



## 基于自相位调制光谱选择驱动的无标记自发荧光多倍频显微镜系统

王晓英 邢宇婷 陈润植 贾雪琦 吴继华 江进 李连勇 常国庆

### Simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy driven by femtosecond sources based on self-phase modulation enabled spectral selection

Wang Xiao-Ying Xing Yu-Ting Chen Run-Zhi Jia Xue-Qi Wu Ji-Hua Jiang Jin Li Lian-Yong  
Chang Guo-Qing

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 71, 104204 (2022) DOI: 10.7498/aps.71.20212282

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.71.20212282>

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

#### 窄线宽脉冲光纤激光的自相位调制预补偿研究

Self-phase modulation pre-compensation of narrowlinewidth pulsed fiber lasers

物理学报. 2018, 67(16): 164201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180486>

#### 基于锯齿波脉冲抑制自相位调制的高功率窄线宽单频脉冲光纤激光放大器

High-power narrow-linewidth single-frequency pulsed fiber amplifier based on self-phase modulation suppression via sawtooth-shaped pulses

物理学报. 2021, 70(21): 214202 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210496>

#### 相干彩虹的形成机制

Formation mechanism of coherent rainbows

物理学报. 2018, 67(18): 184204 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180888>

#### 基于噪声免疫腔增强光外差分子光谱技术实现光纤激光器到1530.58 nm NH<sub>3</sub>亚多普勒饱和光谱的频率锁定

Frequency locking of fiber laser to 1530.58 nm NH<sub>3</sub> sub-Doppler saturation spectrum based on noise-immune cavity-enhanced optical heterodyne molecular spectroscopy technique

物理学报. 2018, 67(10): 104207 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172541>

#### 基于二维纳米材料可饱和吸收体的中红外超快光纤激光器

Two-dimensional material as a saturable absorber for mid-infrared ultrafast fiber laser

物理学报. 2020, 69(18): 188101 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200472>

#### 基于偏振依赖多模-单模-多模光纤滤波器的波长间隔可调谐双波长掺铒光纤激光器

Continuously spacing-tunable dual-wavelength erbium-doped fiber laser based on polarization-dependent in-line multimode-single-mode-multimode fiber filter

物理学报. 2019, 68(15): 154202 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190297>

# 基于自相位调制光谱选择驱动的非标记 自发荧光多倍频显微镜系统\*

王晓英<sup>1) #</sup> 邢宇婷<sup>2) #</sup> 陈润植<sup>2)</sup> 贾雪琦<sup>2)</sup> 吴继华<sup>3) †</sup>  
江进<sup>3)</sup> 李连勇<sup>1)</sup> 常国庆<sup>2) ‡</sup>

1) (战略支援部队特色医学中心, 消化科, 北京 100101)

2) (中国科学院物理研究所, 光物理重点实验室, 北京 100190)

3) (战略支援部队特色医学中心, 病理科, 北京 100101)

(2021年12月9日收到; 2022年1月12日收到修改稿)

由飞秒激光驱动的非线性光学显微镜技术在医学组织成像中具有很多独特的优势, 包括多种成像模式、高对比度、高分辨率和无标记的深层光学切片能力等. 由于缺乏波长可灵活调谐的飞秒激发光源, 导致在多模态成像的同时难以兼顾每种模式的对比度, 从而制约了非线性光学显微镜在医学诊断中的广泛应用. 本文采用基于自相位调制光谱选择的光纤激光光源, 获得了中心波长在 990—1110 nm 范围内可调谐的高能量飞秒脉冲, 并用于驱动非线性光学显微镜. 采用 990 nm 的飞秒脉冲, 通过双光子激发荧光和二倍频对胃组织成像, 进一步结合图像拼接技术成功获得了胃组织的双模态大视场图像; 利用 1110 nm 的飞秒脉冲, 实现了无标记自发荧光多倍频显微镜技术, 同时高效激发了胃组织的双光子激发荧光、三光子激发荧光、二倍频和三倍频信号, 获得了胃组织的多模态图像.

**关键词:** 光纤激光器, 自相位调制, 非线性光学显微镜

**PACS:** 42.55.Wd, 87.64.M-

**DOI:** 10.7498/aps.71.20212282

## 1 引言

非线性光学显微成像具有亚微米水平的光学分辨率和光切片的能力, 已经成为重要的生物医学组织成像手段<sup>[1]</sup>. 非线性光学显微成像通过超短脉冲与生物组织之间相互作用可以实现多种非线性无标记成像过程, 包括双光子激发荧光 (two-photon excitation fluorescence, 2PEF)、三光子激发荧光 (three-photon excitation fluorescence, 3PEF)<sup>[2–13]</sup>、二倍频 (second-harmonic generation,

SHG)<sup>[13–20]</sup>、三倍频 (third-harmonic generation, THG)<sup>[12,13,15–17,19,20]</sup>、相干反斯托克斯拉曼散射 (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)<sup>[21–23]</sup> 和受激拉曼散射 (stimulated Raman scattering, SRS)<sup>[24,25]</sup>. SHG 过程对有序的非中心对称分子结构具有高度特异性, 因此可为某些细胞和组织成分 (如胶原蛋白、微管和肌球蛋白) 提供清晰的成像对比度<sup>[13–20]</sup>. THG 源于光学不均匀性, 对组织边界的折射率变化特别敏感, 适合对透明物质的界面和细胞等细微结构的轮廓成像<sup>[13,15–17,19,20]</sup>. 多光子激发荧光通过获取生物样品的各种内源性物质

\* 战略支援部队特色医学中心医药卫生临床创新探索课题 (批准号: 19ZX40)、国家自然科学基金 (批准号: 11774234) 和用于三维生物模型大深度和高精度成像的新型多光子显微镜研制项目 (批准号: YJKYYQ20190034) 资助的课题.

