

深组织光片荧光显微成像研究进展(特邀)

周笑^{1,2,3}, 左超^{1,2,3**}, 刘永焘^{1,2,3*}¹南京理工大学电子工程与光电技术学院智能计算成像实验室(SCILab), 江苏 南京 210094;²南京理工大学江苏省光谱成像与智能感知重点实验室, 江苏 南京 210094;³南京理工大学智能计算成像研究院(SCIRI), 江苏 南京 210019

摘要 随着生物医学研究对复杂组织结构和功能的深入探索,高分辨率、高信噪比的深组织成像技术变得愈加重要。传统的显微镜技术往往局限于二维、透明的生物薄样本的观测,这在很大程度上无法满足当前生物医学领域对三维深组织成像的研究需求。光片荧光显微镜凭借其低光损伤、高采集速率、大视场、体成像等优点被生物学家广泛使用。然而,生物组织固有的高散射特性仍然为深层成像带来了巨大的挑战。本文重点介绍了光片荧光显微成像技术在深组织成像领域的最新进展,特别是应对高散射样本挑战的解决策略,旨在为相关领域的研究人员提供有价值的参考,助力其对该前沿技术的最新进展和应用前景的理解。首先,阐述了光片荧光显微镜的基本原理和高散射吸收特性的形成原因及影响;然后,进一步阐明了增加组织穿透深度、应对光散射和吸收等问题的最新进展;最后,探讨了具有大穿透深度和强抗散射能力的光片荧光显微成像技术的发展前景以及潜在应用。

关键词 荧光显微; 光片照明; 深组织成像; 三维成像; 光学散射

中图分类号 Q63

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232599

Advances in Deep-Tissue Light-Sheet Fluorescence Microscopic Imaging (Invited)

Zhou Xiao^{1,2,3}, Zuo Chao^{1,2,3**}, Liu Yongtao^{1,2,3*}¹Smart Computational Imaging Laboratory (SCILab), School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China;²Jiangsu Key Laboratory of Spectral Imaging & Intelligent Sense, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China;³Smart Computational Imaging Research Institute (SCIRI), Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210019, Jiangsu, China

Abstract As biomedical research delves deeper into the intricacies of tissue structure and function, the demand for high-resolution, high-signal-to-noise-ratio deep-tissue imaging technologies has become critical. Traditional microscopy, limited to two-dimensional, transparent thin biological samples, falls short in satisfying the current requirements for three-dimensional deep-tissue imaging in biomedical sciences. In contrast, light-sheet fluorescence microscopy distinguishes itself through its attributes—low photodamage, rapid acquisition, extensive field of view, and volumetric imaging—establishing it as a cornerstone among biologists. Despite these advantages, the intrinsic high-scattering characteristics of biological tissues pose formidable challenges to achieving deep imaging. This review focuses on recent progress in light-sheet fluorescence microscopy for deep tissue imaging, emphasizing strategies that overcome challenges associated with high-scattering samples, so as to provide valuable insights to researchers in related fields, assisting them in developing a preliminary comprehension of the latest innovations and future possibilities inherent in this cutting-edge technology. Firstly, the basic principles of light-sheet fluorescence microscopy and the causes and effects of high-scattering absorption characteristics are explained. Subsequently, recent progress in enhancing tissue penetration depth and addressing issues such as light scattering and absorption is further examined. Finally, the development prospects and potential applications of light-sheet fluorescence microscopy imaging technology with high penetration depth and anti-scattering ability are discussed.

Key words fluorescence microscopy; light-sheet illumination; deep tissue imaging; three-dimensional imaging; optical scattering

收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2023-12-16; 录用日期: 2023-12-20; 网络首发日期: 2023-12-26

基金项目: 国家自然科学基金(62275125)、国家重大科研仪器研制项目(62227818)、中央高校基本科研业务费专项(30922010313)

通信作者: *Yongtao.Liu@njjust.edu.cn; **zuocho@njjust.edu.cn

1 引言

光学显微镜自发明以来,已经历了几个世纪的发展历程。光学显微镜凭借其非接触性、低侵入性及多样化的成像机制,在近现代细胞学和生物学研究中发挥着卓越的作用,并展现出广泛的适用性^[1]。20 世纪 90 年代,随着基因编码荧光蛋白的出现,生物学家能够利用多种颜色的荧光蛋白标记生物体内的不同细胞,使荧光显微镜成为一种重要的成像工具^[2]。荧光显微镜具有高时空分辨率和对生物样本损伤小等特性,能够实现特定目标的精准成像。随着新型荧光探针的持续发现和研制,荧光显微成像技术得到了迅速推进并不断创新^[3],共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)、全内反射荧光显微镜以及多光子荧光显微镜等新型技术应运而生。

CLSM^[4]的出现,为三维活体样本的非侵入性成像提供了一种新的途径。然而,该技术利用逐点扫描的方式实现三维图像构建,焦点处的功率较高,导致严重的光漂白和光毒性等问题,并且采集速度较慢,不适合长时间的活体成像。此外,该方法在穿透深度方面有一定的局限性,且对样本的均匀性及低散射性有较高的要求。随着研究的不断深入,生物学家们不再局限于基础的生物样本,而是转向观测更为复杂的生命体,如组织器官等结构^[5],以及整个胚胎发育的实时动态过程。

在这一背景下,光片荧光显微镜(LSPM),也称为选择平面照明显微镜(SPIM),成为应对现代生物学中成像挑战的关键技术之一^[6]。尽管光片显微镜已经存在一个多世纪了,但直到 2004 年才被发展为适用于现代生物学的成像技术^[7]。该技术通过照明与探测正交的方式实现三维图像采集,与传统荧光显微成像技术相比,它只激发焦点处的荧光,有效减少了离焦荧光信号的干扰,从而降低了光漂白与光毒性。此外,采用片状光一次性照亮整个平面,能够快速捕获大量数据,光片荧光显微镜的低光毒性与高采集速率使其特别适合追踪活体样本的动态过程。目前,光片荧光显微成像技术已经具备光损伤低、采集速度快、成像视场大等优势,然而,在进行如大脑或心脏的厚层切片和肿瘤组织等高散射生物样本的观测时,其内部的复杂结构和光学异质性导致光片在样品内产生严重的散射与吸收,进而引起图像模糊或失真。因此,提升光片荧光显微镜在减弱散射与穿透深层组织方面的能力,是当前研究亟需解决的关键难题。

本文旨在阐述光片荧光显微成像技术在深组织成像研究中面临的主要挑战,并介绍了应对高散射和提高成像深度的解决方案。首先,介绍光片荧光显微成像的基本原理,分析高散射与吸收的成因及其对成像的影响。然后,从多个角度介绍现有的几种提高穿透

深度和应对样品散射挑战的技术,包括激发光调制、多视图融合、非线性效应、波前整形及样品处理等。最后,展望具有高穿透深度、强抗散射能力的光片荧光显微镜在生物学研究中的发展前景。

2 光片荧光显微成像原理及高散射与吸收成因

2.1 光片荧光显微成像原理

图 1(a)所示为光片荧光显微镜的基本结构。激光从一侧对样品进行照明激发,采用与照明光路垂直的光路探测荧光,与传统的荧光显微成像技术相比,光片荧光显微镜具有两个主要优势。首先,该技术提供了固有的光学切片,仅在样本内部的薄层区域激发荧光,显著降低了光漂白与光毒性,同时有效减少了离焦信号和背景噪声,极大地提升了成像质量。相比之下,共聚焦显微镜作为传统荧光成像技术,将激光能量聚焦在样品内部一点,可获得良好的轴向分辨率和对比度,但长时间成像时光毒性与光损伤较大。其次,多光子显微镜利用非线性光学效应实现深部组织成像,虽然它能提供较强的组织穿透能力,但其采集速度通常不如光片显微镜。光片荧光显微镜能够一次性对整个平面成像,拥有极快的采集速度。与各种点扫描成像技术相比,光片独特的激发与探测结构赋予了光片荧光显微镜在活体生物样本长时间动态成像方面的显著优势。

光片荧光显微镜的照明光路主要用于光片的形成,其厚度决定了系统的光学切片能力,探测光路则决定了系统横向分辨率,并与光片厚度共同影响系统的轴向分辨率。因此,光片的性能对光片荧光显微镜的成像效果至关重要^[8]。如图 1(b)所示,常见的光片形成方法包括:1)由柱面透镜聚焦形成静态高斯光片。该方法是选择平面照明显微镜的标准照明方法,由于光片厚度通常为几微米到十几微米,系统的轴向分辨率受到制约。这种方法的优势在于能够提供低光毒性的照明条件,有助于长时间的活体成像^[9],但也存在一定的局限性,如进行三维体成像时,需要对样品进行轴向扫描或旋转,导致成像速度较慢,不利于捕获快速动态过程,同时,高斯光片光强在中心最高,向外逐渐减弱,可能导致不均匀照明,且对厚样品的成像深度有限。2)使用扫描振镜在物镜焦平面快速移动聚焦光束,形成动态的虚拟光片,该方法称为数字扫描光片显微镜(DLSM)^[10]。动态光片将其照明能量集中在单线上,相较于静态光片实现了更均匀的照明效果,并且扫描光束通常采用多种类型的无衍射光束,光片厚度可达亚微米级别,获得更高的轴向分辨率。此外,由于扫描的单线光束之间非相干,因此动态光片受散射的影响比静态光片小,其成像质量提高^[11],同时,利用高速扫描振镜使聚焦光束在样品上快速移动,并以每秒数百帧的速率连续捕获图像,获得更快的成像速度,从而

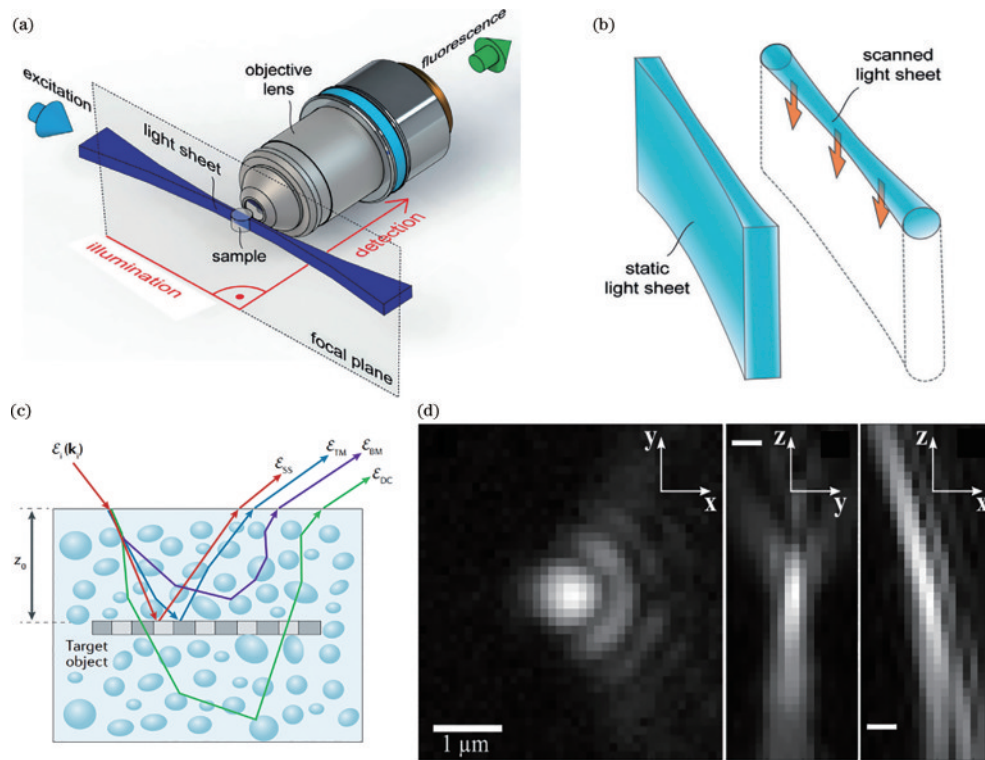


图 1 光片荧光显微成像原理图和散射成因及影响。(a)照明与探测结构^[25];(b)两种光片生成方式^[25];(c)光入射到 Z_0 处的散射情况^[17];(d)散射后荧光微球的三维 PSF^[20]

