次谐波 (second harmonic generation, SHG) 成像. 通过对上皮组织和口腔组织的深度分辨双光子荧光成像, 证明了该紧凑的全光纤非线性光学内窥镜系统具有出色的成像能力, 有望用于实时评估腔内器官的上皮和基质结构. Lee 等^[53]开发了一种更为紧凑的双光子光纤内窥系统, 所有光学组件的尺寸均为 1 mm, 成像头重量仅为 0.6 g, 并成功地将该系统应用到小鼠脑中树突细胞的功能性钙成像, 证实了该系统可用于清醒自由行为的动物的神经网络动力学的光学记录上.

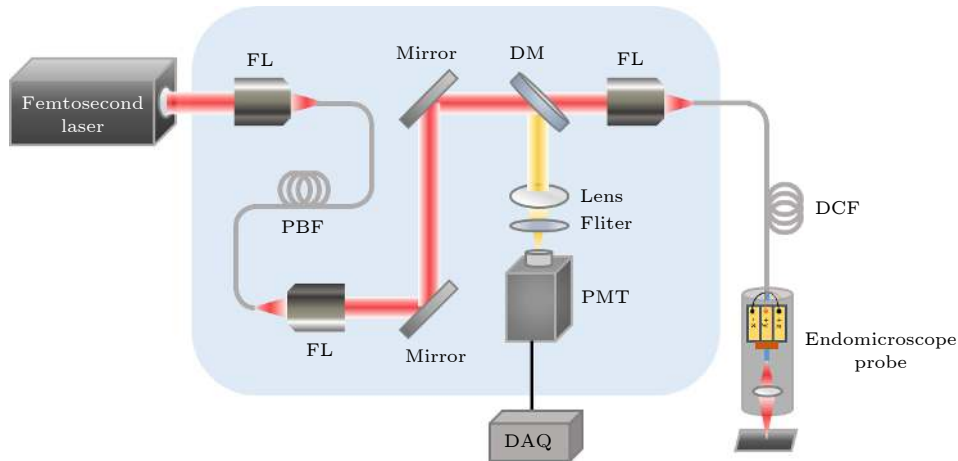


图 8 双光子光纤内窥系统示意图. 图中各部分为: Femtosecond Laser, 飞秒激光器; FL (fiber launcher), 光纤耦合器; PBF (photonic band-gap fiber), 光子带隙光纤; Mirror, 反射镜; DM (dichroic mirror), 二向色镜; Lens, 透镜; Filter, 滤光片; PMT (Photomultiplier tube), 光电倍增管探测器; DAQ (data acquisition), 数据采集; DCF (double-clad fiber), 双包层光纤; Endomicroscope Probe, 内窥镜探头

Fig. 8. Schematic diagram of a two-photon fiber endoscopic system. The abbreviations in the figure are as follows: FL, fiber launcher; PBF, photonic band gap light; DM, dichroic mirror; PMT, Photomultiplier tube; DAQ, data acquisition; DCF, double-clad fiber.

双光子光纤内窥技术在临床诊断与治疗中也发挥着重要的作用. 2012年 Louradour 团队^[54]提出了激发波长可调的非线性光纤光谱仪, 波长调节范围为 700—900 nm, 脉冲宽度为 70 fs, 可以通过弹性蛋白的双光子信号和胶原蛋白的 SHG 信号对离体人肺组织进行非线性光谱分析. 在 2015 年, 该团队又基于 DC-PCF 设计了尺寸仅为 2.2 mm 的双光子光纤内窥镜, 可以 8 帧/s 的速度同时进行双光子和 SHG 信号的探测, 横向和轴向分辨率分别为 0.8 μm 和 12 μm , 最大成像视场为 450 μm \times 450 μm , 成像穿透深度可以达到器官表面以下 300 μm , 是临床上实时病理状态评估的一种有力工具^[55]. 双光子光纤内窥技术在使用时会面临两个挑战, 一是大多数生物内源性荧光团的双光子吸收位于 700—900 nm 的光学窗口, 而光纤在该窗口具有较大色散; 二是非线性自相位调制效应 (self-phase modulation, SPM) 会使得激励信号的频谱变宽, 导致信号失真. 该团队通过引入一根标准保偏单模光纤 (polarization maintaining single-mode fiber, PM-SMF) 补偿频谱压缩的非线性效应, 以及使用补偿二阶和三阶色散的脉冲扩展器, 能保证系统在 5 m 长的光纤输出端传递 40 fs 以下的红外激发脉冲. 此外通过设计定制纯二氧化硅内核的 DC-PCF 既能确保高空间分辨率, 还能保证飞秒脉冲在光纤传输中的性能不会因弯曲而产生偏振模色散. DC-PCF 设计示意图如图 9(a)—(c)

所示. 在内窥镜输出端, 该团队用共振光纤扫描仪和微光学 (micro-optics, MO) 搭建了小型成像探头, 将外径控制在 2.2 mm. 当给样品施加 5 mW 功率时, 该系统能以 8 帧/s 的高灵敏度对样品进行成像, 图 9(d)—(k) 展示了该系统在离体小鼠切片样品及人体肺部切片样品的成像效果. 通过调整输入端半波片可选择不同的正交线性极化, 当激发极化平行于胶原蛋白时, 可以获取到更强的 SHG 信号.

对于内窥成像, 研究者们不仅想观测生物体内的荧光强度信息, 同时也希望能够获取样品的生化信息, 由此在 2018 年, 该团队又将双光子内窥成像与 FLIM 技术结合^[56], 利用 DC-PCF 搭建了双光子 FLIM 内窥成像系统, 并首次实现了内窥镜的 NADH 寿命成像. Sibai 等^[57]将双光子内窥成像技术与 FLIM 技术结合, 通过内窥镜监测内源荧光团的强度、光谱和寿命特性等来研究大脑组织, 其结果表明在恒定的平均激光功率条件下, 短至 40 fs 的激发脉冲即使长时间照射组织也不会对组织的生化/生物物理特性产生不良影响.

