中国光学（中英文）
Chinese Optics
核心期刊

基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像研究

谭天 史天悦 吴长锋 彭洪尚

NIR-II fluorescence confocal imaging based on indirect wavefront shaping

TAN Tian, SHI Tian-yue, WU Chang-feng, PENG Hong-shang

引用本文:
谭天, 史天悦, 吴长锋, 彭洪尚. 基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像研究[J]. 中国光学, 2024, 17(1): 150–159. doi: 10.37188/CO.2023–0070
TAN Tian, SHI Tian-yue, WU Chang-feng, PENG Hong-shang. NIR-II fluorescence confocal imaging based on indirect wavefront shaping[J]. *Chinese Optics*, 2024, 17(1): 150-159. doi: 10.37188/CO.2023-0070

在线阅读 View online: https://doi.org/10.37188/CO.2023–0070

文章编号 2097-1842(2024)01-0150-10

基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像研究

谭 天[1,2], 史天悦[2], 吴长锋[2], 彭洪尚[1]*
(1. 中央民族大学 理学院 光子系统工程软件教育部工程研究中心, 北京 100081;
2. 南方科技大学 生物医学工程系, 广东 深圳 518055)

摘要: 生物组织散射引起的光学像差限制了光学系统的成像性能。本文研究了基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像技术。首先, 制备了高效率近红外二区荧光探针, 降低该波段生物组织的散射有助于实现高对比度的活体组织成像。其次, 研究了基于间接波前测量的自适应光学方法, 将间接波前整形技术应用于激光扫描共聚焦显微系统中, 以实现对生物组织引起的光学像差的测量与补偿, 获得生物组织的高信噪比成像。最后, 对基于间接波前整形的近红外二区荧光共聚焦成像系统开展了相关实验。实验结果表明, 本系统对空气平板、散射介质和小鼠颅骨等产生的像差具有良好的补偿效果, 最终信号强度较初始值分别提升了 1.47、1.95 和 2.85 倍, 显著提升了最终的成像质量。

关 键 词: 间接波前整形; 近红外二区成像; 共聚焦成像; 活体实验
中图分类号: O439 **文献标志码:** A **doi:** 10.37188/CO.2023-0070

NIR-II fluorescence confocal imaging based on indirect wavefront shaping

TAN Tian[1,2], SHI Tian-yue[2], WU Chang-feng[2], PENG Hong-shang[1]*
(1. *Engineering Research Center of Photonic Design Software Ministry of Education*, *College of Science*, *Minzu University of China*, *Beijing* 100081, *China*;
2. *Department of Biomedical Engineering*, *Southern University of Science and Technology*, *Shenzhen* 518055, *China*)
* *Corresponding author*, *E-mail*: *hshpeng@bjtu.edu.cn*

Abstract: Optical aberrations caused by the scattering of biological tissues limit the imaging performance of optical systems. A near-infrared II fluorescence confocal imaging technique based on indirect wavefront shaping was investigated. First, we synthesized a highly efficient near-infrared II range fluorescent probe,

收稿日期: 2023-04-18; 修订日期: 2023-05-10
基金项目: 国家自然科学基金(No. 62175266, No. 62235007, No. 22204070); 深圳市科技计划项目(No. KQTD20170810111314625, No. JCYJ20210324115807021, No. SGDX20211123114002003); 深圳湾实验室开放课题(No. SZBL2021080601002); 广东省先进生物材料重点实验室(No. 2022B1212010003)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 62175266, No. 62235007, No. 22204070); the Shenzhen Science and Technology Program (No. KQTD20170810111314625, No. JCYJ20210324115807021, No. SGDX20211123114002003); the Shenzhen Bay Laboratory (No. SZBL2021080601002); Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Biomaterials (No. 2022B1212010003)

where reducing the scattering of biological tissue can realize biopsy imaging with high-contrast. Second, we investigated the adaptive optical method based on indirect wavefront measurement. The indirect wavefront shaping technology was applied to the laser scanning confocal system, enabling the measurement and compensation of optical aberrations caused by biological tissues, and obtaining imaging of biological tissues with a high signal-to-noise ratio. Finally, near-infrared II fluorescence confocal imaging system based on indirect wavefront shaping was deployed and relevant experiments were conducted. The experimental results indicate that the system effectively compensates for the aberrations induced by air plates, scattering media and mouse skull, and increases the final signal intensity by 1.47, 1.95 and 2.85 times, respectively. As a result, the final imaging quality is significantly enhanced.

Key words: Indirect wavefront shaping; near-infrared-II imaging; confocal imaging; in vivo experiments

1　引　言

高分辨率的光学成像技术一直是推动生物学发展的主要手段，在生物分子解构[1]、光遗传[2]和细胞形态学[3]等方面发挥着不可替代的作用。然而，生物组织的折射率分布不均匀，组织的散射会引起严重的光学像差，使得照明光无法高保真度地聚焦，从而限制了组织成像的深度和信噪比。随着成像深度的增加，生物组织产生的光学像差阶数也逐渐增加[4]，以至于照明光被多次散射而完全丢失其光场信息。这导致实现生物组织深处的非侵入性的高分辨显微成像变得愈发困难。因此，它也成为光学研究领域公认的难点之一[5]。