Fig. 1 Schematic of light sheet fluorescence microscopic imaging and scattering causes and effects. (a) Illumination and detection structure^[25]; (b) two modes of light sheet generation^[25]; (c) scattering of light incident to Z_0 ^[17]; (d) 3D PSF of fluorescent beads after scattering^[20]

在较短时间内覆盖更大的样本区域。采用该扫描光片生成方式时需要配合使用另一轴向的振镜扫描进行三维体成像,相比于静态高斯光束,该方式进一步加快了成像速度。为了进一步优化光片的性能,减小深组织成像中生物组织所带来的激发波前散射畸变,研究人员通过对光束振幅、相位、偏振或频率等进行调制,开发了多种类型的无衍射光束,例如贝塞尔光片^[12]、艾里光片^[13]以及晶格光片^[14]等。

2.2 高散射与吸收成因及影响

物理散射和吸收是影响光学显微成像的主要因素。散射通常由组织结构中的细胞和纤维等散射体引起,这些结构在光的传播路径上形成障碍,使光发生偏折和散射^[15-16],图 1(c)所示为光入射到深度为 Z_0 处的散射情况^[17],不同颜色的曲线代表光波在介质中遇到散射中心时的不同路径及相互作用。 ϵ_{SS} 曲线表示单次散射波,即光波在目标物体上只发生一次散射就到达探测器; ϵ_{TM} 和 ϵ_{BM} 曲线表示多次散射波,与样品的不同部分发生相互作用时经历了多次散射; ϵ_{DC} 曲线为无散射的参考波。同时,组织内的吸收发色团如血液中的血红蛋白、黑色素、水分以及其他色素会吸收部分光能,导致光强度衰减,影响成像深度和信号强度。光的散射与吸收共同作用,导致光在组织中的传播受阻,进而限制了光学显微镜的穿透深度,通

常仅能观察到组织表面几十到几百微米的范围^[18]。在特殊的生物样本如肿瘤细胞聚集物和大型生物组织切片等高散射样本中,不同细胞间折射率的差异会导致光在穿越样本时发生严重的光散射^[19],不仅引起光的传播方向混乱,产生光学像差,还会增加光片的厚度,进而影响整个样品点扩展函数(PSF)的质量。图 1(d)所示为 200 nm 直径的荧光微球的三维 PSF^[20],PSF 的畸变极大地限制了深层细胞或组织结构的成像清晰度。

尽管光片荧光显微镜在一定程度上能够实现深组织成像,但在高散射和吸收的生物样本观测时仍面临诸多挑战^[21]。光片荧光显微镜从侧面一次照亮整个平面,这种照明方式的缺点是所采集的数据中存在条纹伪影,图像质量下降,这也是由样品中散射和吸收引起的^[22]。散射会减弱焦点处的荧光信号,并且由散射发出的光子会在焦点体积外产生荧光,从而导致图像的对比度降低。在透明度较高的生物样本如斑马鱼胚胎中,样品散射产生的影响较小,可以在不透明化组织的情况下直接进行样本的快速成像^[23],而光片荧光显微镜最常见的用途为对胚胎和器官成像,这些样本往往是较厚且不均匀的散射样本。在密度更高且体积较大的生物样本如果蝇及小鼠大脑中,样品的不透明性削弱了光线的穿透能力,导致图像上出现严重的

伪影^[24]。为了解决光片荧光显微成像技术面临的样品高散射和吸收所引起的图像对比度降低的问题,可将核心设计原则扩展到多种方式。

3 主要技术进展

下面介绍光片显微镜在解决穿透深度浅以及光散射和吸收问题方面的最新进展。该类问题的基本解决方案是改变激发光^[26-28],例如使用更长波长的激发光 and 不同类型的无衍射光束;更直接的方法是从多个角度收集样本信息^[29-33],并将这些图像融合以构建样本的三维图像。在成像某些深层组织时,多光子激发技术已被证明能够将组织穿透深度增加到 1 mm 以上^[19, 21];除此之外,波前校正技术也被用于进一步提升光学穿透深度^[34-37]。对于固定的组织样本,组织透明化^[13, 18, 38-40]或者组织膨胀处理^[41-44]是一种有效的方法,可以在很大程度上减弱光散射引起的成像深度限制。

3.1 激发光调制

如图 2(a)所示,在利用传统高斯光束形成足够长且均匀的光片时,通常会产生较大的束腰,这就严重降低了轴向分辨率,并且在高散射介质中导致光散射问题加剧。为了克服这些局限性,研究人员采用贝塞尔光束以及其他无衍射光束代替高斯光束,如图 2(b)所

示。贝塞尔光束在传播过程中能够保持较小的束腰尺寸,且具备独特的“自我修复”特性,即在遭遇部分阻挡后仍然能够恢复其原有形态,这使得贝塞尔光束即使在高散射介质中也能保持较长的均匀光片,有效减少对组织内部成像时的畸变。Planchon 等^[26]采用扫描贝塞尔光束形成比高斯光束有效长度长 3~5 倍的光片,提供了各向同性分辨率并增强了组织穿透能力。与此相比,另一种无衍射光束艾里光束,如图 2(c)所示,能产生比相同数值孔径(NA)的高斯或贝塞尔光束更薄的光片。图 2(d)对比了几种光束的荧光成像。华中科技大学费鹏教授团队与张玉慧教授团队^[45]提出一种新的光片超分辨显微成像策略——双环调制选择平面照明显微镜(IDDR-SPIM),通过将线形激发光投影到双环调制板上,产生了均匀的贝塞尔光片,侧瓣强度比相同厚度的晶格光片降低了大约 35%,显著减少了由强侧瓣引起的图像伪影。中国科学院西安光机所姚保利教授团队^[46]提出了互补光束相减光片荧光显微成像技术(CBS-LSFM),该技术利用空间光调制器生成贝塞尔光束及其互补光束,互补光束的中心光强为 0,其他位置的光强与贝塞尔光片旁瓣强度分布一致,用贝塞尔光片和互补光片拍摄两幅荧光图像,二者相减,能够有效消除贝塞尔光束旁瓣的干扰,从而提高图像的

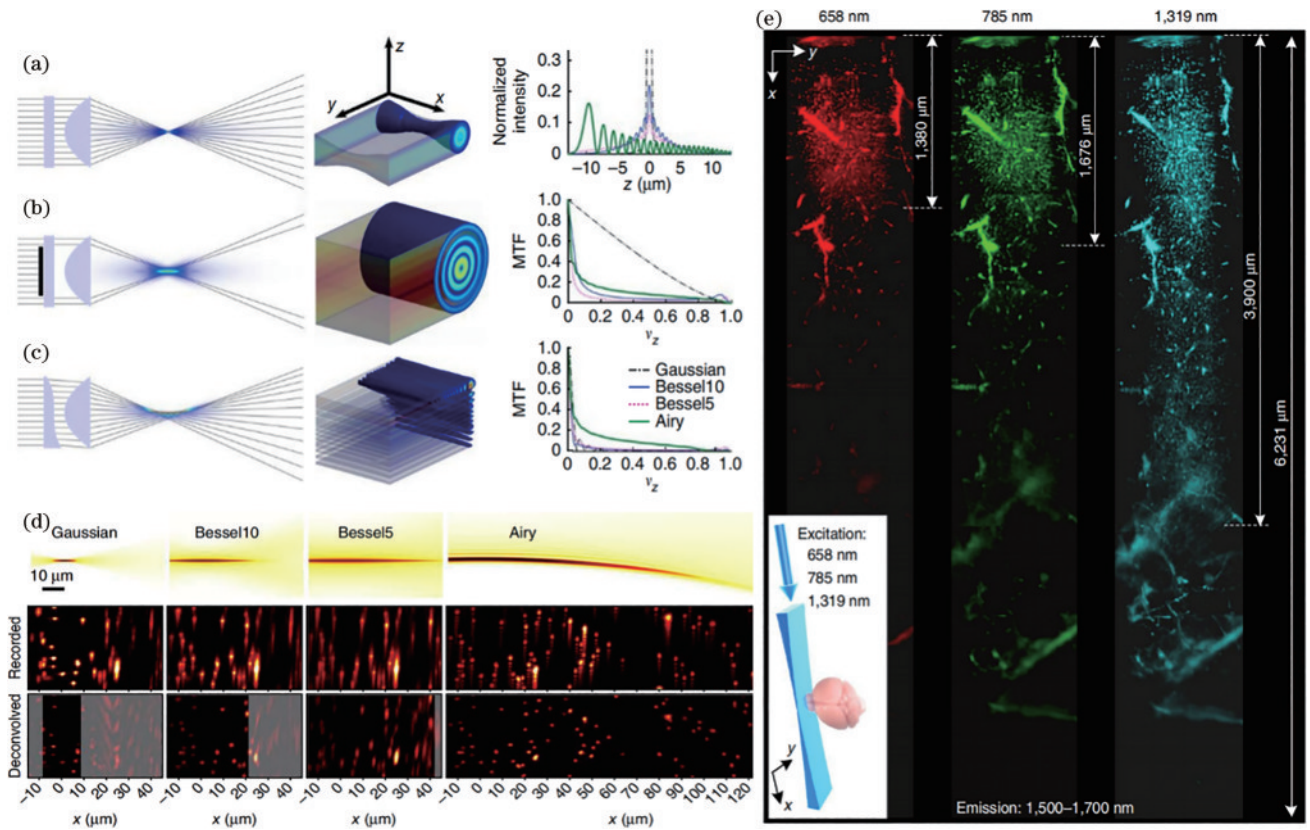


图 2 3 种不同模式的光片及近红外激发策略。(a)~(c)高斯、贝塞尔、艾里光片^[27];(d)不同光束类型的光片沿着 x 轴的传播情况及荧光微球的最高强度投影图像^[27];(e)3 种波长的激发光在小鼠脑组织中的穿透深度对比^[48]
 Fig. 2 Three different modes of light sheets and NIR excitation strategies. (a)~(c) Gaussian, Bessel, and Airy light sheets^[27];(d) propagation of light sheets with different beam types along x -axis and maximum intensity projection images of fluorescent beads^[27];(e) comparison of penetration depths of excitation light of three wavelengths in the brain tissue of mice^[48]