在生物体器官内脏的研究诊断和治疗中, 使用光学内窥镜精确控制和操纵微米和纳米颗粒也具有重要意义. Gu 等^[58]首次展示了用于直接控制和操纵纳米珠及金纳米棒的光学非线性内窥镜镊子 (optical nonlinear endoscopic tweezers, ONETs). 与相同尺寸的介电纳米珠相比, 双光子吸收可以将

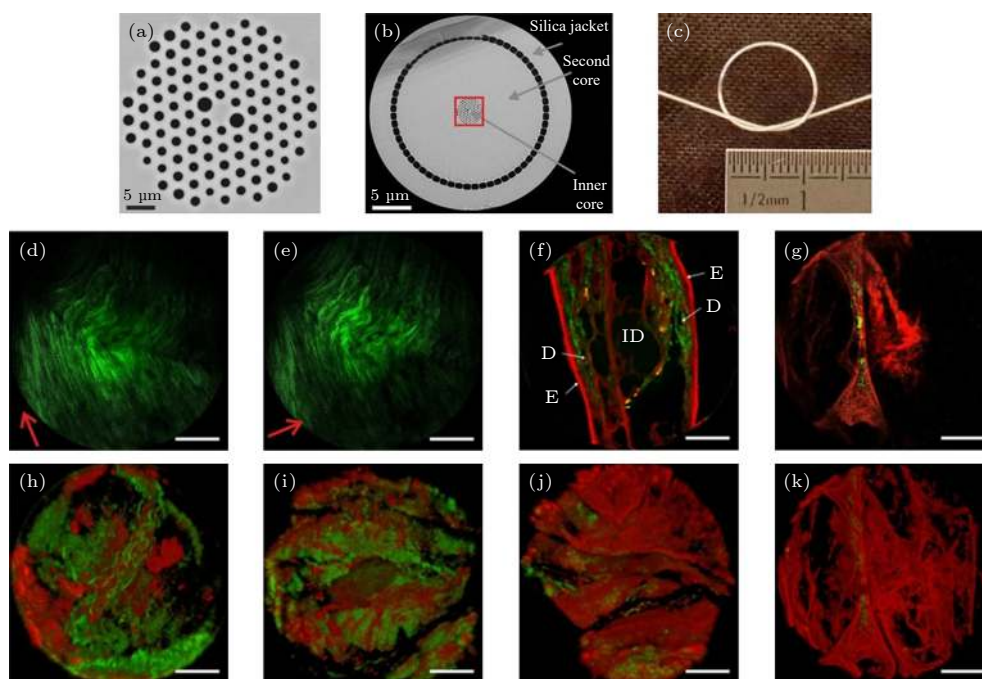


图9 用于双光子内窥镜的空气-二氧化硅 DC-PCF 设计及系统成像图^[55] (a) 光纤纤芯示意图, 二氧化硅部分为灰色, 空气部分为黑色; (b) 双包层光纤纤芯截面示意图; (c) DC-PCF 具有灵活性; (d)–(k) 组织样本的无标记双光子光纤内窥成像, 红色为 TPEF 信号, 绿色为 SHG 信号. (d), (e) 大鼠尾肌腱; (f) 鼠耳. D: 真皮; E: 表皮; IC: 内部软骨; (g) 健康人类肺部样品 (肺泡区域); (h) 小鼠动脉; (i)–(k) 健康人类肺部样品里 3 个位置的细胞外基质. 比例尺: 50 μm

Fig. 9. Design and system imaging diagram of an Air-silica DC-PCF for a two-photon endoscope^[55]: (a) Schematic diagram of the optical fiber core, the silica part is gray, and the air part is black; (b) the cross-sectional schematic view of the double-clad fiber core; (c) DC-PCF is flexible; (d)–(k) Unlabeled two-photon fiber endoscopy imaging of tissue samples, red is TPEF signal, green is SHG signal; (d), (e) rat tail tendon; (f) mouse ear. D: dermis; E: epidermis; IC: internal cartilage; (g) healthy human lung samples (alveolar regions); (h) mouse arteries; (i)–(k) extracellular matrix at 3 locations in healthy human lung samples. Scale bar: 50 μm .

荧光纳米珠的捕获力提高多达 4 个数量级. 此外, 双光子激发会在纳米棒上产生等离激元介导的光热引力, 使纳米棒快速上载到目标细胞, 在 1 min 内进行热处理. 该工具在精确指定药物颗粒的位置和剂量并将金属纳米颗粒快速上载至单个癌细胞进行治疗方面具有较好的应用前景.

双光子光纤内窥成像在体内组织器官定性与定量检查时具有侵入性低、光损伤小、操作便捷等优势, 是生物医学领域中活体成像研究不可或缺的重要工具. 但目前双光子光纤内窥成像仍面临着如成像分辨率不高、系统尺寸较大、荧光收集效率低等许多技术挑战, 随着 PCF 与 MEMS 等技术的发展, 双光子光纤内窥成像技术的性能将得到进一步提升, 从而在生物医学领域中发挥更大的作用.

5 三光子显微成像

目前, 多光子显微成像技术已成为脑科学研究的重要工具之一, 为了探索大脑的奥秘, 研究者们

在不断寻求研究生物体脑内更深层信息. 在用 2PEF 技术进行脑神经科学研究时, 由于脑内深层组织中散射现象严重, 成像深度受到限制. 尽管采用更长波长的光激发能进一步提高成像深度, 但当焦点处信号荧光强度与背景荧光强度一致时, 成像深度便达到极限. 在小鼠脑中成像深度大约止步于白质层, 很难再往下突破. 一些解决方法, 如插入光学探针, 则会对生物体大脑产生不可逆的伤害. 为了能无损地对脑深层信息进行采集, 人们开始将目光转移到三光子显微成像技术上.

相较于 2PEF, 三光子显微成像具有以下优势: 1) 常用的荧光蛋白的三光子激发波长更长, 通常为 1600—1800 nm, 处于生物组织的最佳红外通光窗口, 在生物组织的穿透效果更好; 2) 三光子显微成像作为更高阶的非线性成像方法, 不仅具备双光子显微成像的光学切片能力, 同时抑制背景信号能力比双光子显微成像也有所提高. 图 10 为激光扫描三光子显微镜示意图.

