



# 生物医学光学成像的进展与展望

付玲<sup>1</sup>, 骆清铭<sup>2,1\*</sup>

1. 华中科技大学武汉光电国家研究中心, 生物医学光子学教育部重点实验室, Britton Chance生物医学光子学研究中心, 武汉 430074;

2. 海南大学生物医学工程学院, 海口 570228

\* 联系人, E-mail: [qluo@hainanu.edu.cn](mailto:qluo@hainanu.edu.cn)

收稿日期: 2020-08-10; 接受日期: 2020-08-25; 网络版发表日期:

国家自然科学基金(批准号: 81827901, 61890952, 81971692, 61721092)和科技部国家重点研究发展计划(批准号: 2017YFC0110002)资助

**摘要** 光学成像与生物医学领域的交叉融通可追溯至17世纪用显微镜观察微生物开始。几个世纪以来, 光学成像不断拓展其内涵与外延, 因高分辨、多尺度、多维度、易集成以及低辐射等优势, 在生物医学领域的基础研究和临床诊疗中展现出源源不断的生命力, 为生命科学信息的获取、处理和可视化提供了变革性科学仪器和科学工具, 是人类从认识微观生物体结构到理解动态生命过程的创新源泉。本文从生物医学光学成像的发展现状入手, 针对生物医学光学成像技术的几个重要方向, 分别阐述了其进展与未来发展趋势。

**关键词** 光学成像, 显微成像技术, 标记技术, 多尺度, 多维度, 临床应用, 人工智能

## 1 光学成像在生物医学领域的应用

光学成像的发展几乎贯穿人类的整个科技发展史。在距今约2400年以前, 墨子记录了小孔成像效应, 并指出小孔成像是倒立的像(“下者之人也高, 高者之人也下”), 展现了人类对光沿直线传播的直观认知(“照若射”是指光像射箭一样直线发出)。这一现象在17世纪被牛顿归结为光的粒子特性。基于这一光学成像原理, 英国科学家罗伯特·胡克制作了由多片透镜组合而成的复合式显微镜, 并借此观察到植物细胞(图1); 荷兰显微镜学家安东尼·列文虎克也采用类似的显微镜结构自制了一种放大镜, 从而首次发现了微生物。与此同时, 在惠更斯等科学家的推动下, 光的波动学说悄然兴起。19世纪, 科学家阿贝基于光的波动学说首次提出了显微镜衍射成像理论, 并联合德国工程师蔡司和

化学家肖特发明了现代首台达到衍射分辨极限的显微镜, 这些工作极大推动了光学成像的发展。20世纪, 光的波粒二象性在科学界被广泛接受, 光学成像技术也在这一理论的指导下迅猛发展。爱因斯坦于1905年提出的光电效应促进了光电探测器的发展, 并于1921年获得诺贝尔物理学奖; 泽尼克因发明了相衬显微镜、发展了像差理论并应用于活细胞成像, 获1953年诺贝尔物理学奖; 1960年世界第一台激光器诞生, 随后衍生出的各种先进激光光源为光学成像在生物医学领域的应用带来了更多的可能性, 激光共聚焦扫描显微镜<sup>[1]</sup>、光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)<sup>[2]</sup>、双光子成像<sup>[3]</sup>等技术相继被发明。21世纪, 伴随着新型的生物、化学技术与现代显微成像技术的结合, 光学成像也被赋予了更多的内涵, 被应用到更广阔的生物医学研究领域中, 在成像分辨率、特

引用格式: 付玲, 骆清铭. 生物医学光学成像的进展与展望. 中国科学: 生命科学, 2020, 50

Fu L, Luo Q M. Progress and prospect of biomedical optical imaging (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50, doi: [10.1360/SSV-2020-0263](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0263)

