

基于双波长泵浦自相位调制光谱选择驱动的多光子显微成像系统*

陈润植¹⁾²⁾ 王晓英³⁾ 张立昊⁴⁾ 刘洋⁴⁾ 吴继华⁵⁾ 刁新财⁴⁾
张迪⁶⁾ 李连勇³⁾ 常国庆^{4)†} 薛平^{2)‡} 敬刚^{7)††}

1) (深圳清华大学研究院, 创新激光诊疗器械研发中心, 深圳 518057)

2) (清华大学物理系, 北京 100084)

3) (中国解放军总医院第九中心, 消化科, 北京 100101)

4) (中国科学院物理研究所, 超导国家重点实验室, 北京 100190)

5) (中国解放军总医院第九中心, 病理科, 北京 100101)

6) (泾源县人民医院内科, 固原 756400)

7) (深圳清华大学研究院, 深圳市光机电一体化重点实验室, 深圳 518057)

(2025年8月8日收到; 2025年9月22日收到修改稿)

多光子显微镜 (multiphoton microscopy, MPM) 已成为生物医学领域的重要研究工具. 目前, MPM 的驱动激光基于钛蓝宝石激光器, 可提供 720—950 nm 的波长可调谐飞秒脉冲. 为覆盖 1000—1350 nm 的第二生物透射窗口, 通常需要引入复杂的光学参量振荡器. 而为增加成像深度, 位于 1600—1750 nm 的第三生物透射窗口的光源同样也得到了广泛的关注. 然而, 迄今为止还没有能够同时覆盖三个透射窗口的超快激光源, 这阻碍了 MPM 在生医领域的广泛应用. 本文发展了一种基于双波长光纤激光器的超快光源, 输出波长在 800—1650 nm 之间可调谐的四色飞秒脉冲, 覆盖了适合驱动 MPM 的全部波段. 利用该超倍频程的超快光源驱动 MPM, 我们成功地实现了对多种生物医学样品的无标记多模态成像.

关键词: 多光子显微镜, 波长可调谐飞秒光源, 无标记成像, 病理诊断

PACS: 42.55.Wd, 87.64.mm

DOI: 10.7498/aps.74.20251069

CSTR: 32037.14.aps.74.20251069

1 引言

作为一种无标记成像技术, 多光子显微镜 (multiphoton microscopy, MPM) 结合了多种成像模态 (如多光子荧光激发、谐波产生), 能够同时揭示生物组织内细胞和细胞外基质的形态、代谢和结

构信息, 已成为生物医学研究的有力工具^[1,2]. 为避免多模态中可能出现的运动伪影和光损伤, 一种有效策略是使用单一超快激光作为激发源, 并配备多个检测通道来观测来自不同非线性相互作用所产生的信号^[3-7]. 然而, 每种成像模态对超快激光光源参数 (如波长、脉宽、重复频率) 的要求不尽相同, 难以独立优化. 传统 MPM 系统依赖钛宝石飞秒

* 国家自然科学基金 (批准号: 92250307, 62227822, 62175255) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: guoqing.chang@iphy.ac.cn

‡ 通信作者. E-mail: xuep@tsinghua.edu.cn

†† 通信作者. E-mail: jingg@tsinghua-sz.org

激光器 (720—950 nm), 但其波长范围难以覆盖生物组织的第二透射窗口 (1000—1350 nm) 与第三透射窗口 (1600—1750 nm). 当激发光脉冲的中心波长位于第二、第三透射窗口时, 由于散射和吸收而导致的光损耗减弱, 因此可显著提升成像深度与信噪比^[8-12]. 为了覆盖多个波长的透射窗口, 主流扩展波长方法为采用光学参量振荡器, 将近红外波段光脉冲转换为波长可大范围 (>600 nm) 调谐的飞秒脉冲, 但该系统存在系统负责、体积大和成本高等不足^[13]. 另一种方案是利用特种光纤产生超连续谱, 但经滤波后所产生的脉冲能量仅有 0.1—1 nJ, 难以用来产生足够信噪比的多光子激发信号^[14-18]. 近年来, 基于自相位调制光谱选择技术 (self-phase modulation enabled spectral selection, SESS) 的光纤飞秒光源, 因其结构紧凑、波长灵活调谐的特性受到关注. 该技术利用非线性光纤中自相位调制主导的光谱展宽效应, 生成多个分离的光谱波瓣, 通过合适的滤波片选择最左边或者最右边光谱旁瓣, 即可获得波长大范围调谐 (>400 nm) 的近变换极限飞秒脉冲. 2016 年, Liu 等^[19] 首次提出 SESS, 他们将掺镱超快光纤激光产生的超短脉冲耦合到光子晶体光纤中获得了波长在 825—1210 nm 之间调谐的 100 fs 脉冲, 能量超过 1 nJ. 2017 年, 他们^[20] 首次采用由 SESS 产生的 1080 nm 飞秒脉冲驱动 MPM, 实现了对人体皮肤组织的二倍频 (second-harmonic generation, SHG)、三倍频 (third-harmonic generation, THG) 成像. 2019 年, Chung 等^[21] 将 SESS 技术与掺铒超快光纤激光相结合, 获得了能量高达 10 nJ 的 100 fs 脉冲, 其中心波长在 1150—1350 nm 之间可连续调谐. 该光源用于离体人体皮肤组织的多倍频成像, 研究了不同激发波长对成像深度的影响. 同年, Chung 等^[22] 还发展了多模态 MPM 系统, 该系统由一个高功率掺铒超快光纤激光泵浦源、两个非线性波长转换器 (即倍频模块和 SESS 模块) 和一台扫描显微镜组成. 倍频模块和 SESS 模块将掺 Er 超快光纤激光产生的 1550 nm 飞秒脉冲转换为波长分别在 775 nm 和 1250 nm 的飞秒双色脉冲. 这种双色飞秒光源驱动的 MPM 能够激发人类皮肤组织中的内源性双光子激发荧光 (two-photon excitation fluorescence, TPEF), SHG 和 THG 信号^[22]. 然而, 现有依赖单一泵浦波长的 SESS 方案仍然无法同时覆盖三个生物透射窗口, 本文针对上述挑战, 提出

一种双波长泵浦 SESS 光源架构, 首次实现了中心波长可以在 800—1650 nm 之间调谐的飞秒脉冲输出, 波长调谐范围超过了一个倍频程. 我们使用此光源驱动 MPM, 实现对多种生物医学样品的多模态成像, 包括 TPEF、三光子激发荧光 (three-photon excitation fluorescence, TrPEF), SHG 和 THG 四种成像模态. 尤其是成功地实现了对正常、癌变和萎缩性胃炎的胃组织的无标记成像, 通过与对应区域的苏木精伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 的明场图像对比, 我们发现两者在宏观结构与细胞尺度上的高度一致, 这不仅验证了辅以新型驱动光源 MPM 的成像性能, 还揭示了其有望具备对临床组织样本的快速病理诊断能力.