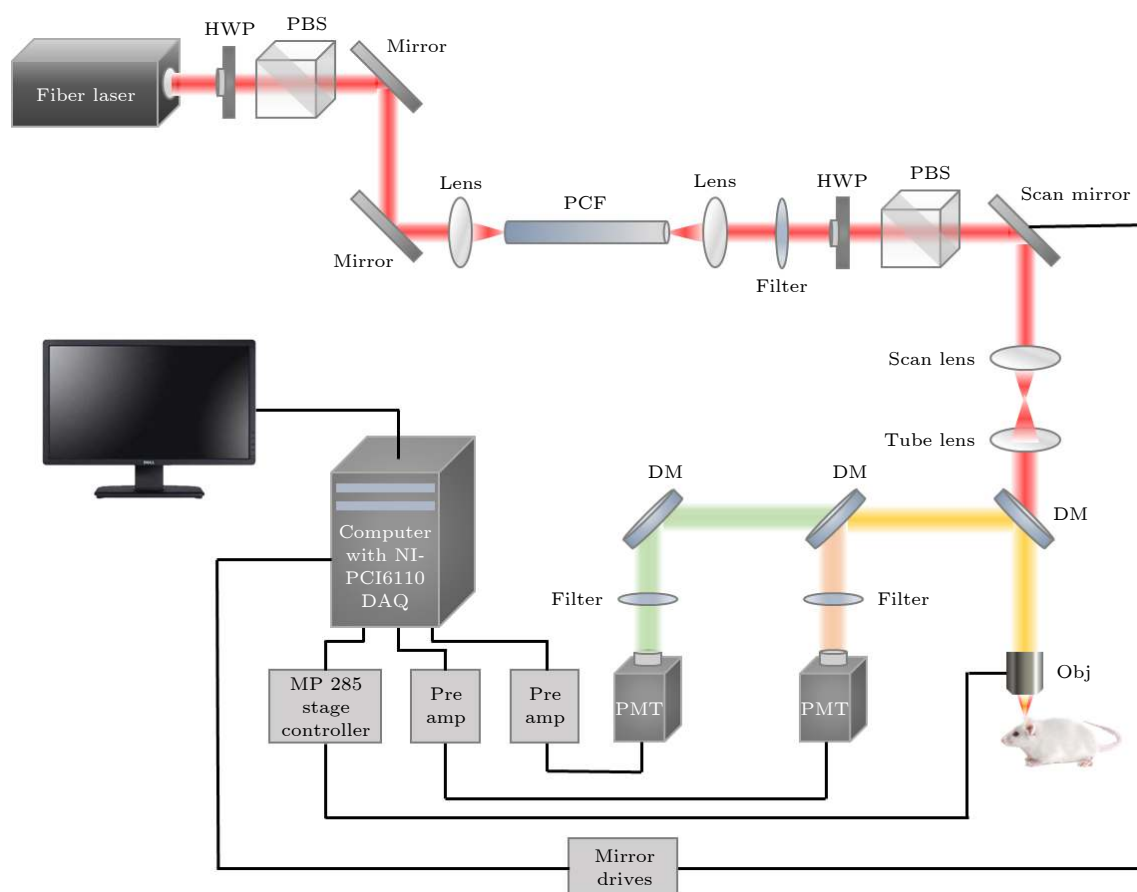


图 10 激光扫描三光子显微镜示意图. 图中各部分为: Fiber Laser, 光纤激光器; HWP (half-wave plate), 半波片; PBS (polarization beam splitter), 偏振分束器; Mirror, 反射镜; Lens, 透镜; PCF (photonic crystal fiber), 光子晶体光纤; Scan Mirror, 扫描镜; Scan Lens, 扫描透镜; Tube Lens, 镜筒透镜; DM (dichroic mirror), 二向色镜; Filter, 滤光片; Obj (objective), 物镜; PMT (photomultiplier tube), 光电倍增管探测器

Fig. 10. Schematic diagram of a laser scanning three-photon microscope. The abbreviations in the figure are as follows: HWP, half-wave plate; PBS, polarization beam splitter; PCF, photonic crystal fiber; DM, dichroic mirror; Obj, objective; PMT, photomultiplier tube.

早在 1996 年, 美国 Cornell 大学 Xu 等^[59] 便利用钛宝石锁模飞秒激光器实现了 1700 nm 波段的三光子成像. 之后该课题组一直从事三光子成像的研究. 2013 年, 为了研究小鼠脑内深层结构成像, 该团队利用孤子自频移 (soliton self-frequency shift, SSFS) 方法在光子晶体棒中开发了一种新的高脉冲能量源^[60], 输出孤子能量为 67 nJ. SSFS 效应是指在光纤中一个孤子通过脉冲内受激拉曼散射连续地将能量从高频转移到低频. 提高光纤激光器的激光功率可以使波长往长波方向调谐. 当入射光脉宽越小时其孤子自频移效应越强. 此外, 考虑活体小鼠脑内组织散射及吸收, 1700 nm 波段是最佳波长窗口, 图 11(a) 展示了基于米氏散射和吸收率的组织模型衰减谱. 基于此, 该团队将高能光纤激光器的 1550 nm 波长移到所需的 1700 nm 窗口, 搭建了一台三光子荧光显微成像系统, 测得孤

子脉冲宽度为 65 fs, 脉冲宽度压缩了 6 倍, 获得的 67 nJ 孤子能量也是当时最高. 在 1700 nm 波段实现了对完整小鼠脑内皮质下结构的非侵入性、高分辨率的活体成像, 同时对小鼠海马体内的血管结构及红色荧光蛋白标记的神经元进行解析, 成像深度分别能达到 1400 μm 和 1200 μm , 成像效果如图 11(b) 和图 11(c) 所示.

2015 年, 该团队提出了一种紧凑且便携的三光子梯度折射率内窥镜, 对没有染色的小鼠肺进行了离体成像, 证实该系统可实现光学活检的可行性^[61]. 2014 年, 该团队使用基因编码的钙指示剂, 用三光子显微镜在 1300 nm 波长激发下对成年小鼠皮质的 GFP 标记的神经元进行体内成像, 展示了皮质第 6 层 (L6) 深度的神经元活动^[62]. 2015 年, 该团队利用硅晶片对 1700 nm 激发的三光子显微镜的色散进行补偿, 使得脉冲宽度减小了 1/2 以

上,极大地提高了荧光激发效率,从而实现三光子信号的4倍增强效果,并且展示了在小鼠脑表面以下900 μm 处该信号增加的现象^[63].2017年,利用功能性成像的GCaMP6s标记的神经元,该团队使用三光子显微成像技术在1300 nm波段实现了在完整小鼠大脑中1 mm深度的海马锥体层中记录多达150个神经元的自发活动,该方法在无损伤

录脑组织深处的高时空分辨率的神经元活动方面具有非常大的潜力^[64].2018年,该团队开发了一种自适应飞秒激光源,能够把小鼠大脑中多光子成像速度提高10倍以上,在700 μm 深度下成像时可达30帧/s^[65].同年该团队又实现了透过小鼠颅骨下500 μm 深度处的脉管系统的三光子成像,以及活体小鼠的皮质层中GCaMP6s的钙成像^[66].2019年,该团队又对自适应飞秒激光源进行了改进,可以仅激发感兴趣的区域,使得对活体小鼠脑成像的多光子成像功率要求降低30倍,使得高速纵向神经成像成为了可能^[67].2020年,该团队对小鼠脑中1300 μm 处的深层组织进行三光子钙成像,并实现了定量分析.此外还用三光子显微成像以细胞分辨率对成年斑马鱼头部深至小脑和视神经的部位进行结构和功能成像^[68].