轴向分辨率与信噪比。Vettenburg 等^[27]使用艾里光片对幼年文昌鱼的肌动蛋白和核酸等高散射样本进行成像,相较于高斯和贝塞尔光束,艾里光束能够沿轴向传播更远的距离,能够更清晰地分辨出组织深处的细微结构。艾里光束的不对称激发模式可能导致图像略显模糊或扭曲,但通过反卷积算法处理,可以提取并恢复原始图像的更多细节,从而在整个视场产生高对比度和分辨率的图像。

使用近红外激发光是另一种有效策略,较长波长的光具有更长的散射平均自由程,意味着在发生散射前,光束可以传播更远的距离^[47]。这使得这些光束在生物组织中传播时,更不容易被介质中的小颗粒散射,从而实现了更深的组织穿透。Wang 等^[48]利用所开发的近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)光片显微镜对 3 种不同波长的激光在小鼠脑组织中的穿透深度进行比较,如图 2(e)所示,1320 nm 激发光能够在甘油清除的脑组织中进行约 750 μm 深、2 mm 宽的光学切片成像。目前,已经开发了几种在 NIR-II 发射的荧光探针,包括碳纳米管、量子点、有机共轭聚合物、分子染料以及稀土纳米颗粒^[49-54]。这些探针有效减少了光子散射,降低了长波长区域的自发荧光强度,从而促进了 NIR-II 激光在心血管疾病、脑部病变和癌症小鼠模型成像中的应用^[55-56]。然而,开发适用于该光学窗口的

探针仍具挑战性,近红外光片成像的未来发展在很大程度上取决于探针技术的突破。

3.2 多视图融合

在成像高散射生物样本时,样本中的光吸收和散射降低了光片的质量,进而限制了有效视场,导致随着成像深度增加,图像质量下降。多视图融合技术通过同时获取样本不同视角或不同光路的成像信息,将这些信息融合,有效降低了散射的影响,提高了深组织成像的质量。这种方法可以通过使用多个探测器、采用不同的光路或不同的照明条件来实现,并利用多视图融合算法对样本进行三维重建。

如图 3(a)所示,最原始的多视图光片显微成像系统通过旋转样本并从不同的角度采集图像,Huisken 等^[7]采用该方法实现了基因和蛋白质表达模式的高分辨率三维可视化,显著提高了高散射样本图像的质量。如图 3(b)所示,使用适当的融合算法对不同方向的旋转位置斑马鱼图像进行处理^[57],可以获得具有各向同性分辨率的三维图像。然而,这种顺序多视图成像方法通常适用于固定样本,而不适用于捕获活体样本的动态过程,这是因为该方法的成像速度较慢,在活体样本成像时,连续多个视图采集之间可能发生了快速的发育变化。Ahrens 等^[29]使用双物镜激发系统[图 3(c)]提供更均匀的照明平面,有效去除由样品散射和吸收引起的

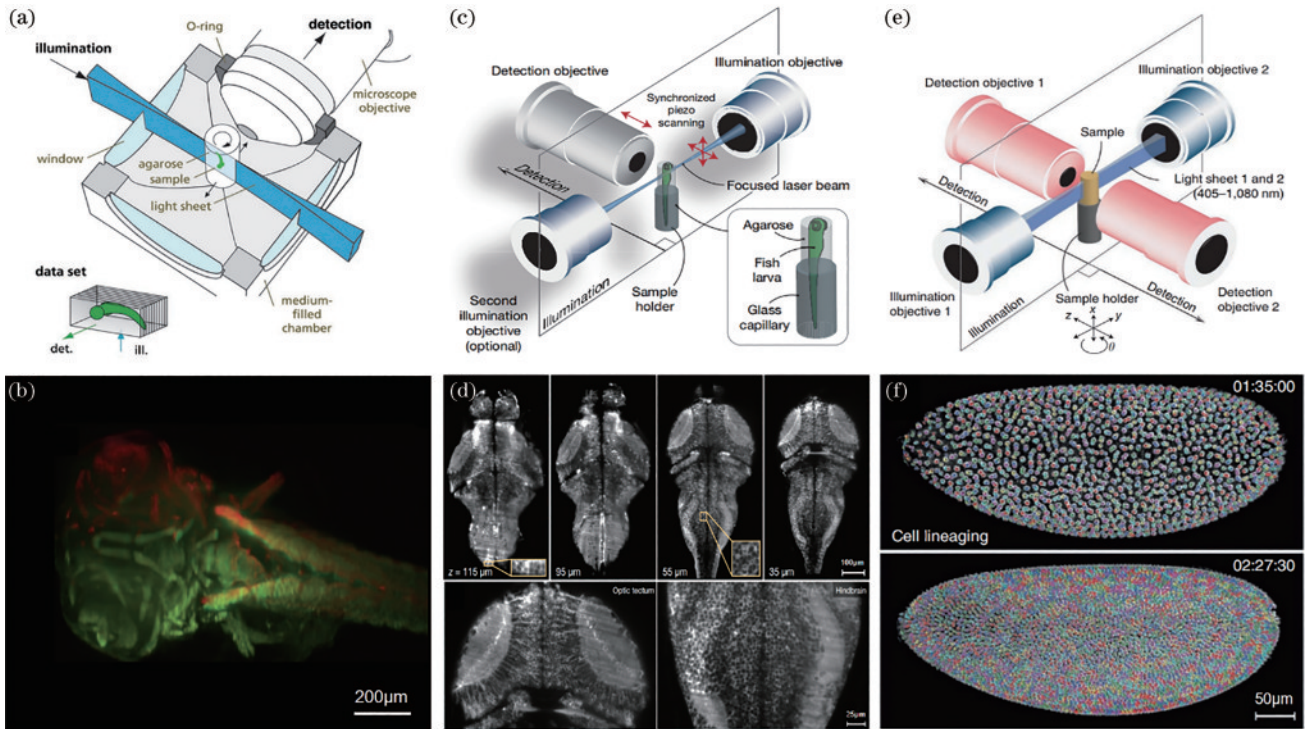


图 3 多视图融合光片显微系统设计。(a)顺序多视图 SPIM 系统原理图^[7];(b)不同方向的斑马鱼融合图像^[7];(c)双向照明 SPIM 系统原理图^[29];(d)不同深度斑马鱼脑部图像及其放大区域图像^[29];(e)同步多视图 SPIM 系统原理图^[30];(f)果蝇合胞胚胎重建图像^[30]
 Fig. 3 Multi-view fused light sheet microscopy system design. (a) Schematic of sequential multi-view SPIM system^[7]; (b) different orientations of zebrafish fusion images^[7]; (c) schematic of SPIM system with dual-view illumination^[29]; (d) images of zebrafish brain at different depths and images of its magnified regions^[29]; (e) schematic of synchronized multi-view SPIM system^[30]; (f) reconstructed images of *Drosophila melanogaster* syncytiotrophoblast embryos^[30]

伪影。该方法利用相反方向的光片照明来补偿样品的散射效应,有效光片更薄,其轴向分辨率比单向选择平面照明显微镜提高了 2 倍。图 3(d)所示为在不同深度获取的斑马鱼脑部图像,该方法每 1.3 s 对整个大脑完成一次采集,覆盖了 $800\ \mu\text{m} \times 600\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 的范围,比顺序多视图采集方法的成像速度快。华中科技大学龚辉教授团队^[58]利用双光束照明和共焦双缝检测来提高图像信噪比,其帧速率是线共焦光片荧光显微镜的 2 倍,通过优化双缝的宽度与信噪比之间的关系,进一步优化了图像质量。这种双侧照明方法虽然明显减少了最终图像的伪影,加快了采集速度,但需要将两个反向传播的光束与探测物镜的焦点区域精确对齐,因此系统校准是一个复杂的任务。此外,以上两种方法涉及样品的旋转,由此引起的机械移动伪影同样影响了成像质量。

为了解决以上问题,研究人员提出具有多条同步检测路径的光片显微镜,该方法能够消除缓慢的顺序多视图成像所造成的时空伪影。然而,该技术在系统构建上仍然面临挑战。Tomer 等^[30]开发了同步多视图选择平面照明显微镜(SiMView-SPIM),如图 3(e)所示,带有 4 个同步照明与探测物镜的光片显微镜,通过同时获取 4 个互补的光学视图,实现了几乎完整的样本覆盖,不同视图间同步拍摄的时间间隔仅受相机采集时间的限制,能够在多个视角上快速地采集图像数据,并进行实时处理和存储。图 3(f)所示为果蝇合胞胚胎重建图像。与传统的顺序多视图成像光片显微镜相比,互补视角的时间同步性提高了 3 个数量级以上,成像速度提高了 20 倍以上。其他多视图解决方案,例如各向同性选择平面照明显微镜(IsoView SPIM)^[31]、多视图选择平面照明显微镜(MuViSPIM)^[32]和四透镜光片显微镜^[33]等,都在一定程度上对系统的参数进行了优化,这些技术主要应用于胚胎发育过程中细胞核和细胞形状变化的跟踪^[32, 59]、核分裂和神经发育的检测^[30],以及胚胎中细胞运动的重建^[60]等。

3.3 非线性光学

非线性光学效应是指在高光强条件下,光与物质的相互作用不再遵循传统的线性光学规律而出现的非线性响应,分别为双光子吸收(2PA)、二次谐波发生(SHG)和相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)^[61],如图 4(a)所示。双光子吸收在生物成像中应用最广泛,双光子显微镜就是一类基于双光子吸收效应构建的三维扫描显微镜^[62],其发光原理为“同时”吸收两个光子形成一个分子进入激发态,并回到基态释放出荧光,三个或更多个光子也可以类似地形成多光子吸收^[63-64]。这种非线性激发的关键优势在于只激发焦点处荧光,如图 4(b)所示,这是因为只有焦点处的光子密度足够高,可以实现双光子吸收。该方法显著减弱了光的散射和吸收,因此相比于传统的单光子宽场荧光显微镜,

双光子显微镜能够实现更深的组织穿透和更精准的光学切片。此外,双光子显微镜^[61, 65-66]或三光子显微镜^[67-68]通常采用红外激发,进一步增强了组织穿透能力,使其穿透深度可达 0.7~1.5 mm。