2 实验装置

2.1 超倍频程波长可调谐飞秒光源

图 1 展示了我们搭建的 MPM 实验装置. 整个系统由波长可调谐飞秒驱动光源和扫描显微镜构成. 飞秒驱动光源主要分为三个部分: 双波长激光前端、1040 nm 脉冲驱动 SESS 和 1550 nm 脉冲驱动 SESS. 其中, 双波长激光前端包含全光纤掺铒光纤振荡器、掺铒光纤放大器、输出耦合器和高非线性光纤 (highly nonlinear fiber, HNLF). 掺铒光纤振荡器产生中心波长为 1560 nm、重复频率为 33 MHz 的种子脉冲. 种子脉冲的平均功率被预放大至 60 mW, 脉冲宽度则通过标准 PM1550 光纤压缩到 33 fs. 压缩后, 脉冲经 95/5 的输出耦合器, 95% 的能量都被耦合到 HNLF 中用于展宽光谱, 使其短波长一侧延伸至 1040 nm. 随后, 此 1040 nm 附近的光谱成分先经掺铒光纤啁啾脉冲放大 (chirped-pulse amplification, CPA) 系统放大, 再经衍射光栅对压缩, 最终产生中心波长为 1036 nm、脉冲能量为 120 nJ 的 175 fs 脉冲. 此脉冲的光谱和相应的自相关曲线如图 2(a) 和图 2(b) 所示. 其中, 红色实线表示实验测得的自相关曲线, 而黑色虚线代表由 1040 nm 输出光谱计算出的变换极限脉冲所对应的理想自相关曲线. 由于此光谱成分在 HNLF 中积累了无法被衍射光栅对补偿的高阶色散, 实际自相关曲线有着略宽于理想情况的主峰和略长的边带.

为实现 SESS, 我们将脉冲耦合到一段 4.3 cm 的光子晶体光纤 (NL-1050-ZERO-2) 中进一步

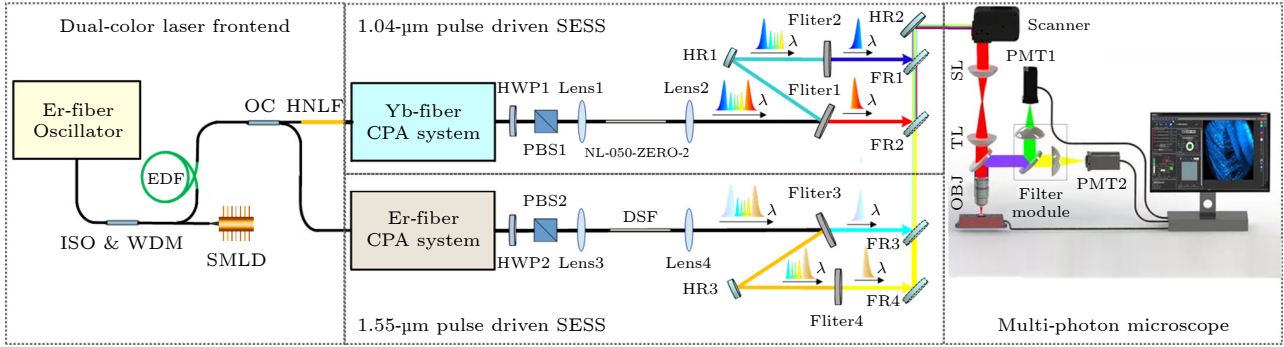


图 1 基于双波长泵浦 SESS 光源的多光子显微镜实验装置. ISO, 光隔离器; WDM, 波分复用器; EDF, 掺铒光纤; SMLD, 半导体激光二极管; OC, 输出耦合器; HNLf, 高非线性光纤; CPA, 啁啾脉冲放大; HWP, 半波片; PBS, 偏振分束器; HR, 高反射镜; SL, 扫描透镜; TL, 管镜; OBJ, 物镜; PMT: 光电倍增管

Fig. 1. Schematic setup of the multi-photon microscopy driven by dual-color laser enabled SESS source. ISO, isolator; WDM, wavelength-division multiplexing; EDF, erbium-doped fiber; SMLD, semiconductor laser diode; OC, output coupler; HNLf, highly nonlinear fiber; CPA, chirped-pulse amplification; HWP, half-wave plate; PBS, polarization beam splitter; HR, high reflectance mirror; SL, scan lens; TL, tube lens; OBJ, objective lens; PMT, photomultiplier tube.