生物组织对光的影响主要表现为散射和吸收，两者均与光的波长密切相关。研究表明在生物组织中存在具有较低散射系数和吸收系数的“近红外窗口”，可以缓解生物组织对于入射光线的影响[6]。虽然，目前对于近红外一区荧光材料的研究逐渐完善[7]，但仍难以满足人们对成像深度的需求。近年来，由于近红外二区荧光成像具有更深的组织穿透率，故其作为一种新兴技术逐渐在成像中得到广泛应用[8]。在近红外二区窗口（NIR-II, 1 000~1 700 nm），Dai 课题组开发了小动物成像系统[9-10]和光片显微系统[11]。由于抑制了激发和发射光在生物组织中的散射，生成的图像明显比传统可见光和近红外一区窗口的图像更清晰。当前，近红外二区成像面临的主要问题是性能优异、生物相容性好的荧光探针比较匮乏[12-13]。因此，开发高效的 NIR-II 荧光探针是活体荧光成像的热点之一。

自适应光学（Adaptive Optics, AO）正在被引入至成像系统中，以校正成像过程中产生的各类光学像差[14]。AO 方法是一种光电仪器和计算方法相结合的方法，由 3 个主要组件组成：测量像差的传感器，补偿像差的校正器[15-17]以及根据传感器测量值计算校正器所需信号的控制器。光学像差可以使用专用波前传感器进行直接测量，也可以从图像中间接确定。人们将这两种方法分别称为“直接波前测量 AO”[18-19]和“间接波前测量 AO”[20-21]。在生物成像领域，相比于直接波前测量 AO，间接波前测量 AO 不需要依赖波前传感器和在目标区域内置“引导星”标记，可以显著降低实验的复杂度和对于目标的侵入性。因为没有专用的波前传感器，在确定存在的像差大小和所需的校正方面，间接方法明显慢于基于传感器的方法。但是，由于显微镜和生物组织产生的像差能够相对静态地持续数小时之久[22]，故间接方法在生物显微成像领域也得到了广泛的应用。与非线性荧光相结合，Cui 小组[23, 24]和 Judkewitz 小组[25]分别提出了新的间接波前测量办法。IMPAC[23]和 F-SHARP[25]，各自实现了小鼠大脑中达 400 μm 深度的双光子成像。上述工作引发了广泛关注，但这两个工作并不能推广到头骨比较厚的应用场景[26]。如何进一步抑制生物组织的散射，提高高分辨率系统在生物组织内的成像深度仍有待于人们探索。

本文制备了生物相容性好、荧光亮度高的近红外二区荧光探针，在 808 nm 激光激发下，发射波长覆盖 990~1 300 nm，可以有效地抑制生物组织的散射对激发光和荧光信号的影响。进一步将

基于间接波前测量的自适应光学方法与激光扫描共聚焦系统相融合，以校正生物组织产生的光学像差，提高穿透组织成像的分辨率和对比度。比较了两种常见的用于间接波前测量的控制算法，“遗传算法（Genetic Algorithm, GA）”[27] 和“动态自适应散射补偿全息术（Dynamic Adaptive Scattering compensation Holography, DASH）”[28]。实验表明，虽然 DASH 算法被用于双光子成像的像差校正时，具有比 GA 算法更快的收敛速度和更高的信号提升能力，但在线性荧光成像中 GA 算法的校正效果却优于 DASH 算法。本文开展了一系列的仿体和活体实验，使用间接波前测量校正不同像差后，荧光信号强度提升为校正前的 1.47、1.95 和 2.85 倍，提升了系统的分辨率与对比度。本研究将近红外二区荧光探针与自适应光学像差补偿技术相结合，为深层生物组织内高分辨成像提供了新路径。

2 材料与方法

2.1 近红外二区荧光材料

在可见光和传统的近红外一区窗口（700~900 nm），生物组织具有很强的散射，在近红外二区窗口（1 000~1 700 nm），光学散射显著降低。考虑到半导体聚合物具有良好的生物相容性和较高的量子效率（3%）[29]，本文选择其作为荧光探针材料，如图 1 所示。荧光探针在 700~900 nm 处有很强的吸收，在 990 nm 处和 1 118 nm 处具有两个发射峰。因此，在 808 nm 激光的激发下，可以实现近红外二区发射，从而显著降低生物组织对于激发光和荧光信号的散射。

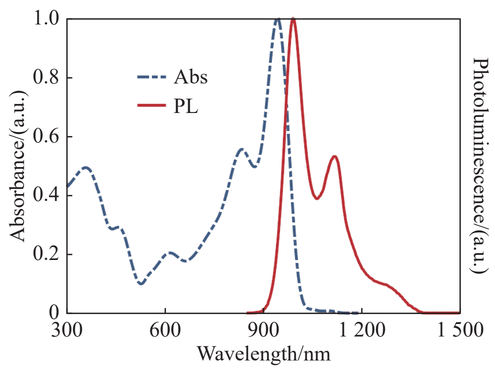

图 1　半导体聚合物荧光探针的吸收与发射光谱

Fig. 1　Absorption and emission spectra of the semiconductor polymer fluorescent probes

2.2 荧光微珠的制备

将直径为 100 nm 的聚苯乙烯（PS）微球稀释到 0.5 wt% 的水溶液中，利用超声仪使其充分分散后用 0.22 μm 的滤头过滤。调配水和四氢呋喃（THF）体积比满足 5∶1，向 PS 微球中快速注入 1 mg/L 的半导体聚合物 THF 溶液并涡旋 10 s，之后搅拌 6 h，以保证荧光探针的装载。将荧光微珠在 15 000 g 下离心 30 min 后倒掉上清液并加水超声，重复清洗 1 次后制得的荧光微珠样本用于成像实验。

2.3 电纺丝样本制备

电纺丝由于具有复杂的三维结构以及易于负载荧光材料的特性，可以模拟生物复杂的血管组织成像。使用 1 mg/L 的半导体聚合物 THF 溶液将电纺丝浸透后在黑暗通风环境中晾干，之后用速干胶和玻片进行封装以制得由半导体聚合物标记的电纺丝样本。电纺丝样本中典型电纺丝的直径在 8 μm 左右。