# 同等贡献作者.

† 通信作者. E-mail: [jh\\_02821@126.com](mailto:jh_02821@126.com)

‡ 通信作者. E-mail: [guoqing.chang@iphy.ac.cn](mailto:guoqing.chang@iphy.ac.cn)

的自发荧光实现成像, 这些内源性物质包括视黄醇、辅酶、维生素 D、黑色素、弹性蛋白和胶原蛋白等, 其中通过收集还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 以及黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 这两种内源性物质的细胞质自发荧光, 可以在图像中分辨出细胞<sup>[2-9,13]</sup>. 基于分子振动的 CARS 和 SRS 成像在获取图像的同时还可以识别不同的分子结构<sup>[21-25]</sup>.

在无标记成像中, 利用上述多种非线性成像过程实现多模态成像有两种方案. 一种是采用不同的激发条件依次实现多种非线性成像过程<sup>[26-28]</sup>. 由于该种方案需要变换激发条件, 所以很难实现快速成像; 并且激光长时间聚焦到一个位置会增加样品光损坏的风险; 另外在变换激发条件时样品的移动导致多个模态的图像无法完美重叠而产生运动伪影. 另一种方案是以单个激发配合多个检测通道, 在单次激发条件下同时实现多种非线性成像过程<sup>[13,29-32]</sup>. 该方案虽然能避免出现运动伪影和光损伤, 但是由于无法对每个信号独立优化, 所以难以高效激发多个非线性成像过程. 为了解决该问题, 必须选择波长合适的超快驱动激光, 不仅保证能够同时激发多个非线性成像过程, 而且确保这些非线性过程所产生的光学信号能够被高效检测, 从而实现快速成像. 超快光纤激光由于结构简单、光束质量高、能适应相对恶劣的工作环境等优点被广泛应用于驱动非线性光学显微镜<sup>[33]</sup>. 最常用的光纤超快激光器是掺镱光纤激光器和掺铒光纤激光器, 其脉冲中心波长分别在 1.03  $\mu\text{m}$  和 1.55  $\mu\text{m}$  附近. 受限于增益带宽, 这两种光纤激光所产生的飞秒脉冲都不能在大范围内波长调谐, 大大限制了在非线性显微成像中的应用. 为了解决该难题, 人们发展了多种基于非线性光纤光学技术的波长转换手段以产生波长可以大范围内调谐的飞秒脉冲, 用以优化无标记的非线性显微成像过程. 传统的非线性波长转换技术包括孤子自频移<sup>[34-36]</sup>、色散波产生<sup>[37-40]</sup>、超连续谱<sup>[41]</sup>和四波混频<sup>[42]</sup>, 但这些方式的能量可扩展性差而且转换效率较低.

为解决这些问题, 提出了一种新的波长转换方法——基于自相位调制 (self-phase modulation, SPM) 的光谱选择技术 (self-phase modulation enabled spectral selection, SESS)<sup>[43-48]</sup>. 在这种方法中, 高能窄带飞秒脉冲在很短 ( $< 10$  cm) 的

光纤内传输即可获得足够的光谱展宽, 展宽光谱由一系列相互独立的光谱旁瓣构成, 其中最左侧和最右侧的旁瓣包含大量的脉冲能量. 利用光学滤波器滤出最左/最右的光谱旁瓣, 可以获得波长可大范围调谐的近变换极限飞秒脉冲. 在本文中, 首次利用 SESS 飞秒光源驱动非线性光学显微镜实现胃组织的多模态显微成像. 该光源使用重复频率为 43 MHz 的掺镱光纤激光器作为前端, 利用非线性波长转换技术产生波长在 990 nm、脉冲能量约为 7 nJ、脉宽约为 84 fs 的脉冲. 我们使用该光源驱动非线性光学显微镜, 通过 2PEF 和 SHG 这两种成像模态对胃组织进行了成像, 并将单张小视场的图像拼接后获得了大视场双模态的胃组织图像. 另外, 还获得了波长在 1110 nm、脉冲能量大于 10 nJ、脉宽约为 48 fs 的脉冲, 我们使用该飞秒光源获得了胃组织的 2PEF, 3PEF, SHG 和 THG 的多模态图像.

## 2 实验装置

### 2.1 基于 SESS 的光纤激光光源

基于 SESS 的非线性光学显微镜实验装置如图 1 所示. 掺镱光纤振荡器产生重频 43 MHz、中心波长在 1040 nm、能量约 0.2 nJ 的超短脉冲. 该脉冲经过光纤展宽器展宽后, 脉冲能量由两级掺镱光纤放大器放大到 100 nJ 以上, 图 2(a) 为放大后的光谱. 图 2(b) 中红色曲线是压缩后脉冲的自相关曲线, 半高全宽为 253 fs, 假设该脉冲为双曲正弦型, 对应的脉宽则为 164 fs. 图 2(b) 中黑色曲线是放大后光谱对应的变换极限脉冲的自相关曲线, 与测量得到的自相关曲线重合, 表明获得了近变换极限脉冲.