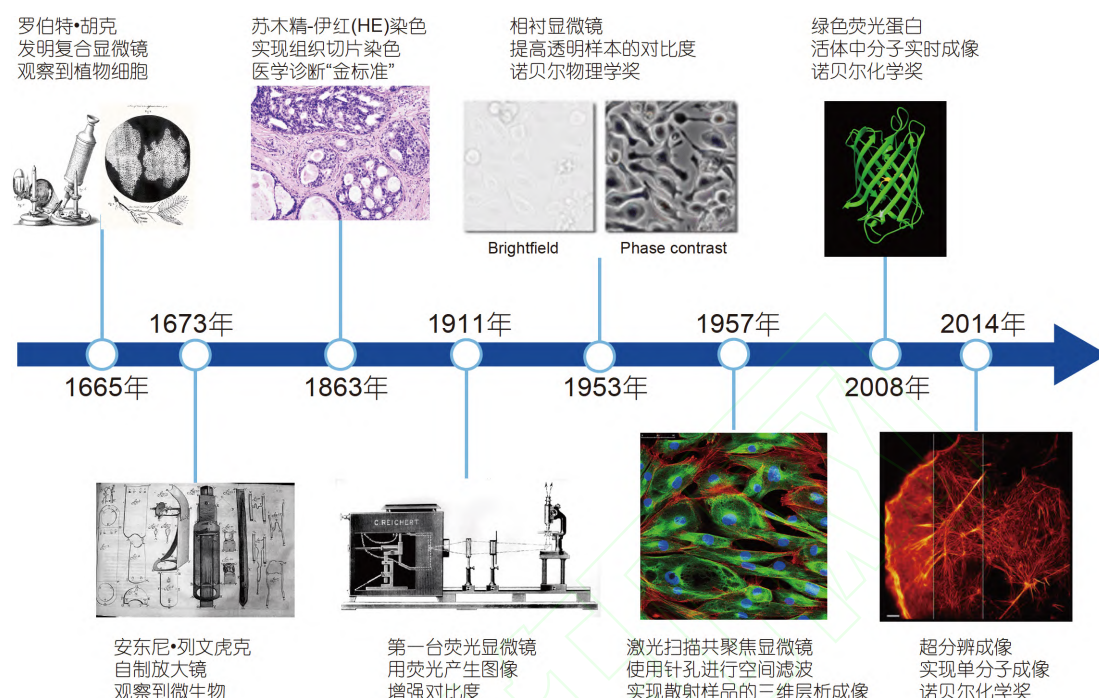


图1 生物医学光学成像历史上的里程碑事件

Figure 1 Milestones in the history of biomedical optical imaging

异性和功能性等方面都有了跨越式的发展,例如,钱永健、下村脩、查尔菲等人因为绿色荧光蛋白及光学成像分子的应用获得了2008年诺贝尔化学奖<sup>[4,5]</sup>;白齐格、赫尔、莫尔纳等人因超分辨荧光显微技术及其在生物学方面的应用获2014年诺贝尔化学奖<sup>[6-8]</sup>。

时至今日,光学成像已被广泛用于生物医学基础研究和临床诊疗的各个领域。在基础科学领域,荧光标记技术配合各种显微成像技术能够在细胞和亚细胞水平进行脑科学、肿瘤学和药学等多方面的研究。临床上,光学成像也是必不可少的工具。例如,内窥镜可以对人体的消化道、呼吸道、膀胱和肝胆胰等进行无创或微创观测,基于激光扫描共聚焦显微成像技术的共聚焦内窥镜能实时提供常规病理切片显示的细胞形态信息。眼科常用的宽场眼底相机和光学相干断层成像,牙科用于检测牙结石的紫外照明荧光成像等都是基于光学成像的原理。胸腔镜、腹腔镜等是微创手术的必备工具。除了临床在体诊疗,光学方法在体外诊断中也有广泛应用。例如,被认为是肿瘤诊断“金标准”的组织病理学检查,能对细胞进行自动分析和分选的流式细胞仪<sup>[9]</sup>等。

光学成像的优势主要体现在以下4个方面。

(1) 特异性、多尺度、多参数. 光与物质相互作用中的反射、透射、散射、吸收和荧光辐射等过程使光学成像的对比度多样,从最简单的明场照相到各种特殊成像,都能够表征生物体的结构或功能信息,且具有特异性。例如,荧光成像配合荧光标记技术,可以特异性地对某些组织、细胞甚至分子进行探测<sup>[10]</sup>,这是非光学手段难以实现的。光学成像的尺度跨越非常大,从人体级别的宏观尺度,到亚微米甚至纳米级别的微观尺度,均有与之相应的光学成像方法。另外,光场的参数多样,可进行波长、偏振、强度、相位、频率、位置、时间等参数的调控,增加光与物质相互作用中的变量,扩展了光学成像的应用。