双光子光片显微镜将非线性激发与正交照明相结合,已成为深组织成像的金标准^[69],这种方法利用近红外光与非线性激发效应,特别适用于厚组织的深层成像。相比于传统的单光子光片显微镜,双光子光片显微镜在生物组织中提供至少 2 倍的穿透深度,同时受散射效应的影响更小^[70]。Fahrbach 等^[28]将双光子激发与光片显微镜结合,对比了线性和非线性荧光激发贝塞尔光束的 Z 轴剖面图,如图 4(c)所示。与单光子激发相比,贝塞尔光束的旁瓣被有效抑制,只保留了中心光强激发。进一步采用荧光小球验证了非线性激发的散射情况,如图 4(d)所示,贝塞尔光束主瓣上的荧光小球清晰可见,其旁瓣产生的背景荧光被显著抑制。Wolf 等^[71]进一步采用双光子光片显微镜对高散射样本斑马鱼脑部组织样本进行成像,图 4(e)对比了利用单光子和双光子光片显微镜进行斑马鱼幼体全脑区域的三维成像结果。北京大学陈良怡课题组^[72]开发了一种新型成像技术,利用可调声光梯度变焦透镜(TAG)的高速调焦特性,结合双光子显微镜高分辨率与信噪比特性,创建了双光子三轴数字扫描光片显微镜,在低数值孔径物镜下,成功实现了 $1\ \mu\text{m}$ 厚的大视场双光子光片照明,拥有快速捕获深层组织结构的能力。双光子光片显微镜提供了更高的分辨率与对比度,尤其是在成像斑马鱼脑部深层结构时,展现出卓越的组织穿透能力。双光子光片显微镜已成功应用于多种生物学研究领域,包括发育中的胚胎^[73]、小鼠脑切片^[74]和肿瘤细胞簇^[28]的成像。

3.4 波前校正

自适应光学(AO)最初是为天文望远镜开发的方法,在过去的 10 年中成功应用于光学显微镜^[34]。在各类荧光显微镜中,自适应光学已成为校正像差和恢复衍射极限分辨率非常有价值的工具^[34],其核心原理是利用动态元件如可变形镜或空间光调制器进行波前控制。这种主动补偿机制可以校正成像系统产生的相位畸变,减少系统由光学元件及样品本身引起的像差,从而优化成像系统的性能^[35]。波前的校正可以通过直接波前传感技术实现,通常使用 Shack-Hartmann 波前传感器,或者采用迭代的无传感器方法来调整可变形镜或空间光调制器,以产生理想的、无畸变的波前。通过这种方式,自适应光学技术可以降低样品散射对成像的影响,提高穿透深度和图像质量。

自适应光学结合光片显微镜应用于深组织成像方面已取得显著成效。Bourgenot 等^[36]采用无波前传感器的方法,如图 5(a)所示,在探测光路中加入可变形镜,对标记转基因斑马鱼的绿色荧光蛋白(GFP)进行成像。图 5(b)对比了有无自适应光学校正的转基因

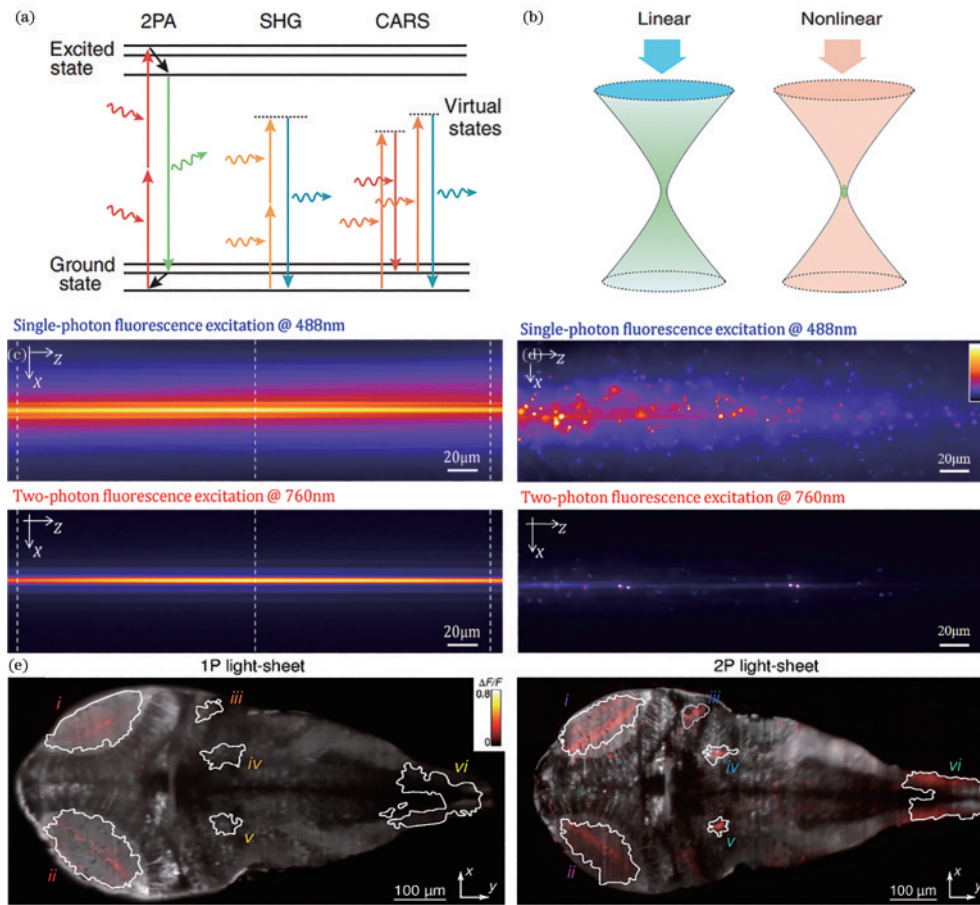


图4 非线性光学效应。(a)三种非线性效应^[61]；(b)线性与非线性激发特性^[61]；(c)线性与非线性荧光激发下贝塞尔光束的Z轴剖面图^[28]；(d)荧光微球的线性与非线性激发成像对比^[28]；(e)斑马鱼幼虫的全脑区域单光子与双光子激发成像对比^[71]
 Fig. 4 Nonlinear optical effects. (a) Three nonlinear effects^[61]；(b) linear and nonlinear excitation properties^[61]；(c) Z-axis profiles of Bessel beams under linear and nonlinear fluorescence excitation^[28]；(d) comparison of linear and nonlinear excitation imaging of fluorescent beads^[28]；(e) comparison of one-photon and two-photon excitation imaging of whole-brain regions in zebrafish larvae^[71]

斑马鱼图像,可以看到,自适应光学校正极大提高了成像质量,特别是在成像深度方面得到了显著提高。Royer等^[37]提出一种基于AutoPilot框架的时空自适应成像方法,能够通过数字方式在三维空间内调整光片和探测平面的位置和方向,从多个角度捕捉高分辨率的生物样本图像,实时优化整个样本范围的空间分辨率。图5(c)为自适应成像系统的自由度和工作流程图,该方法将大型多细胞生物的空间分辨率和信号强度提高了2~5倍。图5(d)所示为斑马鱼幼体的全脑功能成像,对中脑区域自适应校正和未校正的图像质量和空间分辨率进行比较,发现利用该方法恢复了非自适应成像无法分辨区域的细胞和亚细胞结构。Liu等^[75]将晶格光片显微镜与自适应光学相结合,在大型多细胞样本中实现了亚细胞过程的无像差成像,图5(e)为系统光路图。图5(f)比较了斑马鱼胚胎脊椎自适应校正前后的切片,通过对系统和样品引起的像差进行校正,实现了多细胞生物组织的亚细胞结构动态高质量成像。

3.5 样品处理

在生物学成像领域,无论是光片荧光显微镜还是

其他传统光学显微镜,普遍面临一个限制:只适用于观测透明或半透明样本,例如无色素的斑马鱼幼体或胚胎^[76]等,这类样本在光片显微镜下能够获得较好的成像效果,因为光片能够穿透这些样本。然而,在实际的生物学应用中,多数样本并不具备足够高的透明度,这就成为研究人员观测复杂样本的一大挑战。为了应对上述挑战,研究人员尝试通过调整物镜浸没介质的折射率来降低组织的散射^[38, 77],以增强光片的穿透能力。然而,这种方法在提高样品透明度和穿透能力方面的效果是有限的。因此,研究人员开始探索更加有效的方法来“透明化”这些原本不透明的样品。在这种需求的驱动下,组织透明化技术和组织膨胀技术等创新手段相继被开发出来,为深入观测复杂的多细胞生物样本提供了可能。

早期的组织透明化技术着重于将生物样本脱水处理,并用与脂质膜折射率相匹配的油代替水以减少光散射。图6(a)所示为未处理(左侧)和经过透明处理的(右侧)肺叶^[78],处理后的组织变得透明,便于显微成像。Dodt等^[79]采用该方法结合双向照明光片荧光显微成像技术,实现了对小鼠整个大脑的成像,其光路图