2.4 散射模型的制备

将 0.2 g 的琼脂糖与 1.7 mL 纯水混合后在 90 °C 下恒温搅拌，充分溶解后加入 0.1 mL 全脂纯牛奶并继续加热，待混合均匀后取出静置凝固以制得具有一定散射系数的琼脂散射模型。

2.5 活体小鼠样本制备

对 3 个月大的 C57 小鼠使用异氟烷气体进行麻醉后用电动理发剪和脱毛膏取出头部的毛发。通过尾静脉注射 100 μL、浓度为 200 μg/L 的半导体聚合物溶液并通过腹腔注射 10% 的水合氯醛溶液以保证长时间麻醉。充分麻醉后使用手术剪剪去头皮，并用 3% 的过氧化氢溶液清理骨外膜防止其对实验造成影响，最后使用生理盐水清洗创口。

2.6 系统光路设计

设计的共聚焦成像系统如图 2（彩图见期刊电子版）所示，808 nm 近红外连续激光器（DL808-400, CrystaLaser, USA）发射的波长为 808 nm 的近红外光作为激发光。发出的激光首先经过一个偏振片和 4f 扩束系统变为偏振光且光斑半径扩大为初始的 8.3 倍，以更方便液晶空间光调制器（Spatial Light Modulator, SLM）对入射光束进行调制。随后扩束的激光光束经过一反射镜反射后以特定的角度入射到 SLM（PLUTO-2.1-NIR-135, holoeye, Germany）上。入射光经过 SLM 调制后通过一个 4f 收束系统使得光斑半径缩为扩束后

的 0.42 倍。之后入射光先后经过二向色镜(Dichroic mirror, DM)、扫描振镜(Galvo scanner, GS)(6210 H, Cambridge Technology, USA)、扫描透镜(Scan lens)(SL50-3P, Thorlab, USA)、管镜(Tube lens)(TTL200 MP, Thorlab, USA)、反射镜和显微物镜(XLPlan N 25X, Olympus, Japan)聚焦于样本上。通过扫描振镜、扫描透镜和管镜组成的中继光路可以实现聚焦光斑在样本平面内的扫描, 最大扫描视场为 1 320 μm×1 320 μm。样本激发出的荧光信号通过物镜、反射镜、管镜、扫描透镜、扫描振镜和二向色镜后由一焦距为 125 mm 的凸透镜聚焦于光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)上, PMT 前放置一直径为 75 μm 的小孔以滤除目标激发区域以外的杂散光。在光学上, SLM 与样本表面的散射介质共轭, 通过在 SLM 上叠加一定的相位全息图, 以对散射介质产生的像差进行补偿, 从而缓解因散射介质导致的入射光不聚焦的问题。

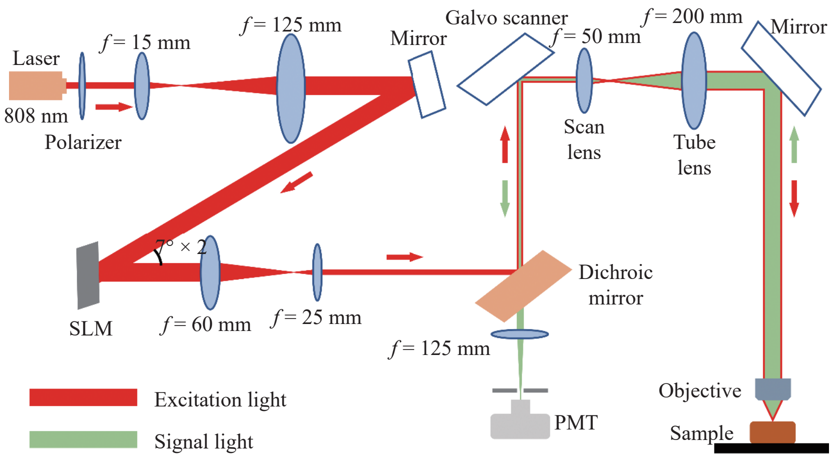

图 2　基于间接波前测量的近红外激光共聚焦扫描显微系统

Fig. 2　Near-infrared laser scanning confocal microscope based on indirect wavefront sensing

本文实验均采用 808 nm 连续激光对样本进行激发, 使用长通滤光片和 PMT 收集波长大于 980 nm 的近红外荧光信号后重建图像。

相比于目前常用的双光子、多光子成像采用的 500~700 nm 左右的信号光, 本系统采用近红外一区激发、近红外二区发射的单光子成像方式具有更好的穿透组织的能力, 可以有效提升未校正时的信号强度, 为波前整形提供良好的前置条件。

2.7　基于间接波前测量的光学像差补偿方法

在穿透散射介质的共聚焦成像中, 由于散射介质对于入射光的散射作用, 会使聚焦光斑的质量下降, 并且随着深度的增加, 这种影响会愈加显著, 从而降低图像的对比度并影响成像的分辨率。对此, 研究人员提出了直接测量像差波前并在反演后使用 SLM 对其进行校正的直接波前传感的方法[18-19]。但是该方法不仅需要引导星等来标记从所需成像点发出的光, 还会显著增加系统复杂度。

基于间接波前传感的方法不需要波前传感器和引导星, 其原理如图 3 所示。在经过一轮完整的成像流程后, 探测器将捕获到的荧光信号传递至计算机, 经过特定的算法处理后对 SLM 的相位校正作出控制并进行第二轮成像, 再一次接受从传感器捕获的荧光信号。经过一系列的成像并对成像效果使用评价函数(Cost Function, CF)进行测量, 计算机最终会找到可靠的校正模式。