(2) 时空分辨率高. 由电磁波理论可知,电磁波会聚时的衍射极限取决于波长,成像分辨率取决于衍射极限的大小。光波的波长远小于微波,因而光学成像能有较高的分辨率,可达百纳米水平,超分辨成像可达几十纳米。这一空间分辨率不仅高于超声成像(例如B超),也高于临床常用的CT和核磁共振成像(受限于探测机制,其空间分辨率一般在0.1~1 mm之间)。受益

于高速光电探测器的发展和光学扫描技术的创新, 光学成像也具有较高分辨率。例如, 基于条纹照相机和压缩感知技术, 可实现每秒 $10^{11}$ 帧(10皮秒每帧)的超高速成像, 记录光脉冲在镜面的反射过程<sup>[11]</sup>; 利用飞秒激光脉冲的时间和空间角延迟, 可实现1 kHz的快速双光子成像<sup>[12-14]</sup>。

(3) 多模态复合。光学成像由于实现手段灵活多样, 比较容易实现多种光学成像技术的联用或是光学与非光学成像技术的联用。这种将多种成像方式复合联用的方法, 被称为多模态成像, 可充分发挥不同成像方式的优势。例如, 将光学成像的高分辨率与核素成像的深度优势相结合, 可实现对众多非放射性同位素标记信息的在体动态观测; 将光学成像的高吸收对比度与超声成像的深度分辨能力结合, 可获取活体深层组织的动态功能与分子信息; 将电子显微镜与光学成像结合, 可同时利用电子显微镜的超高空间分辨能力与光子在时间上的超快响应, 在纳米尺度观察生物样本的动态行为<sup>[15,16]</sup>。

(4) 安全性高。电磁波和物质的相互作用效应与波长有关, 电磁波波长越短, 其单量子能量越大。波长小到一定程度, 即单量子能量高到一定程度时, 会使原子电离、化学键断裂, 这种电磁辐射被称为电离辐射。生物医学中所用的光波波长大约在400~3000 nm, 与处在高频区的X射线及 $\gamma$ 射线相比, 其能量较低, 与物质作用时不易破坏分子结构, 对成像过程中照射频次和剂量限制的要求低, 安全性较高。

光学成像有独特的优势, 但由于其本身的特性, 也存在一定局限性。光波为特定波长范围内的电磁波, 与生物组织相互作用时, 容易发生散射, 穿透能力较弱。光学成像能对透明样本或不透明样本的表面进行探测, 但无法像X射线和无线电波那样穿透人体。

如上所述, 在生物医学领域, 光学成像早已扮演着不可或缺的角色。在以下几节, 本文将针对生物医学光学成像技术的几个重要方向, 分别阐述其进展与未来发展趋势。

## 2 生物医学光学成像的发展现状与新机制

根据光与物质之间的相互作用过程, 生物医学光学成像的机制主要基于透射与反射、吸收、散射、荧光辐射、非线性和量子等过程; 根据成像信息的获取

途径和重建方法, 又可分为宽场成像、扫描成像、干涉成像和计算光学成像等; 为了提供不同空间尺度的样本信息以满足不同领域的研究, 又发展出内窥成像、大视场成像和超分辨成像等。如图2所示, 这些成像机制与方法有机结合, 构成了各种常用的光学成像技术, 包括宽场显微成像、激光散斑成像<sup>[17,18]</sup>、声光成像<sup>[19,20]</sup>、光学相干断层成像、共聚焦显微成像、拉曼散射成像、多光子显微成像<sup>[21-23]</sup>和超分辨成像等。