为了实现 SESS, 将压缩后的脉冲耦合到 5.5 cm 长的单模光子晶体光纤中, 该光纤的模场直径为 10.3  $\mu\text{m}$ , 在 1030 nm 处的群速度色散为  $-30$  ps/(nm·km). 光纤耦合模块包括光纤支架 (HFV001, Thorlabs)、三轴平移台 (MAX313 D, Thorlabs) 和有效焦距为 15 mm 的非球面透镜 (C260 TMD-C, Thorlabs). 低功率下光纤的耦合效率为 72%. 如图 3(a) 所示, 当耦合到光纤里的能量为 44 nJ 时, 展宽光谱中最左侧的光谱旁瓣的峰值波长移至 990 nm, 使用截止波长在 1000 nm 的短通光滤波器 (#64337, Edmund Optics) 滤出最左侧旁瓣,

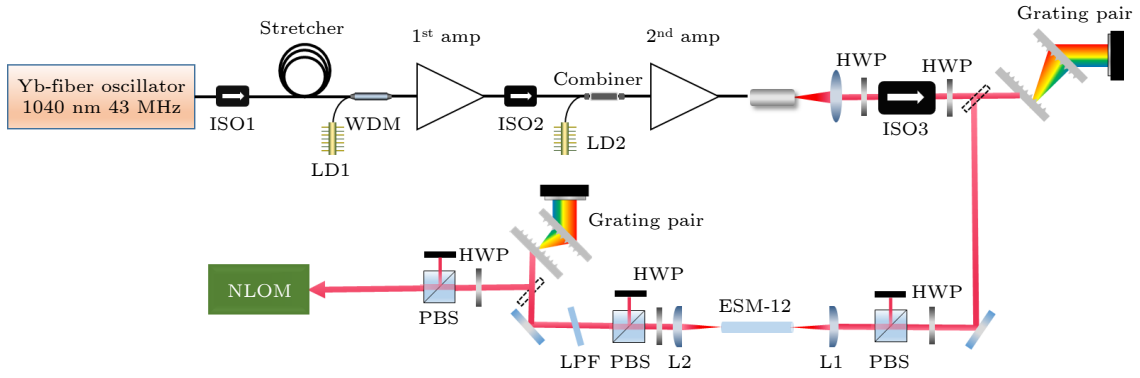


图 1 基于 SESS 的非线性光学显微镜实验装置. ISO: 隔离器, LD: 二极管泵浦激光源, WDM: 波分复用器, Amp: 光纤放大器, HWP: 半波片, PBS: 偏振分束器, L: 透镜, LPF: 长通滤波器, NLOM: 非线性光学显微镜

Fig. 1. Schematic setup of the nonlinear optical microscopy driven by SESS. ISO: isolator, LD: laser diode, WDM: wavelength-division multiplexing, Amp: amplifier, HWP: half-wave plate, PBS: polarization beam splitter, L: lens, LPF: long pass filter, NLOM: nonlinear optical microscopy.

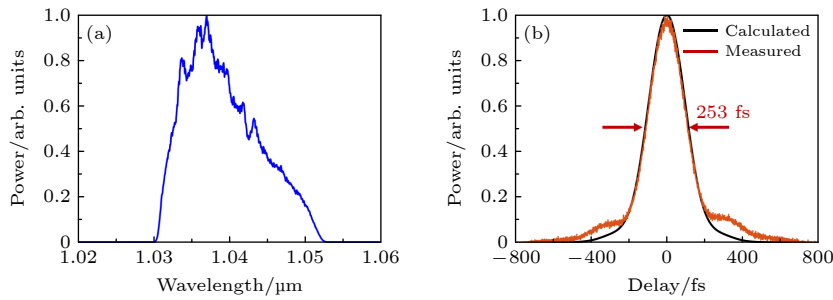


图 2 放大脉冲的光谱和自相关轨迹 (a) 光谱; (b) 自相关轨迹. 红色曲线: 测量得到的自相关轨迹, 黑色曲线: 通过光谱计算得到的变换极限脉冲的自相关轨迹

Fig. 2. Spectrum and autocorrelation trace of the amplified pulse: (a) Spectrum; (b) autocorrelation trace. Red curve: measured autocorrelation trace. Black curve: calculated from the transform-limited pulses allowed by the amplified pulse spectrum.

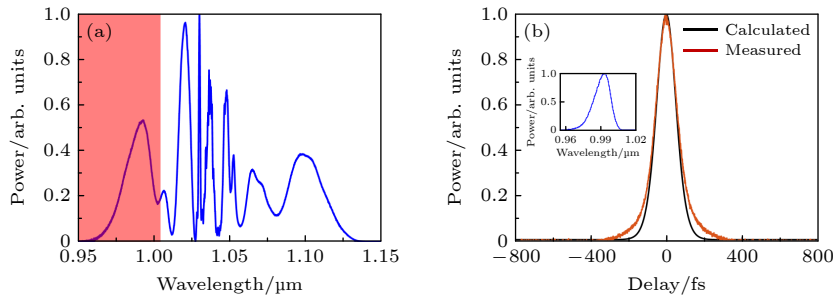


图 3 当耦合到光纤里的能量为 44 nJ 时输出的展宽光谱以及 990 nm 处滤波得到的脉冲光谱和自相关轨迹 (a) 展宽光谱; (b) 自相关轨迹. 红色曲线: 测量得到的自相关轨迹, 黑色曲线: 通过光谱计算得到的变换极限脉冲的自相关轨迹. 插图: 990 nm 处滤波得到的脉冲光谱

Fig. 3. Spectrum broadening with coupled energy of 44 nJ, spectrum and autocorrelation trace of the filtered pulses at 990 nm: (a) Broadened spectrum; (b) autocorrelation trace. Red curve: measured autocorrelation trace. Black curve: calculated from the transform-limited pulses allowed by the spectrum at 990 nm. Inset: filtered spectrum at 990 nm.

得到的脉冲功率为 298 mW, 能量为 6.9 nJ, 转换效率为 16%. 滤出来的脉冲经过光栅对压缩, 图 3(b) 中红色曲线是压缩后脉冲的自相关曲线, 半高全宽为 129 fs, 假设该脉冲为双曲正割型, 对应的脉宽则为 84 fs. 图 3(b) 还显示了左旁瓣光谱对应的变换极限脉冲的自相关曲线 (黑色曲线), 与测量得到

的自相关曲线几乎重合, 表明我们获得了近变换极限脉冲.