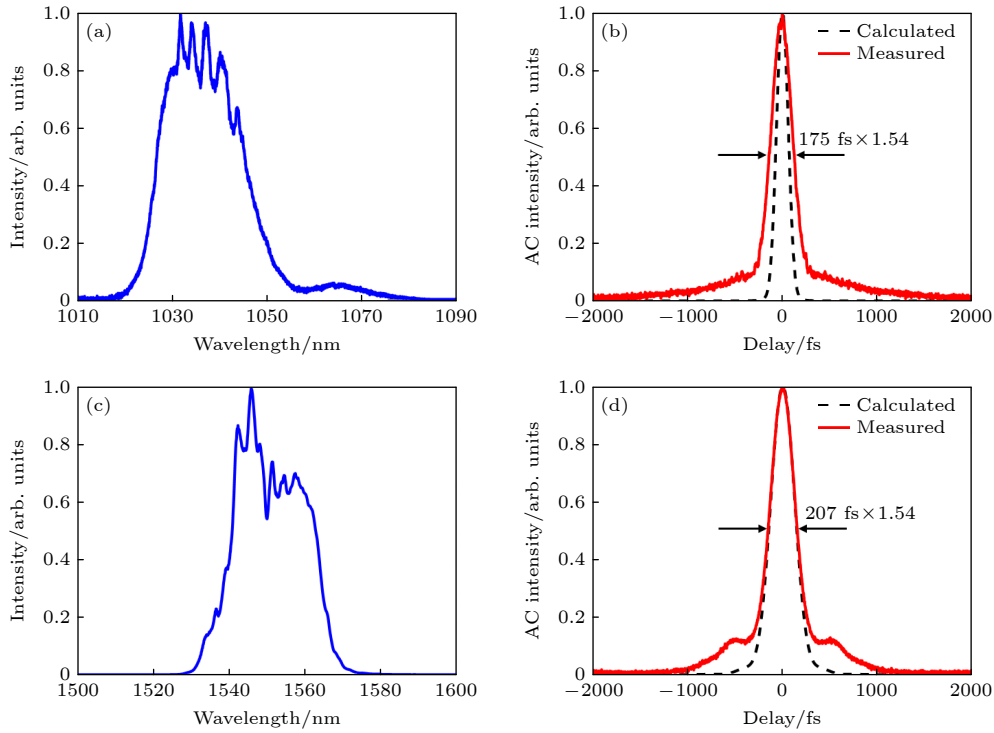


图 2 双波长激光放大后的光谱和自相关轨迹 (a) 1040 nm 分支的输出光谱; (b) 测量的自相关曲线 (红色) 和计算的自相关曲线, 对应由 1040 nm 输出光谱 (黑色) 计算出的变换极限脉冲; (c) 1550 nm 分支的输出光谱; (d) 测量的自相关曲线 (红色) 和计算的自相关曲线, 对应由 1550 nm 输出光谱 (黑色) 给出的变换极限脉冲

Fig. 2. Spectrum and corresponding autocorrelation of the dual color source after CPA: (a) 1040 nm branch output spectrum; (b) measured autocorrelation trace (red) and calculated autocorrelation trace corresponding to the transform-limited pulse given by the 1040 nm output spectrum (black); (c) 1550 nm branch output spectrum; (d) measured autocorrelation trace (red) and calculated autocorrelation trace corresponding to the transform-limited pulse given by the 1550 nm output spectrum (black).

展宽光谱. 得益于其 $2.2 \mu\text{m}$ 的小模场直径和 $850\text{--}1250 \text{ nm}$ 波段内低而平坦的色散曲线, 展宽光谱的两端形成了相对独立的光谱波瓣. 在光纤输出端使用合适的光学滤波片滤出光谱最左和最右的波瓣, 可获得近变换极限的飞秒脉冲, 并且可以通过改变

耦合到光子晶体光纤中的脉冲能量来连续调节滤出脉冲的中心波长. 图 3(a) 绘制了滤波后的最左/右侧的光谱波瓣. 随着耦合入光纤的脉冲能量从 2.67 nJ 增加至 10 nJ , 滤出脉冲的峰值波长可覆盖 $800\text{--}1200 \text{ nm}$ 的调谐范围. 图 3(a) 中的蓝色虚线

表示每个滤出光谱波瓣对应的脉冲能量. 最右侧的光谱波瓣的峰值波长为 1200 nm, 对应的脉冲能量为 2 nJ.

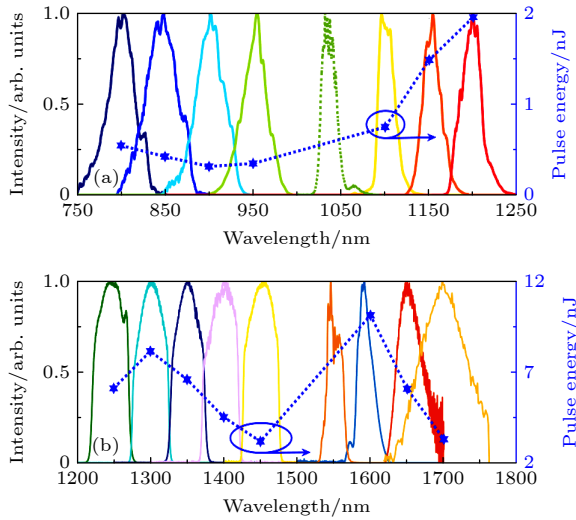


图 3 滤波得到的最左/最右的光谱波瓣和相应的脉冲能量 (a) 由 4.3 cm 的 HNLF (NL-1050-ZERO-2) 输出的滤波后光谱和相应的脉冲能量; (b) 由 9.5 cm 的 DSF 输出的滤波后光谱和相应的脉冲能量

Fig. 3. Filtered leftmost/rightmost spectral lobes and the corresponding pulse energy: (a) Filtered spectrum and the corresponding pulse energy from 4.3 cm HNLF (NL-1050-ZERO-2); (b) filtered spectrum and the corresponding pulse energy from 9.5 cm DSF.

在双波长激光前端输出耦合器的另一端, 5% 能量的 1550 nm 脉冲直接由掺铒光纤的 CPA 系统放大. 经衍射光栅对压缩后, 可产生脉冲能量为 160 nJ 的 207 fs 脉冲, 图 2(c) 和图 2(d) 显示了此脉冲的光谱和自相关曲线. 由于未经过 HNLF, 1550 nm 脉冲的实际自相关曲线主峰 (图 2(d) 红色实线) 与理想自相关曲线 (图 2(d) 黑色虚线) 完全贴合, 其边带也远窄于 1040 nm 脉冲 (图 2(b) 红色实线). 然后, 将此 1550 nm 脉冲耦合到一段 9.5 cm 长的色散位移光纤 (dispersion-shifted fiber, DSF) 中, 其模场直径为 9.4 μm . 图 3(b) 绘制了 1550 nm 脉冲驱动 SESS 的实验结果, 其中蓝色虚线表示每个滤出的光谱波瓣的脉冲能量. 通过调节耦合入 DSF 的能量, 滤出脉冲的峰值波长可从 1280 nm 调谐到 1655 nm. 由于该 DSF 的模场直径比光子晶体光纤 NL-1050-ZERO-2 大得多 (9.4 μm 对 2.2 μm), 因此 1550 nm 脉冲驱动 SESS 的输出脉冲能量比由 1040 nm 脉冲驱动的 SESS 高一个数量级. 最右侧的光谱波瓣峰值波长为 1600 nm, 对

应的最大脉冲能量为 10.1 nJ. 值得注意的是, 虽然不同调谐波长下的输出脉冲能量不同, 但其均位于多光子成像所需的能量范围内. 配合可自由调节的能量衰减和多光子显微镜探测器的灵敏度, 该能量差异性不会对成像效果有实质影响.