浙江大学钱骏教授课题组一直致力于三光子脑成像荧光探针的开发.2015年,该团队将金纳米棒作为造影剂,在1000 nm波长激发下,实现了小鼠脑内760 μm 的成像深度^[69].为了减轻长期光照导致的荧光探针的光漂白,该团队还合成了一种具有聚集诱导发射(aggregation-induced emission, AIE)特性的光稳定型发光剂TPE-TPP,在1020 nm波长激发下的三光子成像中表现出较小的光损伤^[70].2016年,该组开发的AIE荧光探针TTF在很宽的pH值范围内化学性质都比较稳定,结合该探针该团队用三光子荧光显微镜监测了斑马鱼标记胚胎的不同生长阶段,追踪时间可长达120 h^[71].2017年,该团队开发的1550 nm波长激发的具有较大三光子吸收截面的AIE探针可实现穿透颅骨的三光子荧光成像,成像深度可达颅骨下方300 μm ,在该深度还可以识别出2.4 μm 的小血管^[72].同年,该团队用AIE荧光探针实现了875 μm 深的小鼠大脑血管成像,是当时基于AIE荧光探针的三光子成像的最大深度^[73].2018年,该团队设计了基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的纳米粒子,由AIE染料和NIR染料组成,该粒子具有增强的三光子近红外吸收能力^[74].尽管三光子显微成像技术能获得深层组织中的荧光信息,但在深层组织成像时,三光子荧光信号仍然较弱,难以探测,而FLIM技术探测的寿命信息却几乎不受光强影响.于是,该团队于2019年尝试将三光子显微成像技术与FLIM技术结合,以实现小鼠脑部的三光子FLIM成像,成像深度达

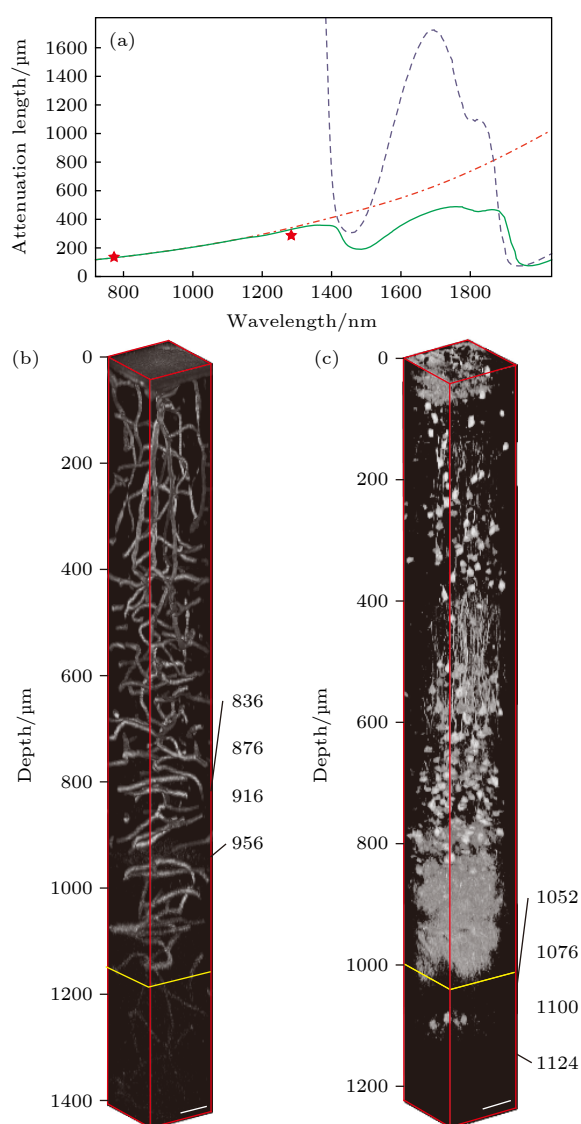


图 11 小鼠组织模型衰减谱及活体成像^[60] (a) 基于米氏散射和吸水率的组织模型的衰减谱; (b) FVB/N 小鼠脑血管三光子图像的三维重构; (c) B6.Cg-Tg(Thy1-Brainbow1.0) HLich/J 小鼠脑内神经元三光子图像的三维重构

Fig. 11. Attenuation spectrum and in vivo imaging of mouse tissue model^[60]: (a) Attenuation spectrum of tissue model based on Mie scattering and water absorption; (b) three-dimensional reconstruction of three-photon image of FVB/N mouse cerebrovascular; (c) B6.Cg-Tg (Thy1-Brainbow1.0) three-dimensional reconstruction of three-photon images of neurons in the brain of HLich/J mice.

到 600 μm , 并且可分辨出 1.9 μm 的毛细血管^[75], 成像效果如图 12 所示. 2020 年, 该团队又合成了量子产率高达 42.6 % 的 AIE 荧光探针, 且第一次用三光子成像技术实现了对完整头骨鼠脑中风过程高穿透深度和高对比度的成像结果, 该研究极大地推动了活体大脑的非侵入性荧光成像的发展^[76].

深圳大学王科教授课题组致力于提高三光子荧光成像的穿透深度. 2017 年, 该团队尝试用重水 (D_2O) 代替水作为浸入介质, 以提高 1700 nm 窗口处的透射率^[77]. 之后又将硅油作为 D_2O 的替代物, 比 D_2O 在小鼠白质层的三光子信号提高了 17%^[78]. 2019 年, 该团队利用量子点 Qtracker655 在活体小鼠脑部进行成像, 成像深度达到脑表面以下 2100 μm , 且成像速度比之前提升了 10 倍, 还可以对脑表面下 1600 μm 处血管的血流速度进行测量, 这是目前世界上最深的活体小鼠多光子脑成像深度, 以及采用多光子成像技术进行血流速度测量的最大深度^[79], 成像结果如图 13 所示. 2020 年, 该团队又提出可以通过光子晶体中的 SSFS 效应

产生更多的高能孤子, 在小鼠皮质层中发现圆极化孤子激发的三光子荧光信号比线极化高出 3.7 倍^[80].

与 2PEF 类似, 三光子显微成像在功能成像方面也面临着诸多挑战. 科研人员也开始尝试将三光子显微成像与其他技术结合, 拓展三光子显微成像的应用. Weisenburger 等^[81] 将三光子显微成像与体成像技术结合, 开发了 HyMS (hybrid multiplexed sculpted light microscopy) 技术, 可以在 17 Hz 频率下对 12000 个神经元钙信号进行单细胞分辨成像, 成像体积可达到 1 mm \times 1 mm \times 1.22 mm, 并成功地将该系统应用到小鼠听觉皮层、后顶叶平层和海马成像中. Klioutchnikov 等^[82] 设计了一种头戴式三光子显微镜, 可以对运动大鼠 1320 μm 深的皮质神经元活动进行成像, 稳定成像时间超过 1 h. 该团队设计的空心光子带隙晶体光纤 (hollow-core photonic bandgap crystal fiber, HC-PBGF) 可以避免光纤弯曲引起的脉冲变化对分析神经元活动的影响, 采用的双通道双棱镜序列和可变厚度的体硅结合还能减少群速度畸变和三阶色散.