如图 4(a) 所示, 当耦合到光纤里的脉冲能量为 50 nJ 时, 展宽光谱中最右侧的光谱旁瓣的峰值波长移至 1110 nm. 我们使用 1150 nm 的长通滤波器 (#89661, Edmund Optics) 滤出最右侧的两

个旁瓣, 得到的脉冲功率为 640 mW, 能量为 15 nJ, 转换效率为 28%. 同样, 滤出来的脉冲经过光栅对压缩, 图 4(b) 红色曲线展示了压缩后脉冲测量得到的自相关曲线, 半高全宽为 74 fs, 假设该脉冲为双曲正弦型, 对应的脉宽则为 48 fs. 同一图中还展示了计算得到的右旁瓣光谱对应的变换极限脉冲的自相关曲线 (黑色曲线), 变换极限脉冲的脉宽为 44 fs, 表明获得了近变换极限脉冲.

进一步, 我们验证了滤波得到的两个不同波长脉冲的长期稳定性. 在没有任何反馈控制的情况下, 4 h 内测量输出脉冲功率的变化小于 3%; 在对光纤耦合进行主动调节时, 4 h 以上能实现低于 1% 的功率改变, 从而能保证在成像期间功率改变可忽略不计, 不影响成像结果.

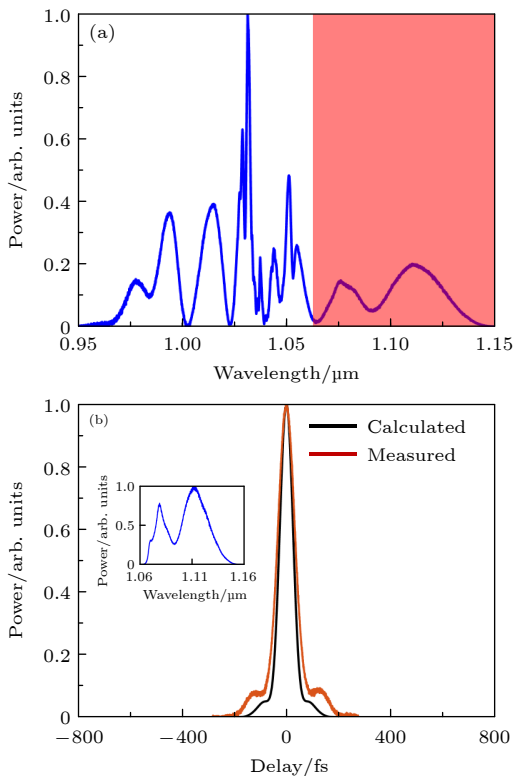


图 4 当耦合到光纤里的能量为 50 nJ 时输出的展宽光谱以及 1110 nm 处滤波得到的脉冲光谱和自相关曲线 (a) 展宽光谱; (b) 自相关轨迹. 红色曲线: 测量得到的自相关轨迹, 黑色曲线: 通过光谱计算得到的变换极限脉冲的自相关轨迹, 插图: 1110 nm 处滤波得到的脉冲光谱

Fig. 4. Spectrum broadening with coupled energy of 50 nJ, spectrum and autocorrelation trace of the filtered pulses at 1110 nm: (a) Broadened spectrum; (b) autocorrelation trace. Red curve: measured autocorrelation trace. Black curve: calculated from the transform-limited pulses allowed by the spectrum at 1110 nm. Inset: filtered spectrum at 1110 nm.

## 2.2 扫描显微镜

基于 SESS 的飞秒光源出射的光束由 8 kHz 的共振扫描仪进行扫描, 并由水浸物镜 (XLPLN25 XWMP2,  $NA = 1.05$ , Olympus) 聚焦到样品上, 产生非线性信号. 双色镜 (F665-Di02-25 × 36, Semrock) 将激发光束和由物镜收集的发射信号后向分离. 采用三个滤波模块区分不同的非线性信号, 每个滤波模块包含一个双色镜和两个带通滤波器. 在 1110 nm 激发下, 检测 2PEF/3PEF/SHG/THG 信号时, 滤波模块 1 (#34731, #12152, #12096, Edmund Optics) 可区分 SHG/THG 信号, 滤波模块 2 (#34731, #86953, #86949, Edmund Optics) 用以区分 2PEF/3PEF 信号. 在 990 nm 激发下, 检测 2PEF/SHG 信号时, 滤波模块 3 (#34739, #86953, #12152, Edmund Optics) 能够区分 2PEF/SHG 信号. PMT1 和 PMT2 (PMT2100, Thorlabs) 用来探测信号. 在 1110 nm 激发下, 收集 2PEF/3PEF/SHG/THG 信号时, 以 30 FPS 的速度获取  $1248 \mu\text{m} \times 1248 \mu\text{m}$  视场的图像, 每帧  $1024 \times 1024$  像素, 每十帧平均一次. 在 990 nm 激发下, 收集 2PEF/SHG 信号时, 同样速度获取  $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$  视场的图像, 每十帧平均一次, 通过电动平移台 (PLS-XY, Thorlabs) 平移样品获取多张小视场图像, 用 ImageJ 软件进行小视场图像的拼接.

## 3 实验结果

为了证明我们的显微镜系统在人体胃组织中进行多模态无标记成像的能力, 使用 990 nm 脉冲驱动非线性光学显微镜对胃组织未染色石蜡切片 (厚度  $10 \mu\text{m}$ ) 进行成像 (图 5), 并且使用 1110 nm 脉冲对胃组织冰冻切片 (厚度  $50 \mu\text{m}$ ) 进行成像 (图 6).