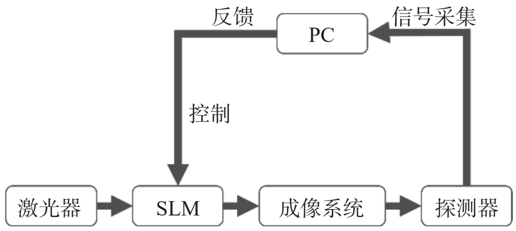

图 3　控制 SLM 的反馈系统

Fig. 3　Feedback system for controlling SLM

当聚焦光斑质量提升时, 成像荧光强度会显著提升, 同时因为更小的光斑会导致成像的展宽缩减, 这会使得成像的整体锐度提升。所以本文选取了锐度函数作为对整体成像质量的评判标准, 具体如下:

$$cost\,function = \sum_{1}^{n} \sqrt{\nabla f} / n \quad ,$$

其中：n 为成像图中采样点的个数，f 为由采样点坐标及其荧光强度建立的曲面函数。

遗传算法（Genetic Algorithm, GA）是一种用于间接波前测量的经典方法[27]。在迭代过程中使用评价函数对不同的相位矩阵调制下的成像图进行分析，选取评价函数较高的相位矩阵作为亲代，对其加权平均后生成子代，最终得到可以很好校正像差波前的校正模式。该算法已用于波前整形并可以取得较好的优化效果，但是目前还没有将其用于近红外二区单光子荧光共聚焦显微镜中的报道。

近年来，另一种高效的间接波前传感的自适应光学算法被报道。它在双光子成像系统中具有极快的收敛速度并且可以实现较高的信号增强，被称为动态自适应散射补偿全息术（Dynamic Adaptive Scattering compensation Holography, DASH）。该方法利用 SLM 将入射光束分为两束，一束为调制波前，一束为参考场。两束入射光同时入射进行干涉测量，使得迭代速度显著增加[28]。本文尝试将上述两种波前整形方法应用于近红外二区单光子荧光共聚焦显微镜中，以检验他们在该系统中对于像差的校正效果，选取效果更好的方法进行进一步实验。

由于本系统扫描振镜的扫描频率对单次成像有限制，单轮迭代的时间一般为 45~60 s，若需要对动态散射介质进行补偿，可使用扫描频率更快的扫描振镜，将单轮迭代时间缩短至 5 s 以内。

3 结果与讨论

3.1 系统像差测试与校正

在系统搭建过程中由于各光学元件和参数的不精确会产生系统像差，在全视场上成像时可以使用 GA 算法进行校正，补偿结果可作为成像系统的系统像差。

对荧光微珠样本直接进行扫描共聚焦成像并使用 GA 算法进行校正，结果如图 4（彩图见期刊电子版）所示。

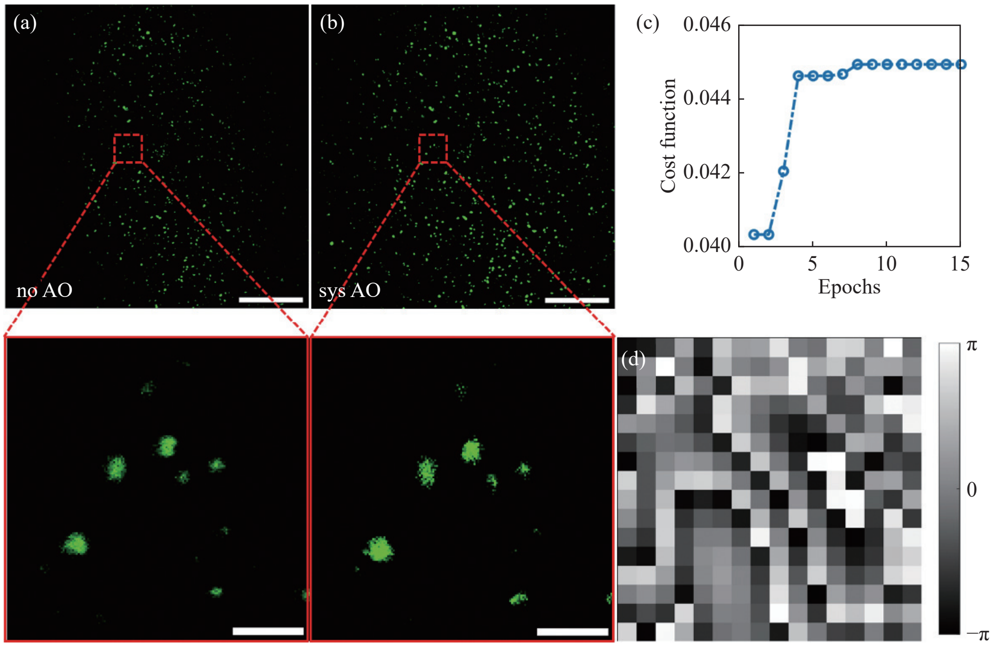

图 4 系统像差的测试与校正。（a）未进行校正时的样本成像；（b）经过系统像差校正后的样本成像图；（c）评价函数随迭代轮次的变化曲线；（d）GA 算法计算得到的校正相位图；比例尺：（a）（b）全视场图中比例尺为 200 μm，感兴趣区域局部放大图中比例尺为 20 μm