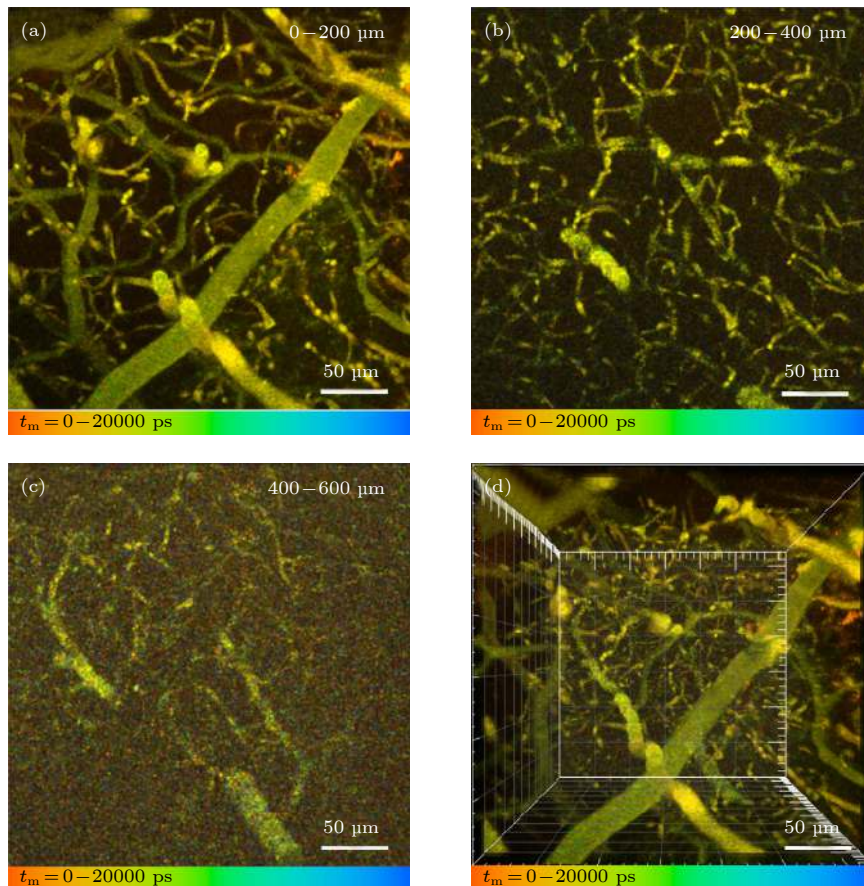


图 12 活体小鼠脑血管的三光子 FLIM 成像^[75]

Fig. 12. Three-photon FLIM imaging of cerebral blood vessels in living mice^[75].

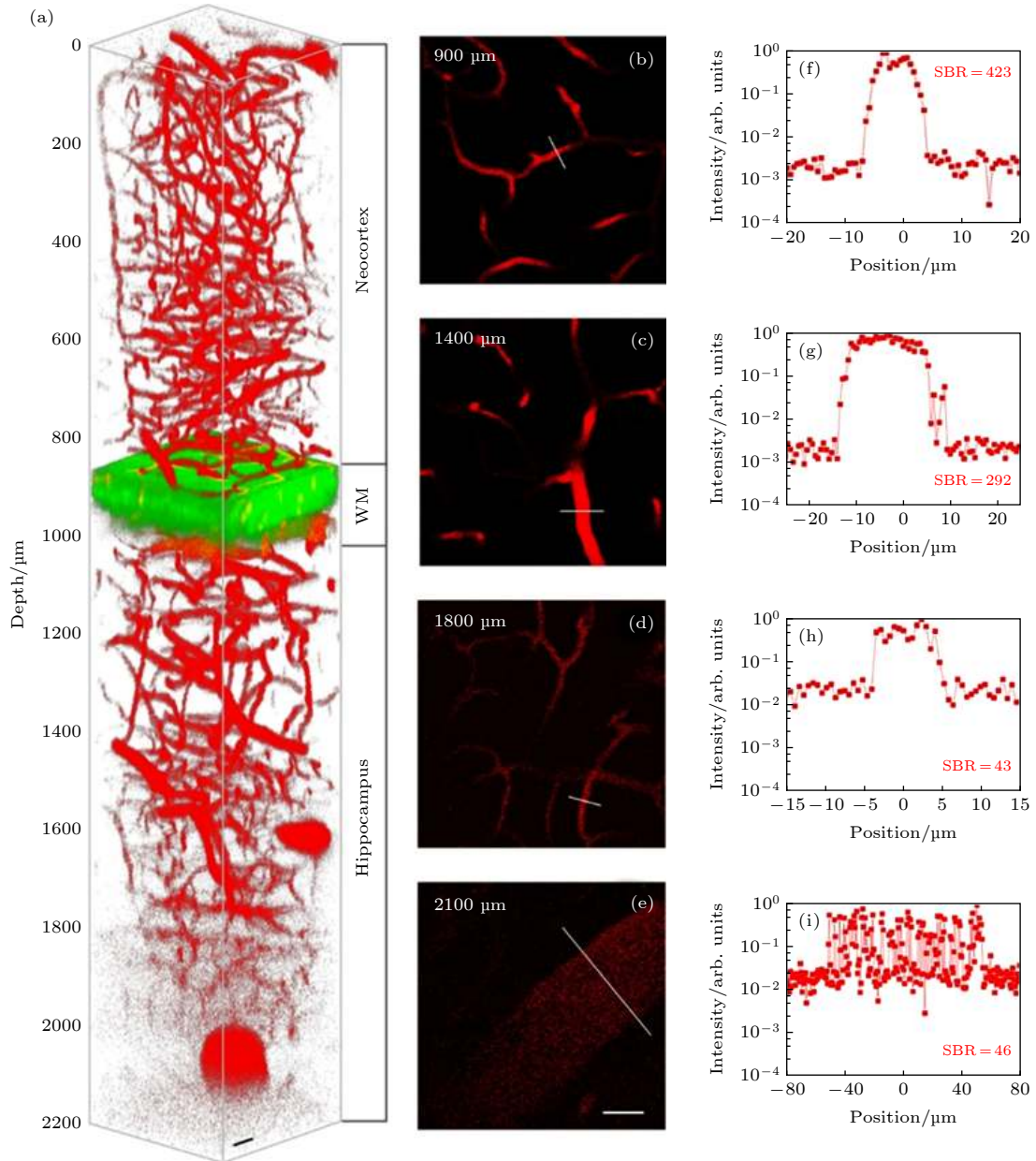


图 13 活体小鼠三光子脑血管成像图, 2100 μm 的成像深度为目前最深^[79]

Fig. 13. Three-photon cerebrovascular imaging of living mice. The imaging depth of 2100 μm is currently the deepest^[79].