### 3.1 离体人体胃组织的 2PEF/SHG 成像

使用中心波长在 990 nm 的脉冲对胃组织未染色石蜡切片进行成像, 由于显微镜系统的衰减, 物镜后的最大激发功率为 55 mW, 考虑到重频为 43 MHz, 对应的脉冲能量约 1.3 nJ, 最终获得了视场大小为  $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$  的胃组织 2PEF/SHG 图像. 如图 5 所示, 由十张小视场图像拼接得到的胃组织的 2PEF/SHG 图像显示了正常胃粘膜主要

由胃腺和结缔组织的基质组成. 细胞质内含有 FAD 这种内源性荧光团, 细胞核内不含有 FAD. 在 2PEF 图像中, 通过收集 FAD 的内源性自发荧光, 可以识别出位于基底膜表面的单个上皮细胞核 (图 5(a) 中的白色箭头), 并且可以轻松检测到由上皮细胞组成的单个胃腺. 胶原蛋白基质是形成粘膜基质的基本框架, SHG 图像主要显示胶原蛋白等细胞外基质 (图 5(b) 中的黄色箭头). 从图 5(c) 的 2PEF 和 SHG 的叠加图像中可以看到基底膜是围绕单个腺体的细带, 并且基质中的网状纤维形成了支持胃腺的细网状结构.

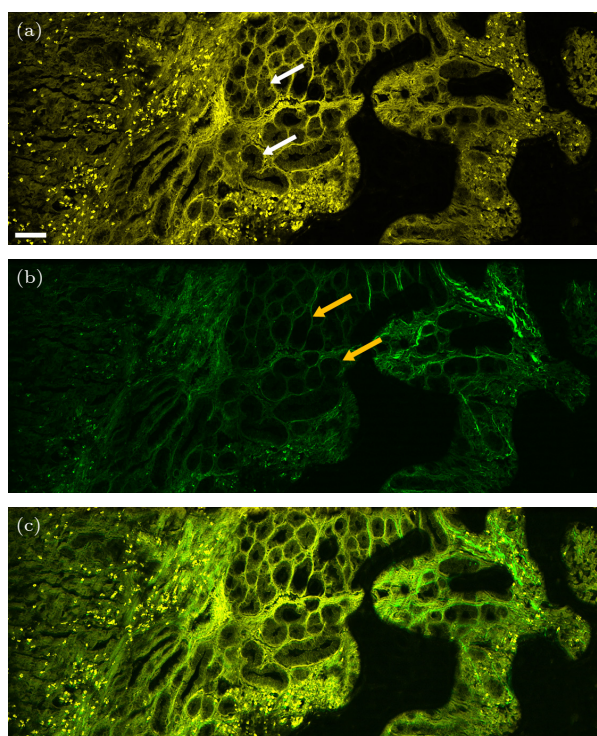


图 5 离体人体胃组织的 2PEF/SHG 图像 (a) 2PEF 图像; (b) SHG 图像; (c) 2PEF 和 SHG 的叠加图像. 白色箭头: 上皮细胞; 黄色箭头: 胶原蛋白. 比例尺: 100  $\mu\text{m}$

Fig. 5. 2PEF/SHG images of ex vivo human gastric tissue: (a) 2PEF image; (b) SHG image; (c) merging of 2PEF and SHG images. White arrow: epithelial cells; yellow arrow: collagen. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 离体人体胃组织的 2PEF/SHG/3PEF/THG 成像

使用中心波长在 990 nm 的脉冲对胃组织进行成像, 由于激发光波长靠近 FAD 荧光团的激发峰, 所以仅需要很少的能量就可以高效激发 2PEF, 同时也可以收集到强的 SHG 信号. 但想获得更多模态的生物信息, 例如 THG 和 3PEF 信号, 就需

要波长更长、能量更高、脉宽更窄的脉冲. You 等<sup>[13]</sup>发明了无标记自发荧光多倍频显微镜技术 (simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy, SLAM), 该技术旨在单次激发条件下分辨发射光谱重叠的内源性荧光团, 并同时激发倍频过程. 实现该技术需要波长可调谐的飞秒激光驱动源以优化特定的多模态过程. NADH 和 FAD 是细胞中参与氧化还原反应的两个主要辅酶, 与能量产生和细胞代谢密切相关. 在飞秒激光照射下, 通过多光子吸收可以激发 NADH 和 FAD 的自发荧光, 该荧光可以用于监测细胞的代谢活动, 进而能非侵入性地监测干细胞分化、癌症发展和神经退行性疾病等过程. 在非线性光学显微镜成像过程中, NADH 和 FAD 通常在 750 nm 和 880 nm 处被依次激发<sup>[2-9,13]</sup>, 成像速率随着激发波长的数量降低, 而且难以确保成像通道之间图像的重叠. 为了解决该难题, You 等<sup>[13]</sup>提出使用 1110 nm 飞秒脉冲作为激发光, 同时实现双光子激发 FAD、三光子激发 NADH. 实验中, 他们利用光子晶体光纤产生超连续光谱, 之后从中滤出中心波长在 1110 nm 的飞秒脉冲用来驱动非线性光学显微镜, 结合多个检测通道得到了较强的 2PEF, 3PEF, SHG 和 THG 的信号, 实现了对生物组织中多种成分的同步成像. 但是目前该 SLAM 系统的驱动光源基于固态超快光源产生超连续谱, 并且需要空间光调制器实现滤波和脉冲相位补偿, 导致整个系统结构复杂且对环境波动十分敏感, 限制了 SLAM 在生物医学成像中的应用. 相较而言, 利用 SESS 产生 1110 nm 飞秒脉冲, 方案简单易行、脉冲能量更高, 而且将来有望实现全光纤化. 为了验证 SESS 光源可用于驱动 SLAM 成像, 我们把脉冲波长调谐到 1110 nm, 滤出两个光谱旁瓣以获得更强的能量和更窄的脉宽, 对胃组织冰冻切片进行 SLAM 成像. 由于显微镜系统的衰减, 物镜后最大的激发功率为 225 mW, 重频为 43 MHz, 对应的脉冲能量约 5.2 nJ, 最终获得了胃组织的 2PEF/SHG/3PEF/THG 图像, 视场为 1248  $\mu\text{m} \times 1248 \mu\text{m}$ . 如图 6 所示, 在 2PEF 图像中可以观察到胃组织中的弹力纤维 (图 6(a) 中的粉色箭头), SHG 图像中显示出胃组织中的胶原纤维 (图 6(b) 中的黄色箭头), 在 THG/3PEF 中可以辨别出一些脂肪细胞 (图 6(c) 和图 6(d) 中的白色箭头).