20世纪初, 德国蔡司公司发明了世界上第一台荧光显微镜<sup>[24]</sup>, 被标记的荧光样本, 在不同波长的照明光激发下辐射出不同颜色的荧光, 可对具有一定厚度结构的样本进行成像。然而, 由于光的散射和吸收, 焦点外区域产生的荧光信号极大地限制了荧光成像的分辨率。1961年, Minsky<sup>[25]</sup>首次提出在荧光显微镜的激发光路和荧光探测光路中分别设置孔径光阑的方法, 该方法实现了焦外荧光信号的抑制, 极大提升了厚样本中光学成像的质量, 为目前广泛使用的共聚焦显微成像技术奠定了基础。选择性地激发和探测荧光的思路也被用来构建一种激发光与探测光正交垂直的光学显微系统, 称作光片显微成像技术<sup>[26,27]</sup>。基于光子的量子特性和荧光分子跃迁的非线性效应, Denk等人在1990年实现了双光子显微成像, 首次证明利用双光子显微成像不仅可以极大降低焦外荧光信号, 还可以较低的激光功率在高散射介质中实现更深的成像深度。同时, 伴随着1990年以来高速发展的基因调控荧光蛋白探针技术, 双光子显微镜已被广泛用于不同生物医学研究领域的活体动物成像中, 例如对神经元的在体脑功能成像等。之后, 三光子激发也被应用到荧光显微成像中<sup>[28,29]</sup>, 进一步提升了成像深度。

光学成像系统受限于衍射极限所限定的空间分辨率( $\sim 200$  nm), 难以对生物体细胞中的精细结构(如T细胞的微管蛋白结构、神经元细胞的树突棘等)进行高分辨率观察。虽然在一个波长尺度以内, 光学成像可以获得突破衍射极限的高频空间信息, 如近场扫描光学显微镜<sup>[30,31]</sup>和全反射荧光显微镜<sup>[32]</sup>, 但成像系统与样本之间的空间尺度和成像深度限制了其在生物医学中的应用。进入21世纪, 基于结构光照明和荧光受激损耗, 结构光超分辨显微成像(structure illumination microscopy, SIM)<sup>[33]</sup>和受激发射损耗超分辨显微成像(stimulated emission depletion microscopy, STED)<sup>[34]</sup>首次实现了突破衍射极限的远场光学成像。基于单分子成



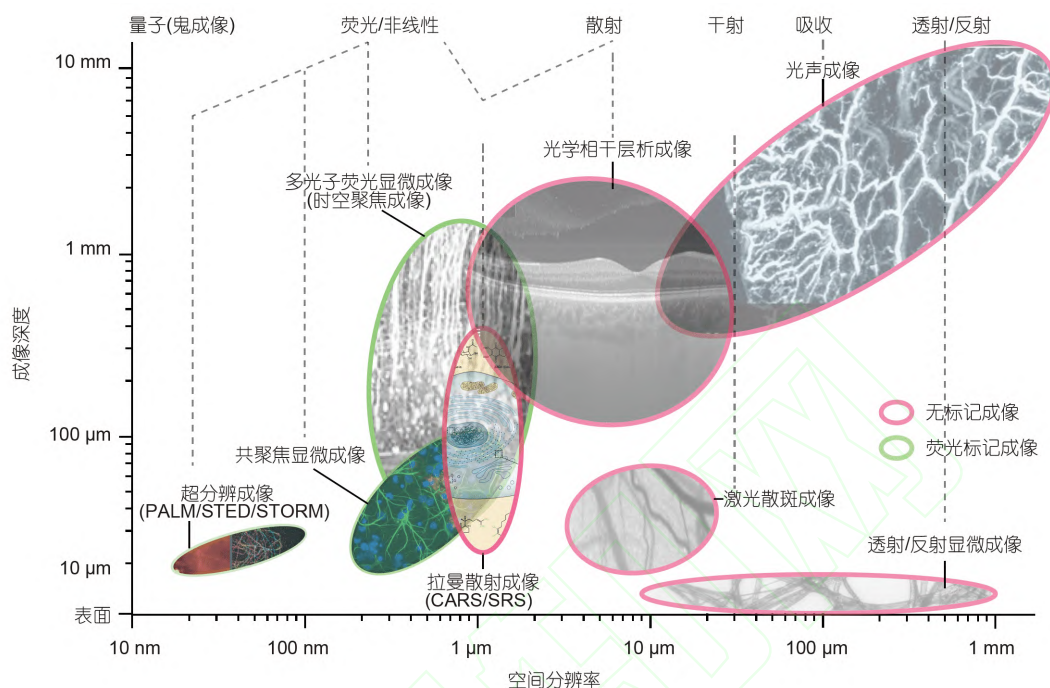


图2 生物医学光学成像技术的时空分辨率

Figure 2 Temporal and spatial resolution of biomedical optical imaging techniques