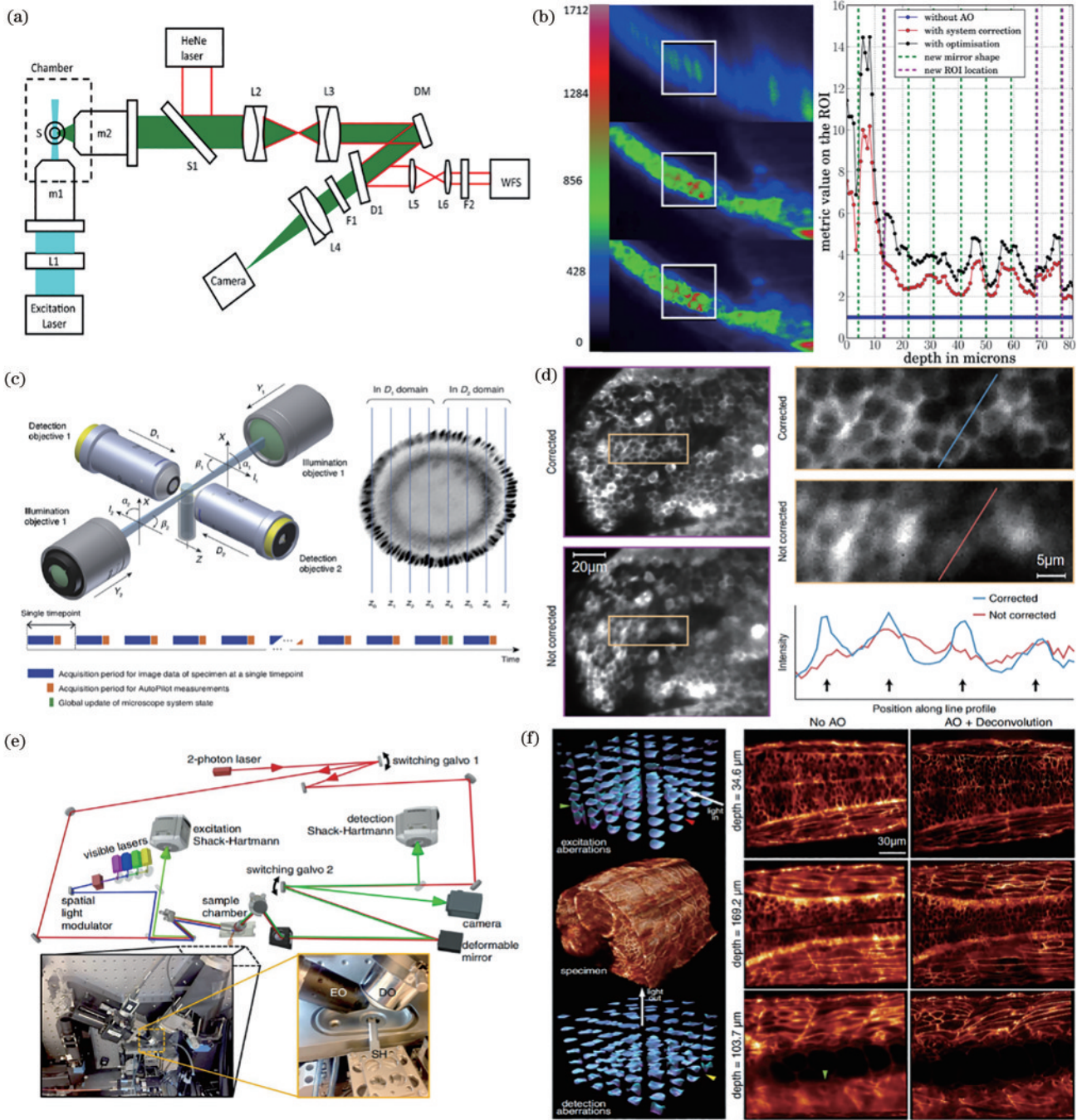


图 5 波前校正。(a)探测光路中加入可变形镜的自适应光片显微系统光路图^[36]；(b)有无自适应光学校正的转基因斑马鱼图像对比^[36]；(c)基于 AutoPilot 框架的自适应成像系统的自由度和工作流程图^[37]；(d)斑马鱼幼体中脑区域自适应校正和未校正的图像对比^[37]；(e)自适应晶格光片系统光路图^[75]；(f)斑马鱼胚胎脊骨自适应校正前后的切片比较^[75]

Fig. 5 Wavefront correction. (a) Optical pathway diagram of an adaptive light-sheet microscopy system with deformable mirrors in the detection optical pathway^[36]; (b) comparison of transgenic zebrafish images with and without adaptive optical correction^[36]; (c) degrees of freedom and workflow diagram of an adaptive imaging system based on the AutoPilot framework^[37]; (d) comparison of adaptive-corrected and uncorrected images of zebrafish larval midbrain regions^[37]; (e) adaptive lattice light-sheet system optical pathway diagram^[75]; (f) comparison of sections before and after adaptive correction of the spine of zebrafish embryos^[75]

如图 6(b)所示。图 6(d)展示了由 550 张光学切片重建的小鼠大脑图像,图 3(e)为部分海马区域的三维重建结果。组织透明化技术不仅在保持样本内部信息完整性的同时提高了组织的透明度,显著减弱了由光散射引起的畸变,突破成像深度的限制,还改进了样本

的染色和标记过程,从而简化了处理流程并缩短了处理时间^[41, 80]。然而,这种方法可能在去色的化学处理过程中对某些蛋白质或结构造成破坏,针对这一问题,研究人员进一步开发了组织膨胀技术^[42, 81]。图 6(b)所示为组织膨胀前后的小鼠大脑^[82],该技术

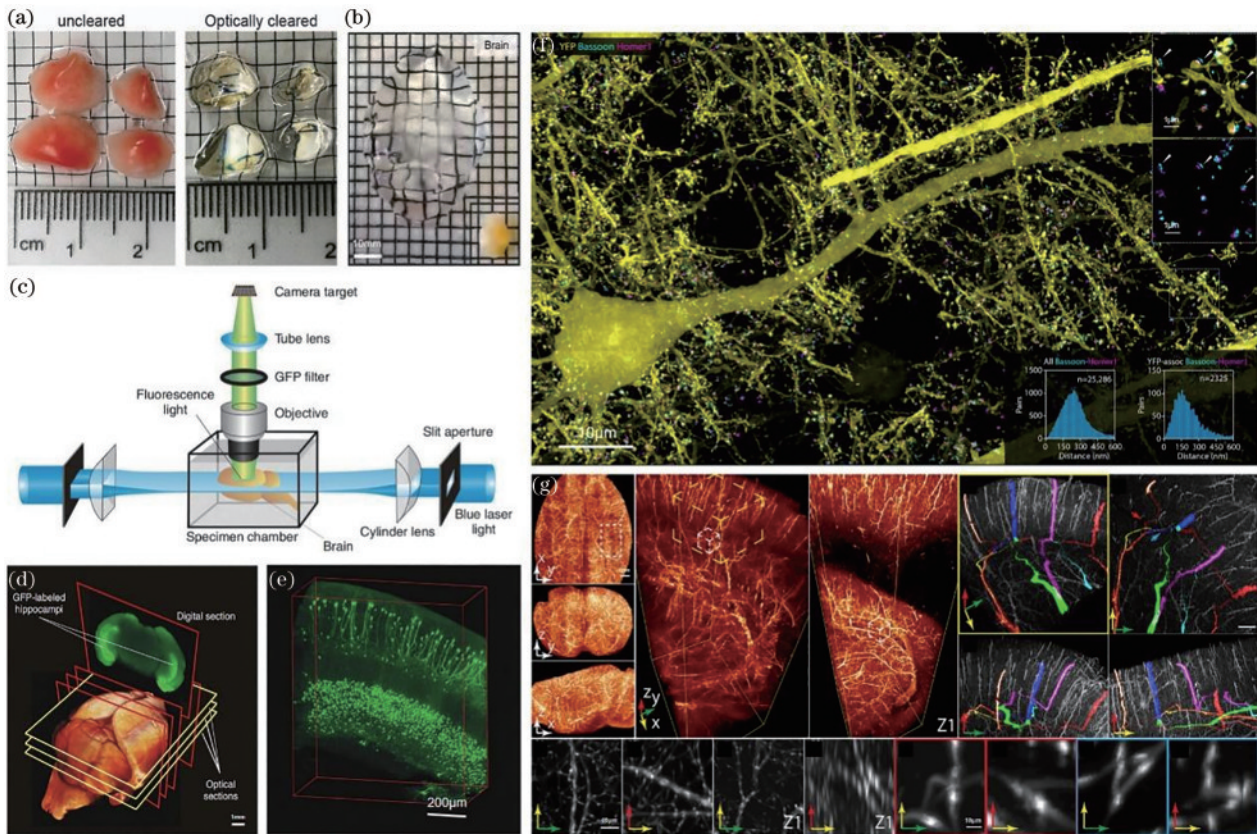


图 6 样品处理。(a)未处理和经过透明化处理的肺叶对比^[78]；(b)组织膨胀前后的小鼠大脑对比^[82]；(c)双向照明光片成像系统光路图^[79]；(d)由 550 张光学切片重建的小鼠大脑^[79]；(e)部分海马区域的三维重建图像^[79]；(f)果蝇神经纤维和突触结构的三维重建图像^[83]；(g)小鼠大脑血管网络的三维重建图像^[39]

Fig. 6 Sample processing. (a) Comparison of tissue unclarifying and clearing lung lobes^[78]; (b) comparison of mouse brains before and after tissue expansion^[82]; (c) dual-view illumination light sheet imaging system^[79]; (d) reconstruction of the mouse brain from 550 optical slices^[79]; (e) 3D reconstructed image of some hippocampal regions^[79]; (f) 3D reconstructed image of nerve fiber and synaptic structures of *Drosophila melanogaster*^[83]; (g) 3D reconstructed image of the vascular network in mouse brain^[39]

能够在保持组织结构的同时均匀地将样品物理放大 10 倍甚至更多^[43-44],使原本低于光学显微镜分辨率的细节特征在完整的样本中也能够实现可视化。Gao 等^[83]将膨胀显微镜与超分辨率晶格光片显微镜结合,通过膨胀脑组织来降低散射和吸收,实现了小鼠和果蝇大脑的近纳米级成像,图 6(f)所示为果蝇神经纤维和突触结构的三维重建图像。西湖大学高亮教授团队^[39]提出一种多功能平铺光片显微镜,具有从微米尺度到亚微米尺度的多种分辨率尺度,通过组织膨胀处理,能够将分辨率提高到 100 nm 以内,图 6(g)所示为对组织透明化后小鼠大脑血管网络的三维重建结果。

4 深组织光片荧光显微成像应用

4.1 发育生物学

光片荧光显微镜因其低光毒性和光损伤特性,已成为实时活体样本成像的理想选择。该技术最初主要应用于发育生物学领域^[84],包括胚胎发育、细胞间相互作用,以及发育过程中分子、细胞的定量分析等。在这一领域的研究中,成像的生物样本常为大型多细胞生

物,成像质量受到光散射的极大限制,如细胞分化和组织形成等关键的生物学过程往往发生在生物体的深层组织中。传统的光学成像技术在深层组织中的应用受到光散射的严重限制,而深组织光片荧光显微镜能够有效应对样本内部的光散射问题,使研究人员能够更加深入和清晰地观察包括胚胎发育及神经系统发展在内的复杂生物过程。

Keller 等^[60]利用数字扫描光片显微镜实现了对斑马鱼胚胎在发育初期 24 小时内细胞核定位和运动的亚细胞分辨率成像,全面分析了斑马鱼胚胎发育过程中细胞和基因表达的动态过程,如图 7(a)所示。上述光片显微镜设置仅限于单角度记录,只记录胚胎的一小部分,而不能对整个胚胎成像。Chhetri 等^[31]开发了一种各向同性的多视图光片荧光显微镜 (IsoView SPIM),通过同时从 4 个正交方向进行光片照明和荧光检测,实现了对果蝇原肠受精胚胎发育过程的多视图反卷积成像,如图 7(b)、(c)所示。McDole 等^[85]开发了一种适用于动态标本的自适应成像框架,该技术能够以高时空分辨率对小鼠胚胎从原肠胚形成到早期器官发育的过程进行成像,推动了同步多视图光片显微