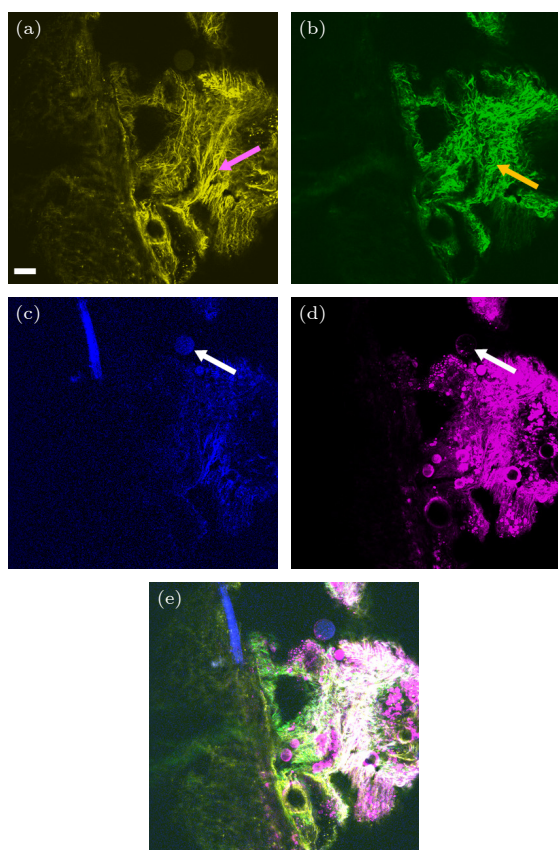


图 6 离体人体胃组织的 2PEF/SHG/3PEF/THG 图像 (a) 2PEF 图像; (b) SHG 图像; (c) 3PEF 图像; (d) THG 图像; (e) 2PEF/SHG/3PEF/THG 的叠加图像. 粉色箭头: 弹力纤维; 黄色箭头: 胶原纤维; 白色箭头: 脂肪细胞. 比例尺: 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 6. 2PEF/SHG/3PEF/THG images of ex vivo human gastric tissue: (a) 2PEF image; (b) SHG image; (c) 3PEF image; (d) THG image; (e) merging of 2PEF/SHG/3PEF/THG images. Pink arrow: elastic; yellow arrow: collagen; white arrow: adipocyte. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

## 4 结 论

我们的光纤超快激光光源通过新型波长转换技术 SESS 能提供灵活可变的多种波长用于驱动非线性光学显微镜, 进而实现多模态成像. 其中, 990 nm 的飞秒脉冲可以驱动 2PEF/SHG 显微镜, 激发胃组织中内源性荧光团 FAD 的双光子荧光, 收集胶原纤维的 SHG 信号, 实现对胃组织未染色石蜡切片的双模态成像; 1110 nm 的飞秒脉冲可以驱动 SLAM, 激发胃组织中弹性蛋白的双光子荧光和脂肪细胞的三光子荧光, 收集胶原纤维的 SHG 信号和一些细微结构轮廓界面的 THG 信号, 实现对新鲜胃组织冰冻切片的多模态成像.

目前, 光学参量振荡器 (optical parametric

oscillator, OPO) 结合钛宝石激光器是非线性光学显微镜主要选择的光源<sup>[49]</sup>, 它也可以输出 1110 nm 的脉冲驱动 SLAM. 但是它出射的脉冲重频高 (80 MHz)、脉冲宽 (140—400 fs), 导致峰值功率低难以高效激发自发荧光和多倍频信号. You 等<sup>[13]</sup>提出的基于 10 MHz 固态镱激光器的超连续谱光源, 通过脉冲整形器选择超连续谱中  $1110 \pm 30$  nm 波段用于驱动 SLAM, 峰值功率足够高效激发 2PEF/SHG/3PEF/THG 这四个模态的信号, 但它体积庞大、昂贵、结构复杂且对环境波动十分敏感. 我们提出的基于 SESS 的超快光纤光源相对钛宝石 OPO 光源重频低 (43 MHz)、脉宽窄 (48 fs)、峰值功率高, 相对基于 10 MHz 固态镱激光器的超连续谱光源结构简单、运行稳定, 更加适合驱动 SLAM.

肿瘤细胞和肿瘤微环境中的各种成分之间的相互作用已经成为了解肿瘤细胞如何增殖、侵袭、传播和转移的关键<sup>[50]</sup>. 未来, 我们可以通过 990 nm 脉冲驱动 2PEF/SHG 显微镜结合图像拼接技术, 对癌变和正常胃组织未染色石蜡切片进行大视场成像, 并与福尔马林固定、石蜡包埋、苏木精和伊红染色的标准组织切片进行对比, 在无标记的 2PEF/SHG 显微镜中实现轻松分辨癌变和正常的胃组织, 用于快速经济高效地进行组织学评估, 推进胃癌的快速诊断. 另外, 可以通过 1110 nm 脉冲驱动 SLAM, 收集癌变组织的 2PEF/SHG/3PEF/THG 信号. 不同的通道可以收集到不同的细胞以及细胞外基质的信号, 例如 3 PAF 可以观察到基质细胞、巨噬细胞、脂肪组织中的脂质液泡和呈管状排列的生物囊泡等; 2 PAF 几乎存在于所有细胞中, 仅微弱地存在于肿瘤细胞中; THG 主要出现在肿瘤相关囊泡中, SHG 可以观察到一些胶原蛋白等. 这些成像手段有助于我们了解不同细胞和细胞外基质在正常和癌变组织中的变化, 可以阐明不同生物成分在癌症进展中的复杂作用, 并发现可用于癌症诊断和预后的生物标志物.