像与定位技术, 随后发展起来的光激活定位显微成像(photoactivated localization microscopy, PALM)<sup>[6]</sup>和随机光学重建显微成像(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)<sup>[35]</sup>获得了约2~25 nm的空间分辨率。其中, SIM和STED技术基于光学点扩散函数的调制, 不受限于闪烁荧光蛋白, 适用于更广泛的样本标记, 而PALM和STORM需要配合特殊的荧光蛋白才能实现单分子定位成像。

利用样本自身对光场的调制, 如振幅、相位、偏振、波长和频率等的改变, 发展无标记光学成像技术构成了生物医学光学成像的另一重要领域。无标记成像技术对于简化样本制备过程、减少样本外界干扰具有重要意义, 尤其对于满足临床的成像需求具有显著优势。目前, 主要的无标记光学显微成像技术包括: 激光散斑成像<sup>[36]</sup>, 偏振成像<sup>[37]</sup>, 光学相干断层成像, 光声成像, 二次、三次谐波成像和受激拉曼散射成像等。

研究生物医学光学成像的新机制和新方法, 有利于进一步拓展其内涵与外延, 创造新的成像技术与应用。具体而言, 可以从以下方面寻求突破。

(1) 利用光与物质相互作用的新机制。光学成像的本质是光与物质之间的相互作用, 探索光与生物体自

身或者与标记物之间相互作用的新机制可实现源头创新, 发展生物医学光学成像的新方法。例如, 基于飞秒激光与荧光分子跃迁之间的非线性效应, 发展出了以双光子、三光子为代表的荧光显微成像方法; 基于受激发射损耗和随机单分子定位, 分别发展出了STED, PALM和STORM等超分辨方法。未来进一步探索生物医学光学成像所涉及的广泛的物理、化学和生物化学过程, 如光热、光声、光磁、非线性和光遗传等, 有望拓展生物医学光学成像的新领域。

(2) 利用新型的光场照明机制。研究新型的光场照明机制可提高光学成像的时空分辨率。光学成像受限于系统本身的空间尺度, 难以获取样本所有的高频信息。基于结构光照明调制样本空间频率, 可以提高光学成像的分辨率<sup>[38]</sup>, 因而催生了突破衍射极限的结构光照明显微镜(SIM)<sup>[39]</sup>和非线性结构光照明显微镜(nonlinear SIM)<sup>[40]</sup>, 使宽场显微成像的分辨率达到~100 nm的水平。将结构光照明的思路引进光片显微成像技术, 并结合基于贝塞尔光束的体成像技术, 晶格光片显微成像技术实现了突破衍射极限的快速三维成像, 使得以超高分辨率观察活细胞的动态过程成为可能<sup>[41]</sup>。因此, 研究新型的光场照明机制可以有效地

提升光学成像的性能, 使其更好地满足生物医学成像对时空分辨率的需求。

(3) 利用先进的波前与点扩散函数调制机制. 由于成像系统本身存在像差且生物样本易引入光场畸变, 光学成像系统往往不能实现最高效的光子传递, 空间分辨率难以达到衍射极限. 在光学成像系统中引入自适应光学波前调制技术, 可以提升结构成像的分辨率、功能成像的准确性以及高散射介质中的成像深度<sup>[42]</sup>. 将起源于天文观测的夏克-哈特曼(Shack-Hartmann, SH)波前检测技术结合空间光调制器、可变形镜或者微振镜阵列, 可矫正光场的波前畸变. 随后, 基于图像参量迭代优化的波前矫正技术<sup>[43]</sup>和分割入瞳的波前矫正技术<sup>[44]</sup>, 成像系统摆脱了对波前传感器的依赖, 不仅降低了自适应光学应用于成像时的复杂度, 也在高散射介质中实现了更灵敏的波前检测<sup>[45,46]</sup>.