Fig. 4 Testing and correction of the system aberrations. (a) Imaging of samples without correction; (b) imaging of samples after systematic aberration correction; (c) curve of the evaluation function as a function of iterative order; (d) the corrected phase diagram calculated by GA; scale: 200 μm in the full field of view and 20 μm in the local magnification of the region of interest in (a) (b)

由图 4 可知，通过对系统像差校正前后的成像进行对比发现，在校正系统像差后，此前未被激发或信号强度较低的荧光微珠信号得到了较大的提升。通过对评价函数随迭代次数的变化进行

分析(图 4(c)), GA 算法可以在 2–3 代内快速收敛至理想值, 体现了 GA 算法可以快速校正像差的特点。图 4(d)为最终迭代后施加在 SLM 上的相位图, 可以认为该相位图能够对系统像差进行校正。

3.2　体外电纺丝样本的像差校正

为了对比 GA 算法和 DASH 算法在近红外二区荧光共聚焦成像中的像差补偿效果, 在相同的像差条件下分别使用 GA 算法和 DASH 算法进行相位图校正。使用近红外二区荧光共聚焦系统对电纺丝样本进行成像, 选取成像较为清晰的区域作为目标平面。在对目标平面对焦之后, 将载物台向下平移 30 μm。通过这种方式引入了一个 30 μm 的空气平板, 可以在成像光路中引入了一个固定的像差。通过对比 GA 算法和 DASH 算法的校正效果验证这两种算法在近红外二区单光子荧光共聚焦显微镜成像中的适用性, 实验结果如图 5(彩图见期刊电子版)所示。

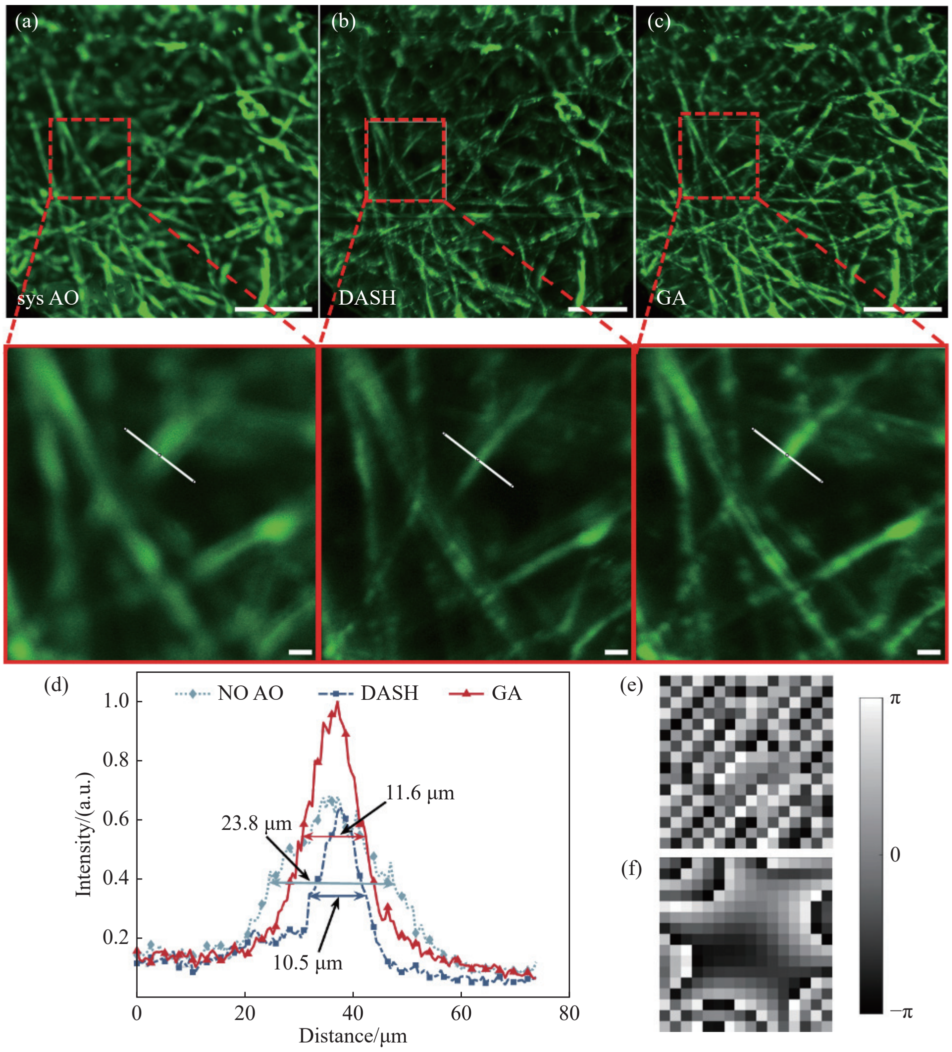

图 5　电纺丝像差校正结果。(a)引入一个 30 μm 的空气平板并仅进行系统像差校正的成像图; (b)在图(a)成像情况下, 使用 DASH 算法进行像差校正; (c)在图(a)成像情况下, 使用 GA 算法进行像差校正; (d)为(a)(b)(c)中感兴趣区域的局部放大图白线标记处的荧光强度分布; (e)DASH 算法得到的校正相位图; (f)GA 算法得到的校正相位图; 比例尺: (a)(b)(c)全视场图中比例尺为 200 μm, 感兴趣区域局部放大图中比例尺为 20 μm

Fig. 5　Aberration correction results of electrospinning. (a) Image with a 30 μm air plate and performing only system aberration correction; (b) in the case of imaging in figure (a), aberration correction caculated by using DASH; (c) in the case of imaging in figure (a), aberration correction caculated by using GA; (d) fluorescence intensity distribution at the white line marker in partial enlarged pictures of the region of interest in figures (a) (b) (c); (e) the corrected phase map calculated by DASH; (f) the corrected phase diagram calculated by GA; Scale: 200 μm in the full field of view and 20 μm in the local magnification of the region of interest in (a) (b) (c)