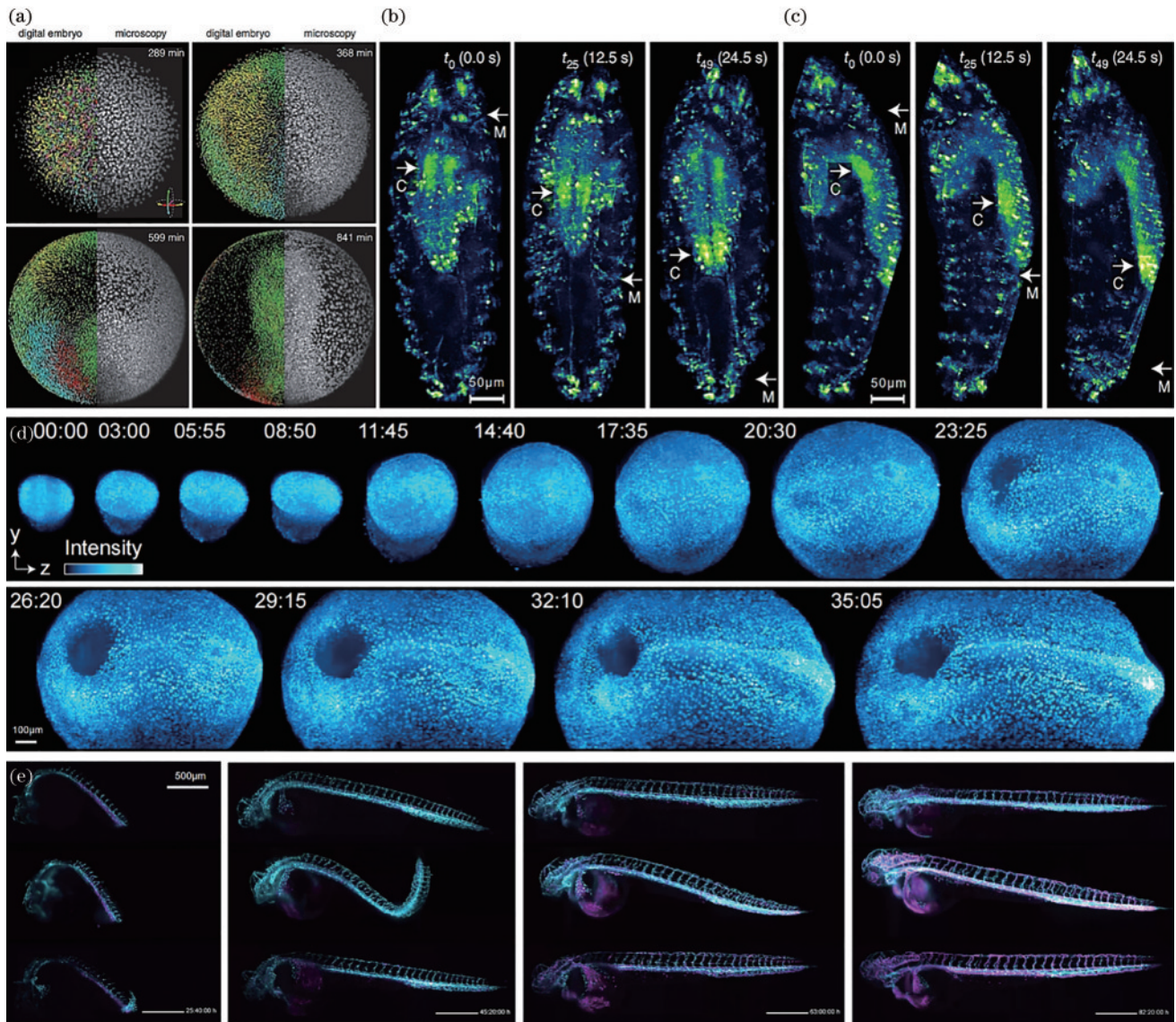


图7 光片显微成像在发育生物学中的应用。(a)斑马鱼胚胎发育过程中细胞和基因表达成像^[60]；(b)(c)果蝇原肠受精胚胎的多视图成像^[31]；(d)小鼠细胞水平发育的长时间实时成像^[85]；(e)表达荧光血管标志物的斑马鱼胚胎成像^[86]

Fig. 7 Applications of light-sheet microscopic imaging in developmental biology. (a) Imaging of cell and gene expression during zebrafish embryo development^[60]; (b) (c) multi-view imaging of gastrulation-fertilized embryos in *Drosophila melanogaster*^[31]; (d) long-term real-time imaging of cellular level development in mice^[85]; (e) imaging of zebrafish embryos expressing fluorescent vascular markers^[86]

镜(SiMView)^[30]和AutoPilot光片显微镜框架^[37]的发展,图7(d)为采用该技术进行小鼠细胞水平发育的长时间实时成像结果。为了定量地了解发生在数小时或数天内的生物过程, Daetwyler等^[86]同时对多个样品进行成像,用荧光血管标志物[Tg(kdr1:EGFP),青色]和红细胞标志物[Tg(GATA1a:dsRed),洋红色]标记生长中斑马鱼胚胎的血管,如图7(e)所示,受精后几天内的长时间发育成像结果为各种定量长时间成像研究铺平了道路。这些方法为研究人员提供了一种更准确地成像复杂、高散射样本如多细胞、组织和器官的手段,有助于捕获整个发育过程中组织深处的动态变化,为理解生命的起源、发育和进化提供了宝贵的信息。

4.2 神经科学

神经系统的发育、成熟和维持,尤其是大脑及其在行为和认知中所起的作用,是长期以来众多科学研究的重点^[87]。光片荧光显微成像技术能够在最小的光损伤下以快速、高对比度的光学切片成像大型三维样品,因此非常适于获取神经系统的功能成像和大脑的形态学研究^[88]。深组织光片成像技术为神经科学研究提供了一个强大的工具,有助于更深入、更细致地研究神经系统的结构和功能。

Ahrens等^[29]开发了同步多视图光片显微镜(SiMView),该系统采用从样品两侧入射的扫描光片来记录完整的斑马鱼大脑中几乎所有神经元单细胞分辨率成像。图8(a)所示为遗传编码钙指示剂表达的

斑马鱼全脑神经元多视图成像,每隔 1.39 s 记录一幅全脑区域图像。Xiao 等^[89]采用晶格光片显微镜进行斑马鱼幼体高分辨率活体成像,研究斑马鱼神经损伤模型中雪旺细胞与感觉神经元之间的相互作用。图 8(b)展示了转基因斑马鱼的各种表型,对比了转基因与同基因斑马鱼的后神经节和侧线的正常与异常表达模式。Pan 等^[90]开发了组织透明化溶液 uDISCO,使完整的器官和啮齿动物身体透明,从而突破厚组织中光散射的局限性。采用该方法结合光片显微镜,对超过 7 cm 的神经和血管系统进行成像,图 8(c)所示为对表达绿色荧光蛋白的成年小鼠中央神经系统的成像结果,可以清楚地观察到单个神经元和突触的结构,该方法使得研究者能够在没有组织切片的情况下,在整个大脑和脊髓的组织水平上研究复杂的神经网络和细胞

间的相互作用。de Medeiros 等^[91]采用四物镜光片显微镜结合短红外激光脉冲的时空技术,实现了对斑马鱼亚细胞水平的神经元成像。图 8(d)展示了在斑马鱼大脑中进行的单个神经细胞体和轴突的实时成像。提升光片显微成像技术在高散射介质中的穿透能力可以提高成像的分辨率和对比度,使神经细胞、轴突、树突等微小结构更加清晰可见。实时监测神经活动,尤其是对深部组织的监测,有利于研究人员在活体条件下观察和记录神经细胞的活动和相互作用。

4.3 组织病理学

活体组织检查对于医学诊断及判定疾病的存在与严重程度至关重要^[92]。传统活检的组织病理学分析包括一系列繁琐的固定和染色步骤,这些步骤可能会对活检组织造成损伤^[93]。目前,已经开发了多种无

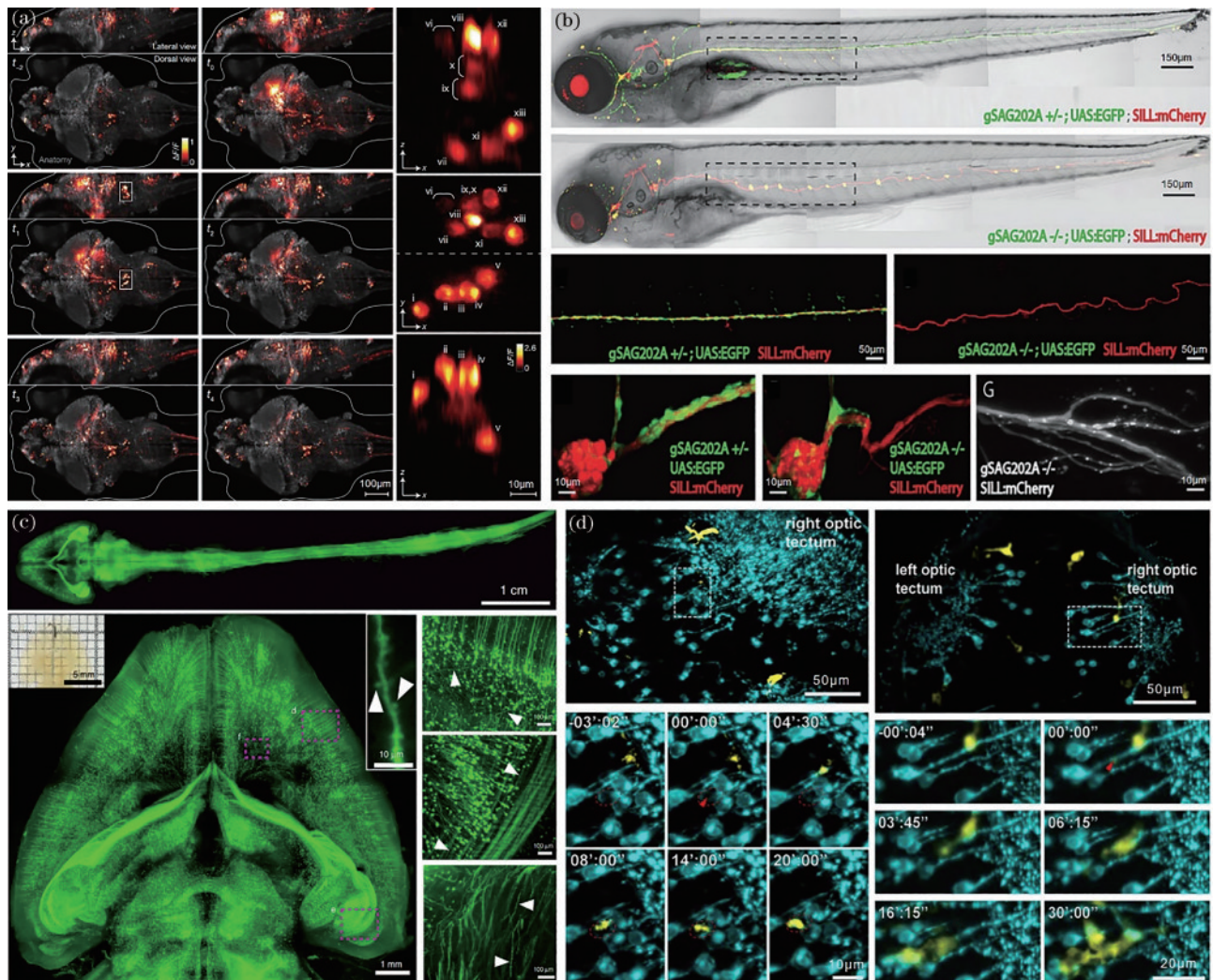


图 8 光片显微成像在神经科学中的应用。(a) 斑马鱼全脑神经元多视图成像^[29]; (b) 对比转基因与同基因斑马鱼的后神经节和侧线的正常与异常表达模式成像^[89]; (c) 成年小鼠中央神经系统成像^[90]; (d) 在斑马鱼大脑中进行的单个神经细胞体和轴突实时成像^[91]