2.2 扫描显微镜

多光子成像实验装置的扫描显微镜部分如图 1 右侧所示. 显微镜主体由扫描单元、中继透镜组、成像物镜和收集模块构成. SESS 光源输出的光束首先通过谐振镜频率高达 8 kHz 的共振扫描仪 (LSKGR08, Thorlabs) 进行扫描, 然后经扫描透镜 (SL50-2 P2, Thorlabs) 和管镜 (TL200-2P2, Thorlabs) 扩束 4 倍并引导至成像物镜. 物镜采用适合多光子成像的高数值孔径 (numerical aperture, $NA = 1.05$) 水浸物镜 (XLPLN25XWMP2, Olympus), 其将飞秒脉冲聚焦到生物样品上, 并收集激发的非线性信号. 非线性信号被双色镜 (F665-Di02-25 \times 36, Semrock) 反射到一个可更换的双通道滤波模块中, 进而由相应的光电倍增管 (photomultiplier tube, PMT, H10770PA-40, Hamamatsu) 采集. 每个滤波模块都包含可拆卸的双色镜和带通滤波片, 根据具体样品激发信号的波段组合出不同的滤波模块. 考虑到 PMT 对环境光高度敏感, 操作过程中, 整个扫描显微镜都被置于黑暗的环境. 除此之外, PMT 的电压输出端也连接了一个截止频率为 1 MHz 的电子低通滤波器, 用于降低图像的高频噪声. 在保证图像分辨率的前提下, 此扫描显微镜最快可实现 512 pixel \times 512 pixel, 30 frames/s 的“视频级”图像帧率. 因谐振镜的最大光学扫描角限制在 $\pm 5^\circ$ 内, 此显微镜的成像视场最大为 800 $\mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$.

3 实验结果

为验证所搭建光源驱动 MPM 的成像能力, 我们使用此系统不同波长的输出脉冲对多个生物样本进行成像测试, 从倍频、多光子荧光以及多模态三个方面验证此系统的成像性能. 成像均为强度图像, 统一用绿色表示 SHG 模态, 紫红色代表 THG 模态, 黄色表示 TPEF 模态, 以及蓝色代表 TrPEF 模态.

3.1 双波长泵浦 SESS 光源驱动倍频及荧光成像

考虑到更长波段的激光对散射明显的组织有更大的穿透深度, 首先使用 1300 nm 的脉冲对两个形态不规则且有一定厚度的样本进行了倍频成像实验, 如图 4(a) 和图 4(b) 所示, 视场均为 $800\ \mu\text{m}\times 800\ \mu\text{m}$. SHG 的信号收集波段为 625—675 nm (#84-786, Edmund Optics), THG 的信号收集波段为 400—450 nm (#86-949, Edmund Optics). 图 4(a) 为新鲜土豆的 SHG/THG 双模态成像结果. THG 信号源于组织中的折射率突变处, 因此可显示土豆块茎中的薄壁细胞轮廓. 而通过激发 SHG, 我们也可以清晰地观察到薄壁细胞中贮藏的淀粉颗粒, 中部的淀粉颗粒则因不在同一成像深度而显得比较黯淡. 图 4(b) 为新鲜的人类胃部活检组织的 SHG 成像结果. 胃黏膜下层丰富的胶原纤维激发了强烈的 SHG 信号, 图像中清楚地显示了多个胶原纤维平行排列并交织后形成的胶原

纤维束 (白色箭头). 除了胃黏膜下层, 胃腺周边也分布着胶原纤维, 如图 4(c) 所示. 图 4(c) 为人类胃部 H&E 染色切片的 SHG/THG 成像结果, 视场 $500\ \mu\text{m}\times 500\ \mu\text{m}$. 图中所示为胃部黏膜层, 明亮的 SHG 信号展示了围绕胃腺的胶原纤维 (黄色箭头), THG 信号则显示了胃腺细胞的细胞核.

相较于胶原纤维和细胞核, 组织和细胞形态是更普遍有效的图像信息, 这通常由荧光模态提供. 与 SHG/THG 不同, 荧光成像涉及荧光物质的吸收截面. 常见生物荧光物质的吸收峰都小于 500 nm, 因此将 SESS 脉冲的输出波长调至 900—1000 nm 的范围以保证最佳的 TPEF 成像效果. 图 4(d) 是绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 标记后的神经元 TPEF 图像, 视场 $117\ \mu\text{m}\times 117\ \mu\text{m}$. TPEF 由 950 nm 脉冲激发, 信号收集波段为 525—575 nm (#84784, Edmund Optics), 可以清晰呈现神经细胞及其突触的形态. 值得注意的是, 无标记 TPEF 成像也能清晰展现细胞形态. 细胞质普遍含有黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD), FAD 在 950 nm 脉冲的激发下同样能自发辐射出 500—600 nm 的双光子荧光.

图 5 为不同类型胃黏膜的无标记 TPEF 成像结果和相应的 H&E 染色明场图像, 同样由 950 nm 脉冲激发, 视场均为 $288\ \mu\text{m}\times 288\ \mu\text{m}$. 所有切片都经过了脱蜡和烤片的工序, 以避免石蜡和褶皱的影响. H&E 染色切片是组织病理学的黄金标准. 通过对比, 能快速验证双波长泵浦 SESS 光源驱动 MPM 的成像效果. 我们发现, 无论是宏观组织结构还是微观细胞形态, 无标记 TPEF 图像与 H&E 图像都具备高度的一致性. 如图 5(a) 和图 5(d) 所示, 正常胃腺的细胞核 (红色箭头) 形态均一旦大小类似. 在 H&E 图像 (图 5(d)) 中, 可观察到细胞核呈紫色椭圆边缘内含一个紫色小点, 即核仁. 其在 TPEF 图像 (图 5(a)) 中也能看到完全相同的结构; 炎症免疫细胞 (橙色箭头) 在 H&E 图像 (图 5(d)) 中体积小且染色深, 在 TPEF 图像 (图 5(a)) 中也表现为小而强烈的亮斑. 对于胃癌样本, H&E 图像 (图 5(e)) 中大体积且深染色的细胞核 (蓝色箭头) 和 TPEF 图像 (图 5(b)) 中大体积亮斑表现一致. 对于萎缩性胃炎组织, 因局部肠化生形成的杯状细胞 (绿色箭头) 在 H&E (图 5(f)) 和 TPEF (图 5(c)) 图像中也呈现出相同的特征.