在引入一个固定像差的基础上，在 SLM 上施加图 4(d)所示的相位图，即只进行系统像差的校正，成像结果如图 5(a)所示。可以看出电纺丝展宽较为严重且荧光强度较低。分别经过 DASH 算法和 GA 算法校正后，图像的对比度和荧光强度得以提升，如图 5(b)和 5(c)所示。对红框中单根电纺丝进行荧光强度分析量化，结果如图 5(d)所示。可以看出，由于两种算法校正效果的差异，使得校正后的对焦平面略有不同。

以上实验结果表明两算法均可以实现对于外加像差的校正，DASH 算法显著降低了电纺丝不正常的展宽，将其宽度由 23.8 μm 降低至 10.5 μm，但是信号强度却没有明显提升。这可能与 DASH 算法得到的相位图有关(图 5(e))，相比于 GA 算法得到的相位图(图 5(f))，DASH 算法产生了过多的杂散相位，导致部分入射光发散而无法参与激发。GA 算法在维持背景信号几乎不变的情况下将荧光信号的峰值强度提升为初始的 1.47 倍，并且将电纺丝的宽度由 23.8 μm 降低至 11.6 μm，显著提高了荧光信号的强度和成像对比度与分辨率。

DASH 算法相比于 GA 算法，对电纺丝展宽具有更好的校正效果。DASH 算法可以产生点扩散函数(PSF)更小的聚焦光斑，符合其适用于双光子成像的特征。但 GA 算法对于入射光全光束的调制使得其可以更加有效地利用入射光强，显著提升激发荧光的信号强度。本实验表明在近红外二区单光子共聚焦成像中，GA 算法较 DASH 算法更适用。因此，本文使用 GA 算法结合近红外二区共聚焦系统来验证其对于各类散射介质产生像差的校正效果。

3.3 仿体实验的像差校正

为验证 GA 算法对散射介质产生像差的校正效果，通过在电纺丝样本上添加一定的散射介质作为仿体进行体外实验。经过对比实验，本系统对厚度最大约 500 μm 的琼脂散射模型具有较好的校正效果。在电纺丝样本与显微物镜之间添加厚度为 480 μm 的琼脂散射模型模拟在成像过程中生物组织对入射激发光的散射，先后进行添加散射介质成像、校正系统像差成像和校正全像差成像。

实验结果如图 6 所示，添加散射介质后，由于其对入射光线的散射，激发光斑质量极差，不止荧光强度大幅度下降，也产生了大量的背景噪声，严重影响了成像质量(图 6(b))。通过在 SLM 上施加图 4(d)所示的相位图以校正系统像差，成像质量有一定的提升，但入射光散射导致的背景噪声依旧十分严重(图 6(c))。最后使用 GA 算法对整体成像的全像差进行校正，结果如图 6 所示(d)，对比只进行系统像差校正下的成像，在提升了整

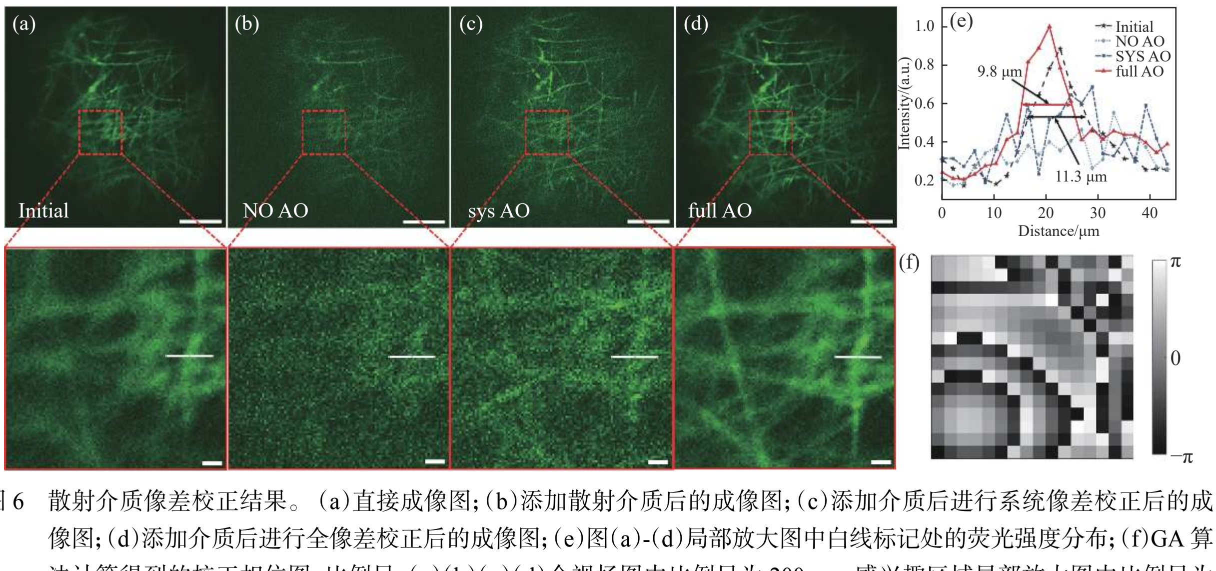

图 6 散射介质像差校正结果。(a)直接成像图；(b)添加散射介质后的成像图；(c)添加介质后进行系统像差校正后的成像图；(d)添加介质后进行全像差校正后的成像图；(e)图(a)-(d)局部放大图中白线标记处的荧光强度分布；(f)GA 算法计算得到的校正相位图；比例尺：(a)(b)(c)(d)全视场图中比例尺为 200 μm，感兴趣区域局部放大图中比例尺为 20 μm