Fig. 8 Applications of light-sheet microscopic imaging in neuroscience. (a) Multi-view imaging of neurons in the whole brain of zebrafish^[29]; (b) imaging of normal and abnormal expression patterns in the posterior ganglia and lateral line comparing heterozygous versus homozygous zebrafish^[89]; (c) imaging of central nervous system in the adult mouse^[90]; (d) real-time imaging of individual neuronal cell bodies and axons in the brain of zebrafish^[91]

损伤的荧光显微技术,如共聚焦显微镜和多光子显微镜。这些技术具有复杂的操作设置、强烈的光漂白、较低的图像采集速率以及有限的三维成像能力,不适合临床组织病理学的快速应用。光片显微镜提供了一种快速、无需切片、低光漂白、非破坏性的活体组织检查,吸引了临床病理学家的广泛关注。然而,深层活体组织成像面临的一个主要挑战是光散射,深组织光片显微镜为突破传统组织病理学分析的局限提供了可能。

Glaser 等^[94]开发了非破坏性开放式光片显微镜(OT-LSM),OT-LSM将照明和收集物镜定向于垂直轴45°,并将它们放置在清除的样品下方,可以实现横向无约束成像^[95]。该方法使用固体浸没透镜(SIL)和

油层对进出玻璃板和组织样品的照明和收集光束进行折射率匹配,图9(a)为OT-LSM用于术中对新鲜人类前列腺组织的病理成像,图9(b)为新鲜人类乳腺组织的病理成像,对组织的病理评估可用于术后癌症或其他病变的存在及程度判定。Migliori 等^[96]开发了光片 θ 显微镜,它从检测物镜的同一侧均匀地照亮样品,消除了横向尺寸的限制,采用该方法对人脑厚冠状板进行快速高分辨率定量成像,成为同类研究中首次使用光片显微镜对人类大脑进行研究的方法。Glaser 等^[40]进一步开发了多浸入的开放式光片显微镜,其能够对组织透明化的标本进行便捷的高通量成像,图9(c)为组织膨胀后的肾切片成像,高分辨率部分清晰展示了单个肾小球、血管、肾小管和多通道 DAPI

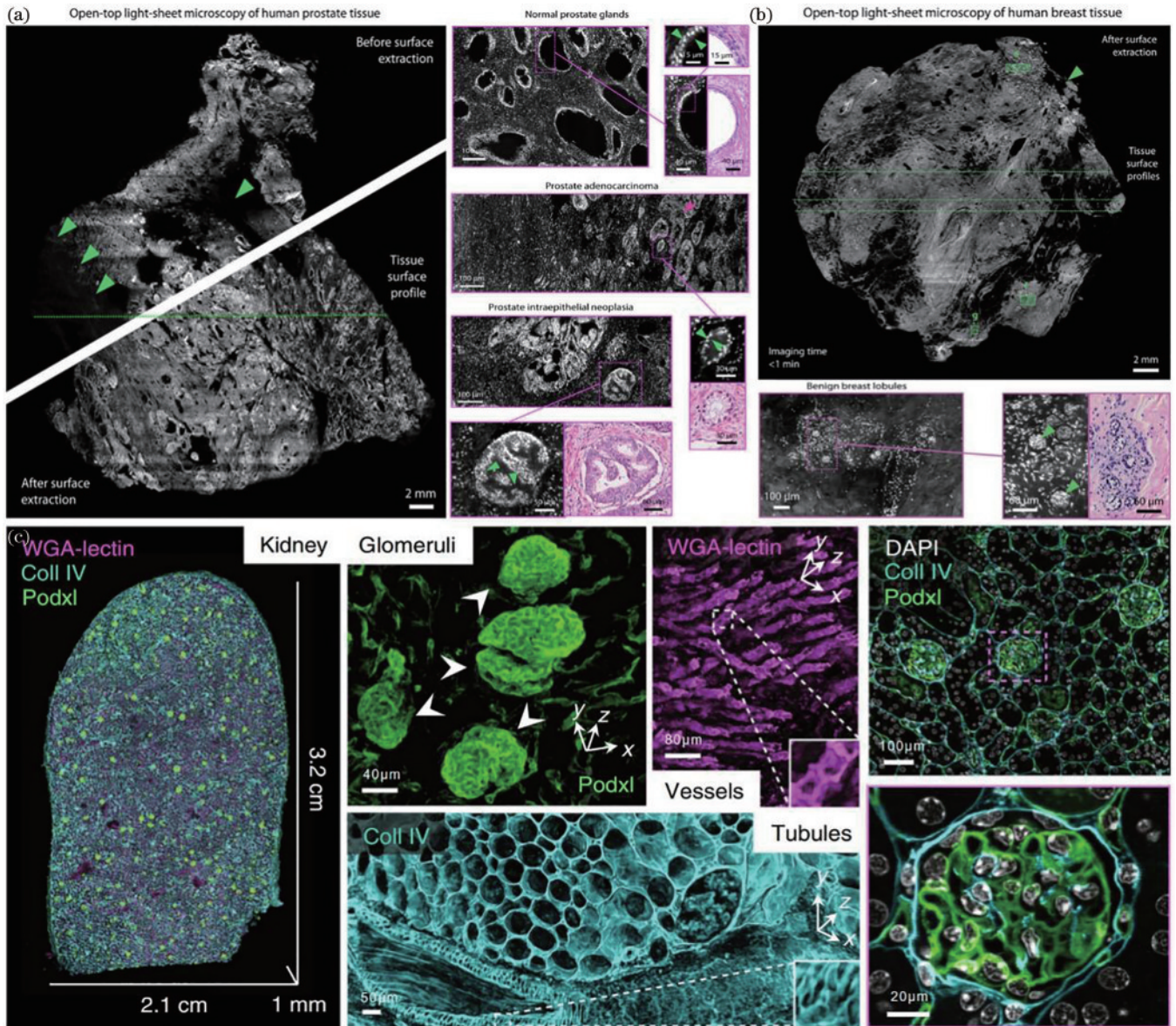


图9 光片显微成像在组织病理学中的应用。(a)人类前列腺组织病理成像^[94]; (b)人类乳腺组织病理成像^[94]; (c)肾切片及单个肾小球、血管、肾小管及多通道 DAPI 对染成像^[40]

Fig. 9 Applications of light-sheet microscopic imaging in histopathology. (a) Histopathological imaging of human prostate^[94]; (b) histopathological imaging of human breast^[94]; (c) renal sections and single glomeruli, blood vessels, tubules, and multichannel DAPI para-staining imaging^[40]

对染的成像结果。光片荧光显微成像技术作为一种有前途的组织病理学工具,提供了细胞尺度的分辨率,并且拥有极低的组织损伤,可以在数十分钟内对大型人体组织样本进行成像,帮助病理学家更好地了解组织的生长和形态变化,提高诊断疾病和分期病变的能力。

5 结 论

光片荧光显微成像技术因其独特的照明和探测方式,不仅具备了低光损伤、高分辨率和快速三维体成像的特性,更进一步优化了传统显微成像效果,成为生物医学领域开展多种复杂研究的主要工具。面对生物样本的多样性与复杂性,传统的光片荧光显微成像技术常常受限于光散射与组织穿透能力,研究人员通过对传统光片显微成像技术进行独特的优化,成功地突破了这一难题,从而在深组织成像领域得到了广泛的应用和研究。更为重要的是,随着技术的进步,光片荧光显微成像不仅能揭示单个细胞的结构和功能,还可以深入到细胞群体中,观察细胞之间的互动和通讯。这一突破性技术为人们理解复杂的生物过程,如细胞间信号传递、组织形成和疾病进展,提供了前所未有的视角。综合来看,深组织光片荧光显微成像技术不仅是生物医学成像领域的一大进步,更为人们打开了一个探索生命奥秘的全新窗口,预示着更多的科研突破和医学应用的可能性。

参 考 文 献

- [1] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy[J]. The Journal of Cell Biology, 2010, 190(2): 165-175.
- [2] Tsien R Y. Nobel lecture: constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox[J]. Integrative Biology, 2010, 2(2/3): 77-93.
- [3] Liu Y T, Wen S H, Wang F, et al. Population control of upconversion energy transfer for stimulation emission depletion nanoscopy[J]. Advanced Science, 2023, 10(20): 2205990.
- [4] Brakenhoff G J, van der Voort H T M, van Spronsen E A, et al. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy[J]. Nature, 1985, 317: 748-749.
- [5] Liu Y T, Wang F, Lu H X, et al. Super-resolution mapping of single nanoparticles inside tumor spheroids[J]. Small, 2020, 16(6): e1905572.
- [6] Fuchs E, Jaffe J S, Long R A, et al. Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography[J]. Optics Express, 2002, 10(2): 145-154.
- [7] Huisken J, Swoger J, Del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. Science, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [8] Santi P A. Light sheet fluorescence microscopy: a review [J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2011, 59(2): 129-138.
- [9] Stelzer E H K, Strobl F, Chang B J, et al. Light sheet fluorescence microscopy[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2021, 1: 73.
- [10] Keller P J, Stelzer E H K. Digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2010, 2010(5): 78.
- [11] Pampaloni F, Chang B J, Stelzer E H K. Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues[J]. Cell and Tissue Research, 2015, 360(1): 129-141.
- [12] Eberle A L, Selchow O, Thaler M, et al. Mission (im) possible-mapping the brain becomes a reality[J]. Microscopy, 2015, 64(1): 45-55.
- [13] Nylk J, McCluskey K, Aggarwal S, et al. Enhancement of image quality and imaging depth with Airy light-sheet microscopy in cleared and non-cleared neural tissue[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(10): 4021-4033.
- [14] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. Science, 2014, 346(6208): 1257998.
- [15] Jacques S L. Optical properties of biological tissues: a review[J]. Physics in Medicine and Biology, 2013, 58(11): R37-R61.
- [16] Sandell J L, Zhu T C. A review of *in-vivo* optical properties of human tissues and its impact on PDT[J]. Journal of Biophotonics, 2011, 4(11/12): 773-787.
- [17] Yoon S, Kim M, Jang M, et al. Deep optical imaging within complex scattering media[J]. Nature Reviews Physics, 2020, 2: 141-158.
- [18] Berke I M, Miola J P, David M A, et al. Seeing through musculoskeletal tissues: improving *in situ* imaging of bone and the lacunar canalicular system through optical clearing[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150268.
- [19] Boustany N N, Boppart S A, Backman V. Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2010, 12: 285-314.
- [20] McGorty R, Xie D, Huang B. High-NA open-top selective-plane illumination microscopy for biological imaging[J]. Optics Express, 2017, 25(15): 17798-17810.
- [21] Elisa Z, Toon B, De Smedt S C, et al. Technical implementations of light sheet microscopy[J]. Microscopy Research and Technique, 2018, 81(9): 941-958.
- [22] Brůža P, Lin H Y, Vinogradov S A, et al. Light sheet luminescence imaging with Cherenkov excitation in thick scattering media[J]. Optics Letters, 2016, 41(13): 2986-2989.
- [23] Keller P J, Dodt H U. Light sheet microscopy of living or cleared specimens[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2012, 22(1): 138-143.
- [24] Glaser A K, Wang Y, Liu J T C. Assessing the imaging performance of light sheet microscopies in highly scattering tissues[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(2): 454-466.
- [25] Huisken J. Light sheet fluorescence microscopy and