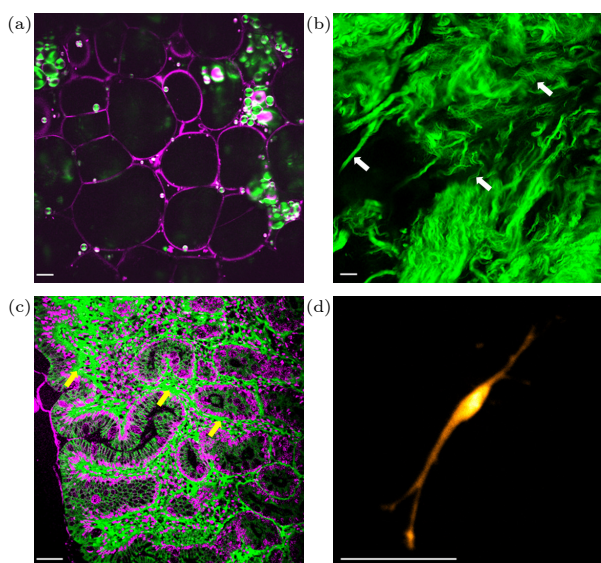


图 4 双波长泵浦 SESS 光源驱动的多光子显微镜的倍频及荧光成像结果 (a) 土豆块茎的 SHG/THG 图像; (b) 人类胃部活检组织 SHG 图像; (c) 人类胃部 H&E 染色切片 SHG/THG 图像; (d) 人类神经细胞 TPEF 图像. 白色箭头: 胶原纤维束; 黄色箭头: 胶原纤维. 比例尺: $50\ \mu\text{m}$

Fig. 4. Harmonic generation and fluorescence imaging based on multiphoton microscope driven by dual-color laser enabled SESS source: (a) SHG/THG image of potato tuber; (b) SHG image of human gastric biopsy tissue; (c) SHG/THG image of a H&E-stained section of human gastric tissue; (d) TPEF image of a human neuron. White arrows: collagen bundles; yellow arrows: collagen fibers. Scale bar: $50\ \mu\text{m}$.

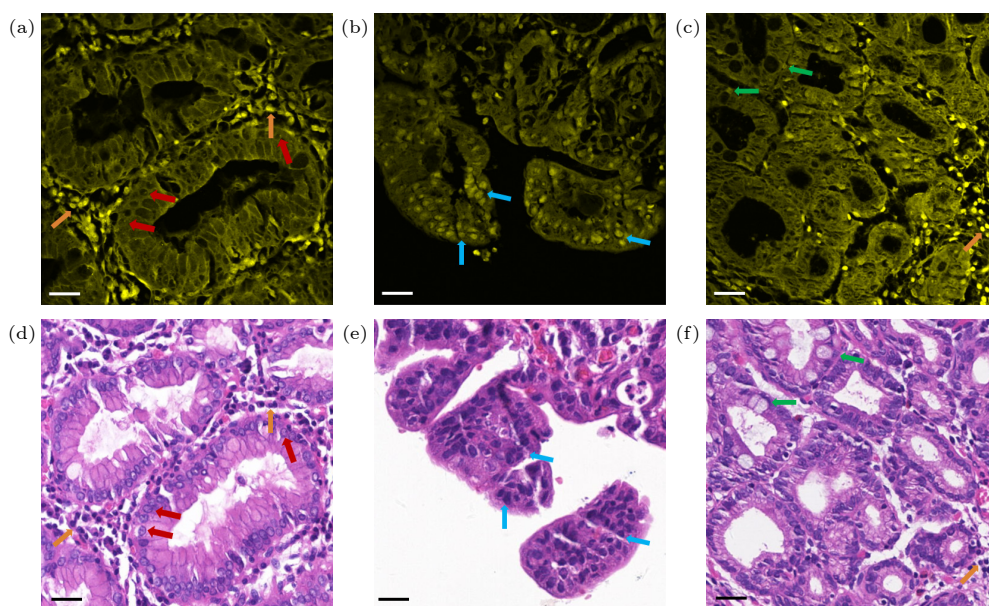


图 5 不同类型胃黏膜的双光子成像结果和相应的 H&E 染色图像 (a) 正常胃黏膜的 TPEF 图像; (b) 胃癌的 TPEF 图像; (c) 萎缩性胃炎的 TPEF 图像; (d) 正常胃黏膜的 H&E 染色图像; (e) 胃癌的 H&E 染色图像; (f) 萎缩性胃炎的 H&E 染色图像. 红色箭头: 正常胃黏膜上皮细胞核; 橙色箭头: 炎症细胞; 蓝色箭头: 癌变胃黏膜上皮细胞核; 绿色箭头: 杯状细胞核. 比例尺: 30 μm

Fig. 5. TPEF images and corresponding H&E-stained images of different gastric mucosa: (a) TPEF image of normal gastric mucosa; (b) TPEF image of gastric carcinoma, (c) TPEF image of atrophic gastritis; (d) H&E-stained image of normal gastric mucosa; (e) H&E-stained image of gastric carcinoma; (f) H&E-stained image of atrophic gastritis. Red arrows: normal gastric epithelial cell nuclei; orange arrows: inflammatory cells; blue arrows: cancerous gastric epithelial cell nuclei; green arrows: goblet cell nuclei. Scale bar: 30 μm .