非线性光学显微镜技术具有无标记、多模态、高分辨率和深层光学切片能力等优势. 本文中, 通过对厚度为 50  $\mu\text{m}$  的冰冻切片和厚度为 10  $\mu\text{m}$  的石蜡切片进行成像, 验证该技术的无标记多模态成像能力. 在未来的实验工作中, 将利用荧光微球精确测量成像系统的空间分辨率; 还将对厚的组织块进行成像, 获取显微成像系统在不同聚焦深度情况

的成像结果, 进一步验证系统的深层光学切片能力.

总之, 我们提出的基于 SESS 的超快光纤光源可以输出 990 nm 和 1110 nm 的脉冲, 实现了胃组织中细胞和细胞外成分的同时成像. 进一步, 我们的光源还可灵活调节中心波长、脉宽、脉冲能量和平均功率等所有重要的激光参数, 从而有望广泛应用于不同的生物医学成像场景.

## 参考文献

- [1] Hanson K M, Bardeen C J 2009 *Photochem. Photobiol.* **85** 33
- [2] Masters B R, So P T C, Gratton E 1997 *Biophys. J.* **72** 2405
- [3] König K, Riemann I 2003 *J. Biomed. Opt.* **8** 432
- [4] König K, Ehlers A, Stracke F, Riemann I 2006 *Skin Pharmacol. Physiol.* **19** 78
- [5] König K, Ehlers A, Riemann I, Schenkl S, Bückle R, Kaatz M 2007 *Microsc. Res. Tech.* **70** 398
- [6] Paoli J, Smedh M, Wennberg A M, Ericson M B 2008 *J. Invest. Dermatol.* **128** 1248
- [7] Breunig H G, Studier H, König K 2010 *Opt. Express* **18** 7857
- [8] El Madani H A, Tancrède-Bohin E, Bensussan A, Colonna A, Dupuy A, Bagot M, Pena A M 2012 *J. Biomed. Opt.* **17** 026009
- [9] Balu M, Mazhar A, Hayakawa C K, Mittal R, Krasieva T B, König K, Venugopalan V, Tromberg B J 2013 *Biophys. J.* **104** 258
- [10] Cahill L C, Giacomelli M G, Tadayuki Y 2018 *Lab. Invest.* **98** 150
- [11] Cahill L C, Fujimoto J G, Giacomelli M G 2019 *Mod. Pathol.* **32** 1158
- [12] Sun C K, Chien T K, Ming L W 2019 *J. Biophotonics* **12** 1
- [13] You S, Tu H, Chaney E J, Sun Y, Zhao Y, Bower A J, Liu Y Z, Marjanovic M, Sinha S, Pu Y, Boppart S A 2018 *Nat. Commun.* **9** 2125
- [14] Brown E, McKee T, diTomaso E, Pluen A, Seed B, Boucher Y, Jain R K 2003 *Nat. Med.* **9** 796
- [15] Sun C K, Chen C C, Chu S W, Tsai T H, Chen Y C, Lin B L 2003 *Opt. Lett.* **28** 2488
- [16] Tai S P, Tsai T H, Lee W J, Shieh D B, Liao Y H, Huang H Y, Zhang K, Liu H L, Sun C K 2005 *Opt. Express* **13** 8231
- [17] Chen S Y, Wu H Y, Sun C K 2009 *J. Biomed. Opt.* **14** 060505
- [18] Yasui T, Takahashi Y, Ito M, Fukushima S, Araki T 2009 *Appl. Opt.* **48** D88
- [19] Chen S Y, Chen S U, Wu H Y, Lee W J, Liao Y H, Sun C K 2010 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16** 478
- [20] Tsai N R, Chen S Y, Shieh D B, Lou P J, Sun C K 2011 *Biomed. Opt. Express* **2** 2317
- [21] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S 1999 *Phys. Rev. Lett.* **82** 4142
- [22] Hellerer T, Enejder A M, Zumbusch A 2004 *Appl. Phys. Lett.* **85** 25
- [23] Legesse F B, Medyukhina A, Heuke S, Popp J 2015 *Comput. Med. Imaging Graph.* **43** 36
- [24] Freudiger C W, Min W, Saar B G, Lu S, Holtom G R, He C, Tsai J C, Kang J X, Xie X S 2008 *Science* **322** 1857
- [25] Ji M, Lewis S, Camelo-Piragua S, Ramkissoon S H, Snuderl M, Venneti S, Fisher-Hubbard A, Garrard M, Fu D, Wang A C, Heth J A, Maher C O, Sanai N, Johnson T D, Freudiger C W, Sagher O, Xie X S, Orringer D A 2015 *Sci. Transl. Med.* **7** 309ra163
- [26] Georgakoudi I, Quinn K P 2012 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14** 351
- [27] Chang T, Zimmerley S, Quinn K P, Jouenne I L, Kaplan D L, Beaurepaire E, Georgakoudi I 2013 *Biomaterials* **34** 8607
- [28] Hou J, Wright H J, Chan N S K, Tran R D H, Razorenova O V, Potma E O, Tromberg B J 2016 *J Biomed Opt.* **21** 060503
- [29] Huang S H, Heikal A A, Webb W W 2002 *Biophys. J.* **82** 2811
- [30] Zoumi A, Yeh A, Tromberg B J 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** 11014
- [31] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, Nikitin A Y, Hyman B T, Webb W W 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** 7075
- [32] Chu S W, Chen I H, Liu T M, Chen P C, Sun C K, Lin B L 2001 *Opt. Lett.* **26** 1909
- [33] Xu C, Wise F W 2013 *Nat. Photonics* **7** 875
- [34] Lim H, Ilday F O, Buckley J, Chong A, Wise F W 2004 *Electron. Lett.* **40** 1523
- [35] Takayanagi J, Sugiura T, Yoshida M, Nishizawa N 2006 *IEEE Photonics Technol. Lett.* **18** 2284
- [36] Li K C, Huang L L H, Liang J H, Chang M C 2016 *Biomed. Opt. Express* **7** 4803
- [37] Chen H W, Haider Z, Lim J, Xu S, Yang Z, Kärtner F X, Chang G, 2013 *Opt. Lett.* **38** 4927
- [38] Chan M C, Lien C H, Lu J Y, Lyu B H 2014 *Opt. Express* **22** 9498
- [39] Tauser F, Adler F, Leitenstorfer A 2004 *Opt. Lett.* **29** 516
- [40] Tu H, Lægsgaard J, Zhang R, Tong S, Liu Y, Boppart S A 2013 *Opt. Express* **21** 23188
- [41] Liu Y, Tu H, Benalcazar W A, Chaney E J, Boppart S A 2012 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **18** 1209
- [42] Gottschall T, Meyer T, Schmitt M, Popp J, Limpert J, Tünnermann A 2015 *Opt. Express* **23** 23968
- [43] Liu W, Li C, Zhang Z, Kärtner F X, Chang G Q 2016 *Opt. Express* **24** 15328
- [44] Liu W, Chia S H, Chung H Y, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2017 *Opt. Express* **25** 6822
- [45] Chung H Y, Liu W, Cao Q, Kärtner F X, Chang G Q 2017 *Opt. Express* **25** 15760
- [46] Chung H Y, Liu W, Cao Q, Song L W, Kärtner F X, Chang G Q 2018 *Opt. Express* **26** 3684
- [47] Chung H Y, Liu W, Cao Q, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2019 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **25** 6800708
- [48] Chung H Y, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2019 *Biomed. Opt. Express* **10** 514
- [49] Herz J, Siffrin V, Hauser A E, Brandt A U, Leuenberger T, Radbruch H, Zipp F, Niesner R A 2010 *Biophys. J.* **98** 715
- [50] Bissell M J, Radisky D 2001 *Nat. Rev. Cancer* **1** 46

# Simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy driven by femtosecond sources based on self-phase modulation enabled spectral selection\*

Wang Xiao-Ying<sup>1) #</sup> Xing Yu-Ting<sup>2) #</sup> Chen Run-Zhi<sup>2)</sup> Jia Xue-Qi<sup>2)</sup>  
Wu Ji-Hua<sup>3) †</sup> Jiang Jin<sup>3)</sup> Li Lian-Yong<sup>1)</sup> Chang Guo-Qing<sup>2) ‡</sup>

1) (*Department of Gastroenterology, Strategic Support Force Medical Center, Beijing 100101, China*)

2) (*Key Laboratory of Optical Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

3) (*Department of Pathology, Strategic Support Force Medical Center, Beijing 100101, China*)

( Received 9 December 2021; revised manuscript received 12 January 2022 )

## Abstract

Nonlinear optical microscopy technique has unique advantages in tissue imaging, such as enhanced contrast, high resolution, and label-free deep optical sectioning capabilities. Nonlinear optical microscopy also has multiple imaging modalities, corresponding to various components in biological tissues. Unfortunately, its wide applications are hindered due to the lack of broadly tunable femtosecond sources designed for driving multimodalities simultaneously. To solve this challenge, we propose a new wavelength conversion approach—self-phase modulation (SPM) enabled spectral selection, dubbed as SESS. The SESS employs SPM to broaden the input spectrum in a short fiber, and the broadened spectrum features well-isolated spectral lobes. Using the suitable optical filters to select the outermost spectral lobes produces nearly transform-limited femtosecond pulses. In this work, we demonstrate a fiber-optic SESS source for multimodal nonlinear optical microscopy. Based on a 43-MHz Yb-fiber laser, this SESS source can emit 990-nm, 84-fs pulses with  $>5$ -nJ energy and  $\sim 84$ -fs pulse duration; it can also produce 1110-nm, 48-fs pulses with 15-nJ energy. The 990-nm pulses are used to drive two-photon excitation fluorescence of many important fluorophores and second-harmonic generation microscopy, which, combined with image splicing technology, enables us to obtain a large field of view image of the gastric tissue. We also employ the 1110-nm pulses to drive simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy for multimodal imaging of gastric tissue. Two-photon excitation fluorescence, three-photon excitation fluorescence, second-harmonic generation and third-harmonic generation signals of gastric tissue are simultaneously excited efficiently. Such a multimodal nonlinear optical microscopy driven by SESS sources becomes a powerful tool in biomedical imaging.

**Keywords:** fiber laser, self-phase modulation, nonlinear optical microscopy

**PACS:** 42.55.Wd, 87.64.M-

**DOI:** 10.7498/aps.71.20212282

\* Project supported by the Strategic Support Force Medical Center Clinical Innovation Topics for Medicine and health, China (Grant No. 19ZX40), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11774234), and the Program of Development of a New Multiphoton Microscope for Large Depth and High Precision Imaging of Three-dimensional Biological Models, China (Grant No. YJKYYQ20190034).

# These authors contributed equally.

† Corresponding author. E-mail: [jh\\_02821@126.com](mailto:jh_02821@126.com)

‡ Corresponding author. E-mail: [guoqing.chang@iphy.ac.cn](mailto:guoqing.chang@iphy.ac.cn)