由于信号背景比的限制, 2PEF 技术在脑科学研究中能达到的成像深度具有一定局限性, 高阶的三光子显微成像技术由于可实现更高的成像深度, 因而在研究生物脑内深层组织的构造及生理功能方面发挥着巨大的作用. 目前三光子显微成像技术的应用主要受限于光源能量及荧光探针的三光子吸收截面等因素. 未来随着光纤技术的发展, 光源技术的突破, 荧光探针技术的进步及弱光信号探测技术的改进, 三光子显微成像技术将在脑科学研究中发挥更大的潜力.

6 总结与展望

近年来, 多光子成像技术以其高空间分辨率、高穿透深度、低侵入性, 以及固有的光学层析能力等优点, 在生物医学领域已经取得了令人瞩目的成果. 传统的 2PEF 发展已较为成熟, 为了取得进一步突破, 多光子成像技术从实际的生物医学应用出发, 对传统 2PEF 在多色成像、功能成像、活体成像、成像深度等方面的不足进行了较大改进, 例如多色双光子激发荧光显微成像能在亚细胞水平实

现多种标记荧光团的实时动态监测; 双光子 FLIM 技术可以在进行高分辨三维成像的同时获取生物组织的生化特性信息, 对生物组织功能和结构进行无标记精确定量表征; 双光子光纤内窥成像能深入体内进行深层组织器官成像, 且相较于普通内窥镜有着较高的分辨率, 能观察到生物组织内亚细胞结构; 三光子荧光显微成像相较 2PEF 穿透深度更深, 分辨率及信噪比也大大提高. 总之, 相比于传统 2PEF, 这几种多光子成像技术在成像性能方面得到极大提升, 显著地拓宽了其在生物医学领域的应用范围. 然而, 受限于激光器、光纤、探测器等技术的发展, 多光子成像技术在生物医学领域的应用仍面临着巨大挑战. 例如, 多色双光子激发荧光显微成像技术存在系统复杂, 多种荧光团无法同时最优激发、双光子激发效率不高及光谱串扰等问题; 双光子 FLIM 技术则与 2PEF 技术相同, 也面临着穿透深度依旧受限的问题, 而且双光子 FLIM 系统较为复杂, 对光源和探测器等有严格要求, 成本昂贵. 再者, 受组织自身荧光信号强度和系统探测效率的限制, 双光子 FLIM 技术在数据的采集及处理上也十分繁琐耗时; 双光子光纤内窥成像虽然在向更小型化发展, 但对于活体内部组织器官实时成像而言系统尺寸仍不够小, 而且在探测上对样品发射的荧光的收集效率并不高; 三光子显微成像技术成像深度则是受限于光源能量不高, 而且目前用于三光子荧光显微成像的荧光探针数量较少, 且亮度有限. 未来随着激光技术的发展和光源能量利用的进一步提升, 多色双光子激发荧光显微成像、双光子 FLIM 和三光子荧光显微成像的激发效率与成像深度也会得到进一步提高; 而光纤技术在信号传输、小型化方面的进一步发展则能使多色双光子激发荧光显微成像、双光子光纤内窥成像、三光子成像的系统结构更加紧凑合理; MEMS 技术的发展能使双光子光纤内窥成像系统尺寸更加紧凑; 更高信号探测效率的探测器的发展能提高双光子 FLIM 对样品的荧光采集效率, 数据采集处理技术的进步则能大大减少双光子 FLIM 的图像处理时间; 荧光探针技术的发展可以为多色双光子激发荧光显微成像及三光子荧光显微成像技术提供更多的标记选择, 开发量子效率更高的荧光探针也有助于提高多光子成像的深度. 此外, 不同种类的多光子成像技术的结合也能相互促进, 从而大大拓宽其应用范围, 可以预见, 随着科研人员的不懈努力, 未来激光、光纤、探测器、荧光探针等技术必将取

得长足的发展, 由此促进多光子成像技术在生物医学应用上取得更多新进展.

参考文献

- [1] Goppert M M 1931 *Ann. Phys-Berlin.* **9** 273
- [2] Denk W, Strickler J H, Webb W W 1990 *Science* **248** 73
- [3] Wang K, Horton N G, Charan K, Xu C 2014 *Ieee J. Sel. Top. in Quant.* **20** 6800311
- [4] Cui Q, Chen Z Y, Zhang Z H, Luo Q M, Fu L 2017 *Las. Opto-elect. Prog.* **06** 16 (in Chinese) [崔权, 陈忠云, 张智红, 骆清铭, 付玲 2017 激光与光电子学进展 **06** 16]
- [5] Yang H Q 2011 *M. S. Thesis* (Fujian: Fujian Normal University) (in Chinese) [杨洪权 2011 硕士学位论文 (福建: 福建师范大学)]
- [6] Drobizhev M, Makarov N S, Tillo S E, Hughes T E, Rebane A 2011 *Nat. Methods* **8** 393
- [7] Tragardh J, Murtagh M, Robb G, Parsons M, Lin J P, Spence D J, McConnell G 2016 *Microsc. and Microanal.* **22** 803
- [8] Herz J, Siffrin V, Hauser A E, Brandt A U, Leuenberger T, Radbruch H, Zipp F, Niesner R A 2010 *Biophys. J.* **98** 715
- [9] Xi P, Andegeko Y, Weisel L R, Lozovoy V, Dantus M 2008 *Opt. Commun.* **281** 1841
- [10] Liang X B, Hu W Y, Fu L 2010 *Opt. Express* **18** 14893
- [11] Zhao Z, Wu B, Wang X, Pan Z, Liu Z, Zhang P, Shen X, Nie Q, Dai S, Wang R 2017 *Laser Photonics Rev.* **11** 1700005
- [12] Li D, Zheng W, Qu J A Y 2009 *Opt. Lett.* **34** 202
- [13] Li C, Pastila R K, Lin C P 2016 *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **9** 1640003
- [14] Le Dévédec S E, Lalai R, Pont C, de Bont H, van de Water B 2011 *Mol. Imaging Biol.* **13** 67
- [15] Entenber D, Wyckoff J, Gligorijevic B, Roussos E T, Verkhusha V, Pollard J W, Condeelis J 2011 *Nat. Protoc.* **6** 1500
- [16] Piatkevich K D, Hulit J, Subach O M, Wu B, Abdulla A, Segall J E, Verkhusha V 2010 *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** 5369
- [17] Collot M, Fam T K, Ashokkumar P, Faklaris O, Galli T, Danglot L, Klymchenko A S 2018 *J. Am. Chem. Soc.* **140** 5401
- [18] Garaschuk O, Milos R-I, Konnerth A 2006 *Nat. Protoc.* **1** 380
- [19] Hayakawa Y, Nemoto T, Iino M, Kasai H 2005 *Cell Calcium.* **37** 359
- [20] Mahou P, Zimmerley M, Loulier K, Matho K S, Labroille G, Morin X, Supatto W, Livet J, Debarre D, Beaurepaire E 2012 *Nat. Methods* **9** 815
- [21] Mahou P, Vermot J, Beaurepaire E, Supatto W 2014 *Nat. Methods* **11** 600
- [22] Stringari C, Abdeladim L, Malkinson G, Mahou P, Solinas X, Lamarre I, Brizion S, Galey J B, Supatto W, Legouis R, Pena A M, Beaurepaire E 2017 *Sci. Rep-UK.* **7** 3792
- [23] Abdeladim L, Matho K S, Clavreul S, et al. 2019 *Nat. Commun.* **10** 1662
- [24] Lin D Y, Luo T, Liu L W, Lu Y, Liu S X, Yuan Z, Qu J L 2017 *Chin. Opt. Lett.* **15** 090006
- [25] Liu X B, Lin D Y, Wu Q Q, Wei Y, Luo T, Yang Z G, Qu J L 2017 *Acta Phys. Sin.* **67** 178701 (in Chinese) [刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 严伟, 罗腾, 杨志刚, 屈军乐 2017 物理学报 **67** 178701]
- [26] Liu X B, Lin D Y, Becker W, Niu J, Yu B, Liu L W, Qu J L