3.2 双波长泵浦 SESS 光源驱动多模态 MPM 成像

在 3.1 节中, 单个 TPEF 模态即可获取媲美 H&E 染色切片的成像效果, 组合多个成像模态势必能提供更加全面的信息. 2019 年, Boppart 等^[23]提出了无标记自发荧光多倍频显微镜技术 (simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy, SLAM): 利用约 1110 nm 的飞秒脉冲, 可同时激发无标记样本内的 SHG 和 THG, 以及内源性荧光团提供的 TPEF 和 TrPEF 信号. 因此, 将双波长泵浦 SESS 系统的输出波长调至 1100 nm, 验证其驱动 TPEF/SHG/TrPEF/THG 四模态的成像能力. 其中, TPEF 模态的收集波段为 575—625 nm (#84785, Edmund Optics), SHG 模态的收集波段是 545—555 nm (#65159, Edmund Optics), TrPEF 模态收集波段是 425—475 nm (#84782, Edmund Optics), THG 模态的收集波段则为 350—400 nm (#12096, Edmund Optics).

图 6 是人体肠腺癌组织的 TPEF/SHG/TrPEF/THG 四模态成像结果. 由 TPEF 图可以清晰地看到正常的腺体 (白色箭头) 和发生腺癌的部分 (白

色虚线). 正常的腺体形态规则且极性相同, 周边因炎症而存在免疫细胞 (红色箭头). THG 模态还能看到其隐窝中充满了杯状细胞分泌的黏液 (蓝色箭头), 这一点对应的 H&E 图像完全无法体现. 腺癌部分则完全看不见隐窝的结构, 极性杂乱且杯状细胞完全消失. 受腺癌影响, 整个图像区域的胶原纤维含量显著减少, SHG 主要源于同时有倍频和荧光信号的弹性蛋白, 导致其与 TPEF 图像较为相似. TrPEF 则主要源于还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), 因此物质同样广泛存在于细胞质中, 故 TrPEF 与 TPEF 两模态亦较为接近.

图 7 为人类肝细胞癌组织的 TPEF/SHG/TrPEF/THG 四模态成像结果. 图 7 中显示的是肝的门管区, 主要由相邻肝小叶间的结缔组织构成. THG 模态勾勒出了整张切片的边缘. TPEF 模态 (图 7(a)) 能展现结缔组织及周边肝小叶的完整形态. 图像左侧能观察到门管区常见的伴行管道小叶间静脉 (紫色箭头). 右侧能看到肝小叶中的肝索 (白色虚线), 即排列成板层状的肝细胞的断面. 相邻肝索的间隙代表肝血窦 (白色箭头), 部分肝血窦中可以看到巨噬细胞 (蓝色箭头). 而在 SHG 模

态 (图 7(c)) 中, 仅有结缔组织 (红色箭头) 因富含胶原纤维而产生了强烈的信号. 相较于 H&E 图像,

能更清晰地划分出右侧正常 (蓝色虚线) 和左侧细胞癌变 (红色虚线) 的肝小叶区域.

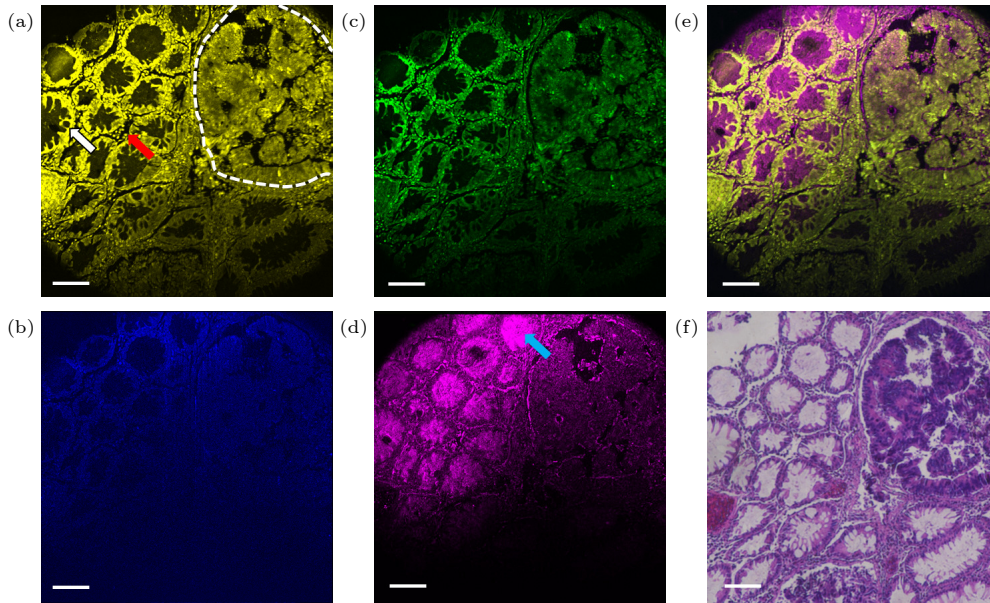


图 6 肠腺癌组织的多模态成像结果 (a) TPEF 图像; (b) TrPEF 图像; (c) SHG 图像; (d) THG 图像; (e) TPEF/SHG/TrPEF/THG 叠加图像; (f) 相应的 H&E 图像. 白色箭头: 肠腺; 红色箭头: 炎症细胞; 蓝色箭头: 杯状细胞分泌的黏液; 白色虚线: 癌变区域. 比例尺: 100 μm

Fig. 6. Multimodal imaging of intestinal adenocarcinoma tissue: (a) TPEF image; (b) TrPEF image; (c) SHG image; (d) THG image; (e) merging of TPEF/SHG/TrPEF/THG images; (f) corresponding H&E-stained image. White arrow: intestinal glands; red arrow: inflammatory cells; blue arrow: mucus secreted by goblet cells; white dotted line: cancerous area. Scale bar: 100 μm .