Fig. 6 Aberration correction results of scattering medium. (a) Direct imaging; (b) image after adding scattering medium; (c) image after system aberration correction; (d) image after total aberration correction; (e) distribution of fluorescence intensity at white line markers in partial enlarged pictures of (a)-(d); (f) the corrected phase map calculated by GA; Scale: 200 μm in the full field of view and 20 μm in the local magnification of the region of interest in (a) (b) (c) (d)

体荧光强度的情况下显著降低了背景噪声。对图 6(a)~6(d)红框区域白线标记处的荧光强度分布进行分析量化,结果如图 6(e)所示。可以看出,在添加介质且未进行任何处理时,电纺丝样本的成像质量极差,荧光信号被淹没在背景噪声之中。在进行系统像差校正后,出现了一些荧光信号,但大量的背景噪声导致成像中不能看到明显的荧光强度峰值,成像的对比度很低,而在使用 GA 算法对全像差进行校正后,出现了明显的荧光强度峰值且在峰值处的荧光强度提升为仅进行系统像差校正的 1.95 倍,显著提升了成像对比度。可以看出经过像差校正后的电纺丝成像与初始的参考图像相比具有近似的半高宽。说明本方法有效减少了散射介质的影响,由于 SLM 对于入射光的调制使得入射光角度略微偏移,荧光峰值偏移约 2.5 μm,该尺寸相比于全视场而言可以忽略。验证了该算法对散射介质产生的像差具有良好的校正效果。

3.4　活体小鼠脑部成像实验

为检验本系统在活体成像中对于生物散射组织的校正效果,对保留了完整颅骨的小鼠颅内血管进行成像。在仅校正系统像差和校正全像差两种情况下对活体小鼠颅骨以下具有较明显信号的血管进行成像,经过测量,该血管位于颅骨以下 320 nm。

实验结果如图 7(彩图见期刊电子版)所示。由于颅骨对于入射光的散射致使激发光斑质量不佳,整体成像的荧光信号强度不佳(图 7(a))。使用 GA 算法进行校正后,被颅骨散射而无法参与荧光激发的光线被重新聚焦,使得激发起的荧光强度大幅度提升(图 7(b)),对图 7(a)和 7(b)白线标记处的荧光强度分布进行分析,结果如图 7(c)所示。结果显示全像差校正后的荧光强度较只进行系统像差校正时提升了 2.85 倍。证明该方法用于活体生物成像时对活体组织产生的像差具有校正能力。图 7(d)为评价函数随迭代轮次的变化曲线。可见,相比于体外成像实验(图 4(c)),其上升速度较慢,需要约 9–10 代才收敛至理想波前。这说明该算法对于复杂像差的校正需要迭代更多的轮次。

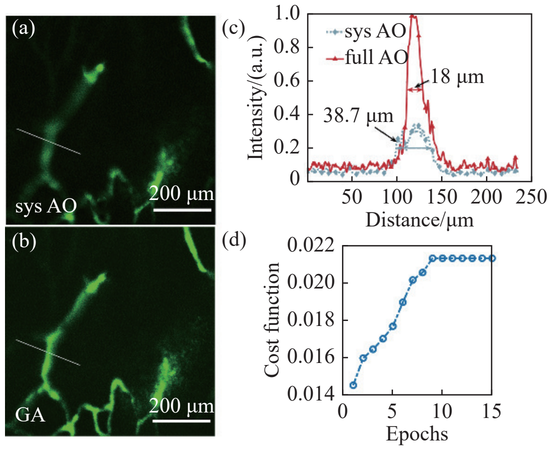

图 7　活体小鼠颅内成像。(a)仅进行系统像差校正的小鼠颅内血管成像图;(b)进行全像差校正后的小鼠颅内血管成像图;(c)图(a)(b)中白线标记处的荧光强度分布;(d)评价函数随迭代伦次的变化曲线;比例尺:(a)(b)中比例尺为 200 μm

Fig. 7　Intracranial imaging results of living mice. (a) Image of intracranial blood vessels in mice with only systematic aberration correction; (b) image of intracranial blood vessels in mice with full aberration correction; (c) the fluorescence intensity distribution at the white line markers in (a) and (b); (d) curve of the evaluation function as a function of iterative order; scale: 200 μm in (a)(b)

4　结　论

为了改善成像过程中由于系统和散射介质等产生的光学像差对最终成像质量的影响,本文介绍了两种基于间接波前测量的光学像差补偿方法,并将其与近红外二区共聚焦成像系统相结合,利用液晶 SLM 对入射激发光波前进行整形从而实现对于系统、介质等产生的光学像差的补偿。该方法可以在数次迭代内显著提升穿透介质后成像的信号强度及成像对比度与分辨率。实验结果表明,GA 算法相比于 DASH 算法在近红外二区共聚焦线性荧光成像中具有更好的校正效果,在穿透空气平板、琼脂散射介质和小鼠颅骨的成像中,信号强度分别提升为仅进行系统像差校正的 1.47 倍、1.95 倍和 2.85 倍。本研究为进一步开展活体小鼠颅内非侵入式荧光成像提供了有意义的参考。

参考文献:

[1]　KLIMAS A, ZHAO Y X. Expansion microscopy: toward nanoscale imaging of a diverse range of biomolecules[J]. *ACS*

Nano, 2020, 14(7): 7689-7695.