- revolutionary 3D analyses of live specimens[EB/OL]. [2023-11-12]. https://www.zeiss.com/content/dam/Microscopy/Products/imaging-systems/Lightsheet%2021/photonic_intl_2013_01_044_HiRes.pdf.
- [26] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8: 417-423.
- [27] Vettenburg T, Dalgarno H I C, Nytk J, et al. Light-sheet microscopy using an Airy beam[J]. *Nature Methods*, 2014, 11: 541-544.
- [28] Fahrbach F O, Gurchenkov V, Alessandri K, et al. Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation[J]. *Optics Express*, 2013, 21(11): 13824-13839.
- [29] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 413-420.
- [30] Tomer R, Khairy K, Amat F, et al. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9: 755-763.
- [31] Chhetri R K, Amat F, Wan Y N, et al. Whole-animal functional and developmental imaging with isotropic spatial resolution[J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 1171-1178.
- [32] Krzic U, Gunther S, Saunders T E, et al. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging[J]. *Nature Methods*, 2012, 9: 730-733.
- [33] Schmid B, Shah G, Scherf N, et al. High-speed panoramic light-sheet microscopy reveals global endodermal cell dynamics[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2207.
- [34] Booth M J. Adaptive optics in microscopy[J]. *Philosophical Transactions A*, 2007, 365(1861): 2829-2843.
- [35] Girkin J M, Poland S, Wright A J. Adaptive optics for deeper imaging of biological samples[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(1): 106-110.
- [36] Bourgenot C, Saunter C D, Taylor J M, et al. 3D adaptive optics in a light sheet microscope[J]. *Optics Express*, 2012, 20(12): 13252-13261.
- [37] Royer L A, Lemon W C, Chhetri R K, et al. Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 1267-1278.
- [38] Iijima K, Oshima T, Kawakami R, et al. Optical clearing of living brains with MAGICAL to extend *in vivo* imaging[J]. *iScience*, 2021, 24(1): 101888.
- [39] Chen Y L, Li X L, Zhang D D, et al. A versatile tiling light sheet microscope for imaging of cleared tissues[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(5): 108349.
- [40] Glaser A K, Reder N P, Chen Y, et al. Multi-immersion open-top light-sheet microscope for high-throughput imaging of cleared tissues[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2781.
- [41] Murakami T C, Mano T, Saikawa S, et al. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing[J]. *Nature Neuroscience*, 2018, 21: 625-637.
- [42] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.
- [43] Klimas A, Gallagher B R, Wijesekara P, et al. Magnify is a universal molecular anchoring strategy for expansion microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 858-869.
- [44] Chang J B, Chen F, Yoon Y G, et al. Iterative expansion microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 593-599.
- [45] Zhao Y X, Zhang M, Zhang W T, et al. Isotropic super-resolution light-sheet microscopy of dynamic intracellular structures at subsecond timescales[J]. *Nature Methods*, 2022, 19: 359-369.
- [46] Jia H, Yu X H, Yang Y L, et al. Axial resolution enhancement of light-sheet microscopy by double scanning of Bessel beam and its complementary beam[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(1): e201800094.
- [47] Wu H J, Huang C L, Wang L W, et al. Folate-targeted co-delivery polymersomes for efficient photo-chemo-angiogenic therapy against breast cancer and *in vivo* evaluation via OCTA/NIRF dual-modal imaging[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(12): 5035-5041.
- [48] Wang F F, Wan H, Ma Z R, et al. Light-sheet microscopy in the near-infrared II window[J]. *Nature Methods*, 2019, 16: 545-552.
- [49] 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: 773-780.
- [50] Won N, Jeong S, Kim K, et al. Imaging depths of near-infrared quantum dots in first and second optical windows [J]. *Molecular Imaging*, 2012, 11(4): 338-352.
- [51] Hong G S, Zou Y P, Antaris A L, et al. Ultrafast fluorescence imaging *in vivo* with conjugated polymer fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4206.
- [52] Antaris A L, Chen H, Cheng K, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging[J]. *Nature Materials*, 2016, 15: 235-242.
- [53] Zhong Y T, Ma Z R, Zhu S J, et al. Boosting the downshifting luminescence of rare-earth nanocrystals for biological imaging beyond 1500 nm[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 737.
- [54] Liu Y T, Zhou Z G, Wang F, et al. Axial localization and tracking of self-interference nanoparticles by lateral point spread functions[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2019.
- [55] Hong G S, Lee J C, Robinson J T, et al. Multifunctional *in vivo* vascular imaging using near-infrared II fluorescence[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18: 1841-1846.
- [56] Hong G S, Diao S, Chang J L, et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared

- window[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8: 723-730.
- [57] Preibisch S, Saalfeld S, Schindelin J, et al. Software for bead-based registration of selective plane illumination microscopy data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7: 418-419.
- [58] Yang Z, Mei L, Xia F, et al. Dual-slit confocal light sheet microscopy for *in vivo* whole-brain imaging of zebrafish[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(5): 1797-1811.
- [59] Amat F, Keller P J. Towards comprehensive cell lineage reconstructions in complex organisms using light-sheet microscopy[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2013, 55(4): 563-578.
- [60] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [61] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2: 932-940.
- [62] Xu M H, Wang L V. Photoacoustic imaging in biomedicine[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2006, 77(4): 041101.
- [63] Denk W, Piston D W, Webb W W. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy[M]// Pawley J B. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston: Springer, 1995: 445-458.
- [64] Liu Y T, Zhou J J, Wen S H, et al. On-chip mirror enhanced multiphoton upconversion super-resolution microscopy[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(12): 5514-5519.
- [65] Lapadula G, Bourdolle A, Allouche F, et al. Near-IR two photon microscopy imaging of silica nanoparticles functionalized with isolated sensitized Yb(III) centers[J]. *Chemistry of Materials*, 2014, 26(2): 1062-1073.
- [66] Alifu N, Yan L L, Zhang H Q, et al. Organic dye doped nanoparticles with NIR emission and biocompatibility for ultra-deep *in vivo* two-photon microscopy under 1040 nm femtosecond excitation[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 143: 76-85.
- [67] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7: 205-209.
- [68] Ouzounov D G, Wang T Y, Wang M R, et al. *In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 388-390.
- [69] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [70] Truong T V, Supatto W, Koos D S, et al. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8: 757-760.
- [71] Wolf S, Supatto W, Debrégeas G, et al. Whole-brain functional imaging with two-photon light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 379-380.
- [72] Zong W J, Zhao J, Chen X Y, et al. Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy [J]. *Cell Research*, 2015, 25(2): 254-257.
- [73] Mahou P, Vermot J, Beaurepaire E, et al. Multicolor two-photon light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2014, 11: 600-601.
- [74] Lavagnino Z, Sancataldo G, D'Amora M, et al. 4D (*x-y-z-t*) imaging of thick biological samples by means of Two-Photon inverted Selective Plane Illumination Microscopy (2PE-iSPIM)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23923.
- [75] Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, et al. Observing the cell in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms[J]. *Science*, 2018, 360(6386): eaaq1392.
- [76] White R M, Sessa A, Burke C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 183-189.
- [77] Boothe T, Hilbert L, Heide M, et al. A tunable refractive index matching medium for live imaging cells, tissues and model organisms[J]. *eLife*, 2017, 6: e27240.
- [78] Mzinza D T, Fleige H, Laarmann K, et al. Application of light sheet microscopy for qualitative and quantitative analysis of bronchus-associated lymphoid tissue in mice [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2018, 15(10): 875-887.
- [79] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2007, 4: 331-336.
- [80] Chung K, Deisseroth K. CLARITY for mapping the nervous system[J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 508-513.
- [81] Wassie A T, Zhao Y X, Boyden E S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research[J]. *Nature Methods*, 2019, 16: 33-41.
- [82] Ku T, Swaney J, Park J Y, et al. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 973-981.
- [83] Gao R X, Asano S M, Upadhyayula S, et al. Cortical column and whole-brain imaging of neural circuits with molecular contrast and nanoscale resolution[EB/OL]. (2018-07-23) [2023-11-06]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/374140v1>.
- [84] Wan Y N, McDole K, Keller P J. Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2019, 35: 655-681.
- [85] McDole K, Guignard L, Amat F, et al. In toto imaging and reconstruction of post-implantation mouse development at the single-cell level[J]. *Cell*, 2018, 175(3): 859-876.
- [86] Daetwyler S, Günther U, Modes C D, et al. Multi-sample SPIM image acquisition, processing and analysis of vascular growth in zebrafish[J]. *Development*, 2019, 146(6): dev173757.
- [87] Corsetti S, Gunn-Moore F, Dholakia K. Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 319: 16-27.
- [88] Yang Z Y, Haslehurst P, Scott S, et al. A compact light-

- sheet microscope for the study of the mammalian central nervous system[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26317.
- [89] Xiao Y, Faucherre A, Pola-Morell L, et al. High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2015, 8(6): 553-564.
- [90] Pan C C, Cai R Y, Quacquarelli F P, et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO[J]. *Nature Methods*, 2016, 13: 859-867.
- [91] de Medeiros G, Kromm D, Balazs B, et al. Cell and tissue manipulation with ultrashort infrared laser pulses in light-sheet microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 1942.
- [92] Eichler K, Hempel S, Wilby J, et al. Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review[J]. *The Journal of Urology*, 2006, 175(5): 1605-1612.
- [93] Gillett C E, Springall R J, Barnes D M, et al. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study[J]. *The Journal of Pathology*, 2000, 192(4): 549-553.
- [94] Glaser A K, Reder N P, Chen Y, et al. Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 84.
- [95] Strnad P, Gunther S, Reichmann J, et al. Inverted light-sheet microscope for imaging mouse pre-implantation development[J]. *Nature Methods*, 2016, 13: 139-142.
- [96] Migliori B, Datta M S, Dupre C, et al. Light sheet theta microscopy for rapid high-resolution imaging of large biological samples[J]. *BMC Biology*, 2018, 16(1): 57.