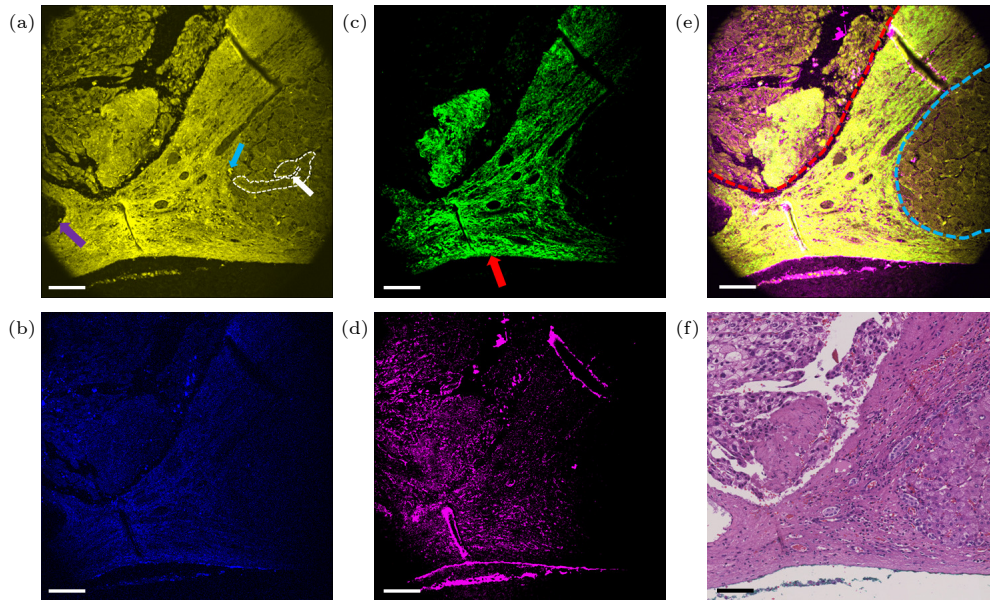


图 7 肝细胞癌组织的多模态成像结果 (a) TPEF 图像; (b) TrPEF 图像; (c) SHG 图像; (d) THG 图像; (e) TPEF/SHG/TrPEF/THG 叠加图像; (f) 相应的 H&E 图像. 白色箭头: 肝血窦; 蓝色箭头: 巨噬细胞; 紫色箭头: 小叶间静脉; 红色箭头: 结缔组织; 白色虚线: 肝索; 蓝色虚线: 正常肝小叶; 红色虚线: 癌变区域. 比例尺: 100 μm

Fig. 7. Multimodal imaging of hepatocellular carcinoma tissue: (a) TPEF image; (b) TrPEF image; (c) SHG image; (d) THG image; (e) merging of TPEF/SHG/TrPEF/THG images; (f) corresponding H&E-stained image. White arrow: hepatic sinusoid; blue arrow: macrophage; purple arrow: interlobular vein; red arrow: connective tissue; white dotted line: hepatic cords; blue dotted line: normal hepatic lobule; red dotted line: cancerous area. Scale bar: 100 μm .

4 结 论

本文成功地开发了一种基于 SESS 技术的超快光源系统, 通过创新性地结合 1040 nm 与 1550 nm 双泵浦通路, 首次实现 800—1650 nm 超宽谱连续调谐, 覆盖生物组织的第一、第二及第三透射窗口. 该光源在波长覆盖与能量效率上取得突破: 在 1600 nm 波段输出脉冲能量达 10.1 nJ, 较传统单波段 SESS 方案提升一个数量级; 双波长 SESS 将调谐范围扩展至典型单波段系统的 2 倍. 基于此光源的多光子显微系统在生物成像中展现出显著优势: 单模态 TPEF 图像与 H&E 染色切片在胃组织细胞核形态、炎症分布等特征上高度一致; 而四模态 SLAM 成像 (SHG/THG/TPEF/TrPEF) 可同步揭示肠腺癌的黏液分泌、胶原减少及肝癌免疫微环境变化, 提供超越 H&E 的多维病理信息. 相较于已有光源, 该系统体积更小, 能量效率更高. 当前工作的局限性在于部分自由空间光路设计, 未来需发展全光纤集成架构以提升稳定性, 并结合自适应光学与人工智能算法, 推动该技术在术中实时活检及癌变区域自动分割中的临床应用.

参考文献

- [1] Adur J, Carvalho H F, Cesar C L, Casco V H 2014 *Cancer Inf.* **13** 67
- [2] Perry S W, Burke R M, Brown E B 2012 *Ann. Biomed. Eng.* **40** 277
- [3] You S, Tu H, Chaney E J, Sun Y, Zhao Y, Bower A J, Liu Y, Marjanovic M, Sinha S, Pu Y, Boppart S A 2018 *Nat. Commun.* **9** 2125
- [4] Huang S H, Heikal A A, Webb W W 2002 *Biophys. J.* **82** 2811
- [5] 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
- [6] Chu S, Chen I, Liu T, Cheng P, Sun C, Lin B 2001 *Opt. Lett.* **26** 1909
- [7] Zhang H, Chen Y, Cao D, Wang Y, Zhang Y, Zhao J 2021 *Biomed. Opt. Express* **12** 1308
- [8] Sordillo L A, Pu Y, Pratavieira S, Budansky Y, Alfano R R 2014 *J. Biomed. Opt.* **19** 056004
- [9] Shi L, Sordillo L A, Rodríguez-Contreras A, Alfano R 2016 *J. Biophotonics* **9** 38
- [10] Wang K, Horton N G, Charan K, Mirocha J D, Gaeta A L 2013 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **20** 50
- [11] Ouzounov D G, Wang T, Wang M, Feng D D, Horton N G, Cruz-Hernández J C, Cheng Y T, Reimer J, Tolias A S, Nishimura N, Xu C 2017 *Nat. Methods* **14** 388
- [12] Horton N G, Wang K, Kobat D, Clark C G, Wise F W, Schaffer C B, Xu C 2013 *Nat. Photonics* **7** 205
- [13] Buttolph M L, Mejjooli M A, Sidorenko P, Eom C Y, Schaffer C B, Wise F W 2022 *Opt. Lett.* **47** 545
- [14] Travers J 2010 *J. Opt.* **12** 113001
- [15] Liu Y, Tu H, Benalcazar W A, Boppart S A 2011 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **18** 1209
- [16] Tu H, Liu Y, Turchinovich D, Marjanovic M, Lyngsø J K, Lægsgaard J, Chaney E J, Zhao Y, You S, Wilson W L, Xu B, Dantus M, Boppart S A 2016 *Nat. Photonics* **10** 534
- [17] Dudley J M, Genty G, Coen S 2006 *Rev. Mod. Phys.* **78** 1135
- [18] Birks T, Wadsworth W, Russell P S J 2000 *Opt. Lett.* **25** 1415
- [19] Liu W, Li C, Zhang Z, Kärtner F X, Chang G Q 2016 *Opt. Express* **24** 15328
- [20] Liu W, Chia S H, Chung H Y, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2017 *Opt. Express* **25** 6822
- [21] Chung H Y, Liu W, Cao Q, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2019 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **25** 6800708
- [22] Chung H Y, Greinert R, Kärtner F X, Chang G Q 2019 *Biomed. Opt. Express* **10** 514
- [23] Boppart S A, You S, Li L H, Chen J, Tu H 2019 *APL Photonics* **4** 100901