[2] ADESNIK H, ABDELADIM L. Probing neural codes with two-photon holographic optogenetics[J]. *Nature Neuroscience*, 2021, 24(10): 1356-1366.

[3] WEIGELIN B, BAKKER G J, FRIEDL P. Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization[J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(2): 245-255.

[4] HAMPSON K M, TURCOTTE R, MILLER D T, *et al*.. Adaptive optics for high-resolution imaging[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(1): 68.

[5] JI N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 374-380.

[6] LIU P F, ZHAO R, LI H W, *et al*.. Near-infrared-II deep tissue fluorescence microscopy and application[J]. *Nano Research*, 2023, 16(1): 692-714.

[7] 杜婉晴, 宋文琦, 梁天宇, 等. 一种基于二氰基异佛尔酮的近红外汞离子荧光探针的合成与应用[J]. 分析化学, 2023, 51(3): 421-428.
DU W Q, SONG W Q, LIANG T Y, *et al*.. Synthesis and application of near infrared mercury (II) fluorescent probe based on dicyanoisophorone[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2023, 51(3): 421-428. (in Chinese)

[8] 张松涛, 王樱蕙, 张洪杰. Nd^{3+}离子敏化的荧光纳米探针用于近红外二区血管成像[J]. 应用化学, 2022, 39(4): 685-693.
ZHANG S T, WANG Y H, ZHANG H J. Nd^{3+} sensitized fluorescent nanoprobes for vascular imaging in the second near infrared window[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2022, 39(4): 685-693. (in Chinese)

[9] WELSHER K, SHERLOCK S P, DAI H J. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(22): 8943-8948.

[10] 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(1): 4206.

[11] WANG F F, WAN H, MA Z R, *et al*.. Light-sheet microscopy in the near-infrared II window[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 545-552.

[12] 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(9): 723-730.

[13] 桑若愚, 许兴鹏, 王其, 等. 近红外二区有机小分子荧光探针[J]. 化学学报, 2020, 78(9): 901-915.
SANG R Y, XU X P, WANG Q, *et al*.. Near-infrared-II fluorescence probes based on organic small molecules[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2020, 78(9): 901-915. (in Chinese)

[14] 张天宇, 王钢, 张熙, 等. 基于焦面复制方法的自适应光学系统静态像差校正技术[J]. 中国光学, 2022, 15(3): 545-551.
ZHANG T Y, WANG G, ZHANG X, *et al*.. Staticaberration correction technique for adaptive optics system based on focal-plane copy approach[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(3): 545-551. (in Chinese)

[15] YANG J M, HE Q Z, LIU L X, *et al*.. Anti-scattering light focusing by fast wavefront shaping based on multi-pixel encoded digital-micromirror device[J]. *Light:Science & Applications*, 2021, 10(1): 149.

[16] YEMINY T, KATZ O. Guidestar-free image-guided wavefront shaping[J]. *Science Advances*, 2021, 7(21): eabf5364.

[17] JI N, MILKIE D E, BETZIG E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(2): 141-147.

[18] AZUCENA O, CREST J, CAO J, *et al*.. Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons[J]. *Optics Express*, 2010, 18(16): 17521-17532.

[19] TAO X D, FERNANDEZ B, AZUCENA O, *et al*.. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1062-1064.

[20] KATZ O, RAMAZ F, GIGAN S, *et al*.. Controlling light in complex media beyond the acoustic diffraction-limit using the acousto-optic transmission matrix[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 717.

[21] ZHOU ZH, HUANG J F, LI X, *et al*.. Adaptive optical microscopy via virtual-imaging-assisted wavefront sensing for high-resolution tissue imaging[J]. *PhotoniX*, 2022, 3(1): 13.

[22] JI N, SATO T R, BETZIG E. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(1):

22-27.

[23] TANG J, GERMAIN R N, CUI M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(22): 8434-8439.

[24] PARK J H, SUN W, CUI M. High-resolution in vivo imaging of mouse brain through the intact skull[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(30): 9236-9241.

[25] PAPADOPOULOS I N, JOUHANNEAU J S, POULET J F A, *et al*.. Scattering compensation by focus scanning holographic aberration probing (F-SHARP)[J]. *Nature Photonics*, 2017, 11(2): 116-123.

[26] POZZI P, GANDOLFI D, PORRO C A, *et al*.. Scattering compensation for deep brain microscopy: The long road to get proper images[J]. *Frontiers in Physics*, 2020, 8: 26.

[27] LI R Z, PENG T, LIANG Y SH, *et al*.. Interleaved segment correction achieves higher improvement factors in using genetic algorithm to optimize light focusing through scattering media[J]. *Journal of Optics*, 2017, 19(10): 105602.

[28] MAY M A, BARRE N, KUMMER K K, *et al*.. Fast holographic scattering compensation for deep tissue biological imaging[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4340.

[29] LIU Y, LIU J F, CHEN D D, *et al*.. Fluorination enhances NIR - II fluorescence of polymer dots for quantitative brain tumor imaging[J]. *Angewandte Chemie*, 2020, 132(47): 21235-21243.

作者简介：

谭　天(1999—)，男，湖北荆州人，硕士研究生，2020 年于华中科技大学获得学士学位，现于中央民族大学攻读硕士学位，主要从事近红外激光扫描共聚焦系统及自适应光学方面的研究。E-mail: 20302022@muc.edu.cn

彭洪尚(1975—)，男，山东临沂人，教授，博士生导师，2007 年于北京交通大学获得理学博士，主要从事生物荧光纳米传感器和肿瘤光学医疗的研究。E-mail: hshpeng@bjtu.edu.cn