- 2019 *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **12** 1930003
- [27] Li H, Xia X Y, Chen T A, Yu J, Li X, Zheng W 2018 *Chin. J. Lasers* **45** 0207010 (in Chinese) [李慧, 夏先园, 陈廷爱, 余佳, 李曦, 郑炜 2018 *中国激光* **45** 0207010]
- [28] Ranawat H, Pal S, Mazumder N 2019 *Biomed. Eng. Lett.* **9** 293
- [29] Li H, Yu J, Zhang R, Li X, Zheng W 2019 *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **12** 1930009
- [30] Anh C, Pimenta R M L, Lee H B, Mereddy V, Holy J, Heikal A 2019 *Cytom. Part A* **95A** 80
- [31] Luo T, Lu Y, Liu S X, Lin D Y, Qu J L 2017 *Anal. Chem.* **89** 8104
- [32] Chen B L, Lu Y, Pan W H, Xiong J, Yang Z G, Yan W, Liu L W, Qu J L 2019 *Anal. Chem.* **91** 10640
- [33] Shen B L, Yan J S, Wang S Q, Zhou F, Zhao Y H, Hu R, Qu J L, Liu L W 2020 *Theranostics* **10** 1849
- [34] Alam S R, Wallrabe H, Svindrych Z, et al. 2017 *Sci. Rep-UK.* **7** 10451
- [35] Poulon F, Pallud J, Varlet P, et al. 2018 *Sci. Rep-UK.* **8** 14888
- [36] Kantelhardt S R, Kalasauskas D, Konig K, Kim E, Weinigel M, Uchugonova A, Giese A 2016 *J. Neuro-Oncol.* **127** 473
- [37] Teh S K, Zheng W, Li S X, Li D, Zeng Y, Yang Y Q, Qu J A Y 2013 *J. Biomed. Opt.* **18** 036001
- [38] Rtick A, Hauser C, Mosch S, Kalinina S 2014 *J. Biomed. Opt.* **19** 096005
- [39] Shen Y F, Tsai M R, Chen S C, et al. 2015 *Anal. Chem.* **87** 7575
- [40] Li X, Li H, He X Z, Chen T G, Xia X Y, Yang C X, Zheng W 2018 *Biomed. Opt. Express* **9** 453
- [41] Tyurikova O, Zheng K Y, Rings A, Drews A, Klenerman D, Rusakov D A 2018 *Brain Res. Bull.* **136** 85
- [42] Zheng K Y, Jensen T P, Rusakov D A 2018 *Nat. Protoc.* **13** 581
- [43] Feeks J A, Hunter J 2017 *Biomed. Opt. Express* **8** 2483
- [44] Chakraborty S, Nian F S, Tsai J W, Karmenyan A, Chiou A 2016 *Sci. Rep-UK.* **6** 19145
- [45] Looney M R, Thornton E, Sen D, Lamm W J, Glennly R W, Krummel M F 2011 *Nat. Methods* **8** 91
- [46] Shi Y J, Zhang G J, Lu Z Y, Ying Y C, Jia H L, Xi P 2018 *Chin. Opt.* **11** 296 (in Chinese) [石玉洁, 张广杰, 陆政元, 应亚宸, 贾荟琳, 席鹏 2018 *中国光学* **11** 296]
- [47] Bird D, Gu M 2002 *Opt. Lett.* **27** 1031
- [48] Bao H, Allen J, Pattie R, Vance R, Gu M 2008 *Opt. Lett.* **33** 1333
- [49] Bao H, Ryu S Y, Lee B H, Tao W, Gu M 2010 *Opt. Lett.* **35** 995
- [50] Tang S, Jung W, McCormick D, Xie T, Su J, Ahn Y C, Tromberg B J, Chen Z 2009 *J. Biomed. Opt.* **14** 034005
- [51] Piyawattanametha W, Cocker E D, Burns L D, Barretto R P J, Jung J C, Ra H, Solgaard O, Schnitzer M J 2009 *Opt. Lett.* **34** 2309
- [52] Wu Y C, Leng Y X, Xi J F, Li X D 2009 *Opt. Express* **17** 7907
- [53] Lee C M, Engelbrecht C J, Soper T D, Helmchen F, Seibel E J 2010 *J. Biophotonics* **3** 385
- [54] Peyrot D A, Lefort C, Steffenhagen M, Mansuryan T, Ducourthial G, Abi-Haidar D, Sandeau N, Vever-Bizet C, Kruglik S G, Thiberville L, Louradour F, Bourg-Heckly G 2012 *Biomed. Opt. Express* **3** 840
- [55] Ducourthial G, Leclerc P, Mansuryan T, Fabert M, Brevier J, Habert R, Braud F, Batrim R, Vever-Bizet C, Bourg-Heckly G, Thiberville L, Druilhe A, Kudlinski A, Louradour F 2015 *Sci. Rep-UK.* **5** 18303
- [56] Hage C H, Leclerc P, Brevier J, Fabert M, Le Nezet C, Kudlinski A, Heliot L, Louradour F 2018 *Biomed. Opt. Express* **9** 142
- [57] Sibai M, Mehidine H, Poulon F, Ibrahim A, Varlet P, Juchaux M, Pallud J, Devaux B, Kudlinski A, Abi Haidar D 2018 *Sci. Rep-UK.* **8** 11124
- [58] Gu M, Bao H, Gan X, Stokes N, Wu J 2014 *Light-Sci. Appl.* **3** e126
- [59] Xu C, Zipfel W, Shear J B, Williams R M, Webb W 1996 *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** 10763
- [60] Horton N G, Wang K, Kobat D, Clark C G, Wise F W, Schaffer C B, Xu C 2013 *Nat. Photonics* **7** 205
- [61] Huland D M, Charan K, Ouzounov D G, Jones J S, Nishimura N, Xu C 2013 *Biomed. Opt. Express* **4** 652
- [62] Ouzounov D G, Horton N, Wang T Y, Feng D, Nishimura N, Xu C 2014 *Conference on Lasers and Electro-Optics* San Jose, America, June 8–13, 2014 p2.
- [63] Horton N G, Xu C 2015 *Biomed. Opt. Express* **6** 1392
- [64] Ouzounov D G, Wang T, Wang M, Feng D, Horton N G, Cruz-Hernandez J C, Cheng Y T, Reimer J, Tolia A S, Nishimura N, Xu C 2017 *Nat. Methods* **14** 388
- [65] Li B, Wang M, Wu C, Charan K, Xu C 2018 *Conference on Lasers and Electro-Optics* San Jose, America, May 13-18, 2018 pJTh5 C.5
- [66] Wang T, Ouzounov D G, Wu C, Horton N G, Zhang B, Wu C H, Zhang Y, Schnitzer M J, Xu C 2018 *Nat. Methods* **15** 789
- [67] Li B, Wu C, Wang M, Charan K, Xu C 2020 *Nat. Methods* **17** 163
- [68] Chow D M, Sinefeld D, Kolkman K E, Ouzounov D G, Akbari N, Tatarsky R, Bass A, Xu C, Fetcho J R 2020 *Nat. Methods* **17** 605
- [69] Wang S, Xi W, Cai F, Zhao X, Xu Z, Qian J, He S 2015 *Theranostics* **5** 251
- [70] Zhu Z, Leung C W, Zhao X, Wang Y, Qian J, Tang B Z, He S 2015 *Sci. Rep-UK.* **5** 15189
- [71] Li D, Zhao X, Qin W, Zhang H, Fei Y, Liu L, Yong K T, Chen G, Tang B Z, Qian J 2016 *Nano Res.* **9** 1921
- [72] Wang Y, Chen M, Alifu N, Li S, Qin W, Qin A, Tang B Z, Qian J 2017 *ACS Nano* **11** 10452
- [73] Wang Y, Han X, Xi W, Li J, Roe A W, Lu P, Qian J 2017 *Adv. Healthc. Mater.* **6** 1700685
- [74] Liu W, Wang Y, Han X, Lu P, Zhu L, Sun C, Qian J, He S 2018 *Nanoscale* **10** 10025
- [75] Ni H, Xu Z, Li D, Chen M, Tang B Z, Qian J 2019 *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **12** 1940005
- [76] Qin W, Alifu N, Lam J W Y, Cui Y, Su H, Liang G, Qian J, Tang B Z 2020 *Adv. Mater.* **32** e2000364
- [77] Liu H, Du Y, Peng X, Zhou X, Qiu P, Wang K 2017 *IEEE Photonics J.* **9** 1
- [78] Tong S, Liu H, Cheng H, He C, Du Y, Zhuang Z, Qiu P, Wang K 2019 *J. Biophotonics* **12** e201800423
- [79] Liu H, Deng X, Tong S, He C, Cheng H, Zhuang Z, Gan M, Li J, Xie W, Qiu P, Wang K 2019 *Nano. Lett.* **19** 5260
- [80] Tong S, Gan M Y, Zhuang Z W, Liu H J, Cheng H, Li J, Qiu P, Wang K 2020 *J. Lightwave Technol.* **38** 2450
- [81] Weisenburger S, Tejera F, Demas J, Chen B, Manley J, Sparks F T, Traub F M, Daigle T, Zeng H, Losonczy A, Vaziri A 2019 *Cell* **177** 1050
- [82] Klioutchnikov A, Wallace D J, Frosz M H, Zeltner R, Sawinski J, Pawlak V, Voit K M, Russell P S J, Kerr J N D 2020 *Nat. Methods* **17** 509