Multiphoton microscopy imaging system driven by dual-wavelength-pumped self-phase modulation spectral selection*

CHEN Runzhi¹⁾²⁾ WANG Xiaoying³⁾ ZHANG Lihao⁴⁾ LIU Yang⁴⁾
 WU Jihua⁵⁾ DIAO Xincai⁴⁾ ZHANG Di⁶⁾ LI Lianyong³⁾
 CHANG Guoqing^{4)†} XUE Ping^{2)‡} JING Gang^{7)††}

1) (*Innovation Center for Laser Medical Instruments, Shenzhen Tsinghua University Research Institute, Shenzhen 518057, China*)

2) (*Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

3) (*Department of Gastroenterology, The Ninth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100101, China*)

4) (*Key Laboratory of Superconductivity, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

5) (*Department of Pathology, The Ninth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100101, China*)

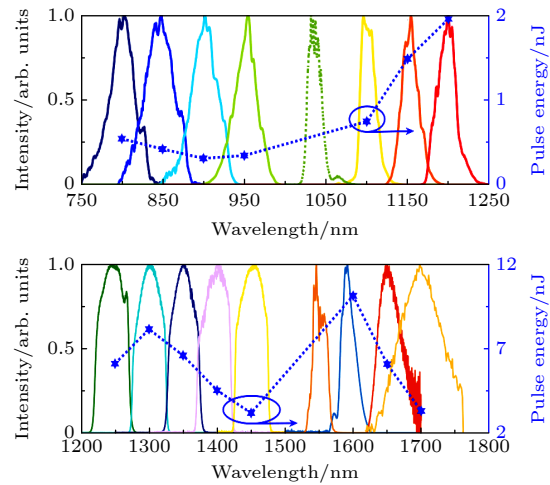
6) (*Department of Internal Medicine, Jingyuan County People's Hospital, Guyuan 756400, China*)

7) (*Shenzhen Key Laboratory of Opto-Mechatronics, Shenzhen Tsinghua University Research Institute, Shenzhen 518057, China*)

(Received 8 August 2025; revised manuscript received 22 September 2025)

Abstract

Multiphoton microscopy (MPM) has become an essential research tool in biomedicine. Current MPM systems predominantly rely on Ti:sapphire lasers provided tunable femtosecond pulses at 720–950 nm. To access the second biological transparency window (1000–1350 nm), complex optical parametric oscillators are typically required. Furthermore, sources operating in the third biological transparency window (1600–1750 nm) are attracting significant attention for enhanced imaging depth. However, no ultrafast laser source simultaneously covering all three transparency windows exists, thus hindering the widespread application of MPM in life sciences. Here, we demonstrate a fiber-laser-based ultrafast source that generates four-color tunable pulses across 800–1650 nm, covering the full spectral range for multiphoton excitation. This source utilizes our proposed spectral selection technique via self-phase modulation (SESS). SESS ensures SPM-dominated spectral broadening, producing isolated spectral lobes. Filtering the outermost lobes will generate near-transform-limited pulses with broad wavelength tunability. Using this supercontinuum excitation source, we successfully realize label-free imaging of diverse biomedical specimens, validating the performance of MPM empowered by this novel driving source.



Keywords: multiphoton microscopy, wavelength-tunable femtosecond laser source, label-free imaging, pathological diagnosis

PACS: 42.55.Wd, 87.64.mn

DOI: 10.7498/aps.74.20251069

CSTR: 32037.14.aps.74.20251069

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 92250307, 62227822, 62175255).

† Corresponding author. E-mail: guoqing.chang@iphy.ac.cn

‡ Corresponding author. E-mail: xuep@tsinghua.edu.cn

†† Corresponding author. E-mail: jingg@tsinghua-sz.org

基于双波长泵浦自相位调制光谱选择驱动的多光子显微成像系统

陈润植 王晓英 张立昊 刘洋 吴继华 刁新财 张迪 李连勇 常国庆 薛平 敬刚

Multiphoton microscopy imaging system driven by dual-wavelength-pumped self-phase modulation spectral selection

CHEN Runzhi WANG Xiaoying ZHANG Lihao LIU Yang WU Jihua DIAO Xincan ZHANG Di LI Lianyong CHANG Guoqing XUE Ping JING Gang

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 74, 244206 (2025) DOI: 10.7498/aps.74.20251069

CSTR: 32037.14.aps.74.20251069

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.74.20251069>

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

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

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

物理学报. 2022, 71(10): 104204 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20212282>

基于色散管理的自相位调制光谱展宽滤波技术

Dispersion management dual-pass self-phase modulation-enabled spectral selection

物理学报. 2023, 72(9): 094205 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20230088>

基于高速相位型空间光调制器的双光子多焦点结构光显微技术

Two-photon multifocal structured light microscopy based on high-speed phase-type spatial light modulator

物理学报. 2021, 70(9): 098701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201797>

基于双波长飞秒光源的高功率2—5 μm 中红外超快激光

High-power 2 – 5 μm mid-infrared ultrafast laser based on dual-wavelength femtosecond light source

物理学报. 2025, 74(11): 114206 <https://doi.org/10.7498/aps.74.20250348>

基于分数阶螺旋相位片的定量相位显微成像

Quantitative phase microscopy imaging based on fractional spiral phase plate

物理学报. 2021, 70(15): 158702 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201884>

双端泵浦 Nd^{3+} 掺杂 $\text{MgO}:\text{LiNbO}_3$ 正交偏振双波长连续激光调控

Regulation of orthogonally polarized dualwavelength continuous wave laser based on double-end pumped Nd^{3+} doped $\text{MgO}:\text{LiNbO}_3$

物理学报. 2021, 70(18): 184203 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210449>