REVIEW

New advances in biomedical applications of multiphoton imaging technology*

Li Shao-Qiang Geng Jun-Xian Li Yan-Ping Liu Xiong-Bo

Peng Xiao Qu Jun-Le Liu Li-Wei Hu Rui[†]

(College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Ministry of Education/
Guangdong Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Shenzhen 518060, China)

(Received 2 July 2020; revised manuscript received 3 August 2020)

Abstract

In contrast to single photon excitation fluorescence imaging, laser scanning confocal imaging, and wide-field imaging, the multi-photon imaging has advantages of minimal invasion and deeper penetration by using near-infrared (NIR) laser source. Moreover, it can carry out three-dimensional high-spatial-resolution imaging of biological tissues due to its natural optical tomography capability. Since its advent, multi-photon imaging has become a powerful tool in biomedicine and achieved a series of significant discoveries in cancer pathology, neurological diseases and brain functional imaging. In the past decade, as a major form of multi-photon imaging technology, two-photon excited fluorescence microscopy imaging has a great potential in biomedical applications. In order to satisfy the practical biomedical applications, multi-photon imaging technologies have made significant breakthroughs in improving the deficiencies of traditional 2PEF in multi-color imaging, functional imaging, live imaging and imaging depth, such as multicolor two-photon excitation fluorescence microscopy, two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, two-photon fiber endoscopic imaging, and three-photon microscopy imaging technology. For example, multicolor two-photon excitation fluorescence microscopy is demonstrated to achieve simultaneous imaging of multiple fluorophores with multiple wavelength excitation lasers or continuous spectrum. In addition, the two-photon fluorescence lifetime microscopic imaging provides a method to achieve high-resolution three-dimensional imaging of biological tissue with multi-dimensional information including fluorescence intensity and lifetime. In addition, two-photon optical fiber endoscopic imaging with small system size and minimal invasion is developed and used to image the tissue inside the deep organ. Finally, two-photon excitation fluorescence microscopy technique still has relatively strong scattering for brain functional imaging in vivo. Therefore, the imaging depth is limited by the signal-to-background ratio. Three-photon microscopic imaging technique can achieve higher imaging depth and a desired signal-to-noise ratio by extending the wavelength from 1600 nm to 1820 nm because the attenuation of the excitation light in this wavelength range is much smaller. In this article, we briefly introduce the principles and applications of these multi-photon imaging technologies, and finally provide our view for their future development.

Keywords: multicolor two-photon excitation fluorescence microscopy, two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, two-photon fiber endoscopic imaging, three-photon microscopy imaging

PACS: 87.64.mn, 87.64.M-, 87.64.kv, 87.85.Pq

DOI: 10.7498/aps.69.20201039

* Project supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2017YFA0700402), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61525503, 61722508, 61620106016, 61835009, 61935012, 61961136005), and the Shenzhen Free Exploration Project, China (Grant No. JCYJ20180305124902165).

[†] Corresponding author. E-mail: rlu@szu.edu.cn