(4) 发展无标记光学成像技术. 虽然荧光标记技术在生物医学领域被广泛应用, 但是发展无标记光学成像技术可有效减少荧光分子对观察对象的干扰, 实现基于生物样本内源信号的成像. 例如, 相干反斯托克斯拉曼散射成像技术<sup>[47]</sup>显著提高了拉曼信号相对于背景信号的信噪比, 实现了生物样本化学组分的三维高分辨率成像. 受激拉曼散射成像进一步提高了拉曼散射成像的信噪比, 实现了对生物小分子(如脂质)的观察<sup>[48]</sup>. 近期, 一种电子预共振受激拉曼散射显微镜拓展了可成像的生物分子种类, 实现了多达16种颜色的活细胞成像和8种颜色的脑组织成像<sup>[49]</sup>. 基于散射、干涉、偏振和相位调制等物理过程和光场参数发展的无标记光学成像技术, 可对亚细胞微观结构、脂类等不易被标记的物质以及高散射介质成像, 还可以通过选择振动光谱对生物体内的特定小分子物质(如药物等)以及生物大分子(如核酸、蛋白质等)进行无需标记的成像, 将成为极有潜力的活体成像手段.

(5) 利用先进的光学成像重建机制. 发展先进的光学成像重建机制, 充分利用数字探测器、图像重建算法、大数据与人工智能等, 可以突破经典光学成像系统的局限性, 实现多种成像参数的提升. 例如, 光场成像利用微透镜将成像系统的光瞳分为若干个小区域, 利用每个光瞳区域形成的二维图像, 经过算法重建样本的三维结构<sup>[50]</sup>. 这一技术被应用到神经光学成像中, 实现了秀丽隐杆线虫和斑马鱼全脑的三维高速显微成像<sup>[51]</sup>. 基于部分相干光源和全息显微成像技术, 无需

光学透镜, 仅使用阵列LED光源和成像芯片就构建出高空间带宽积的成像系统<sup>[52]</sup>. 基于计算摄像原理, 还可实现多维多尺度高分辨率计算摄像显微成像<sup>[53]</sup>, 获取小鼠全脑皮层表面神经与血管高分辨的图像. 此外, 随着近年来计算机计算能力的不断提升和深度学习算法的蓬勃发展, 基于大数据和人工智能的计算光学成像方法在优化光学成像信噪比、提高成像分辨率、提升成像速度和功能特异性上均表现出巨大的潜力.

(6) 发展新型的光学成像器件. 光学成像技术的创新离不开新型光学器件的研发. 发展低成本、高像素的空间光调制器和微振镜阵列可提高光场波前调制的灵活性与效率. 发展适用于生物医学成像的特种光纤、光纤扫描器件和微型显微成像物镜可促进光学内窥镜技术的发展, 获取人体胃部早期癌症及癌前病变不同阶段的高分辨图像<sup>[54]</sup>. 内窥镜器件与技术也可应用于自由活动小鼠脑功能的基础研究, 弥补实时观测神经环路层次的神经活动时缺乏有效技术的不足<sup>[55]</sup>. 基于微型化器件和头戴式光学系统的双光子<sup>[56]</sup>和三光子<sup>[57]</sup>显微成像技术, 可实现自由活动小鼠大脑神经活动的高分辨率成像. 发展以超表面透镜为代表的二维光学器件<sup>[58,59]</sup>, 可以突破传统衍射光学器件的局限, 实现高度集成、微型化且不受限于应用波长的光学成像系统, 为拓展光学成像在生物医学领域的应用提供了更多的可能性.

### 3 发展新型标记技术

借助荧光或生物发光的分子探针, 研究人员利用显微光学成像检测技术能实时地监测到活细胞中分子的相关信息. 这些信息可包括分子的运动轨迹、空间分布以及定性或定量监测参与生化反应的分子浓度变化等. 为实现相关目标, 探针的标记与信号检测是两个重要的环节. 应用于活细胞与活体监测的荧光分子探针主要包括: 基因编码的探针系列(如荧光蛋白与荧光素酶)、有机小分子荧光染料系列以及荧光纳米颗粒(图3).

以绿色荧光蛋白为代表的基因编码探针在生物学基础研究中应用最为广泛. 相关研究主要分为两个方向: (i) 寻找并克隆具有优良光学特性的多色发光蛋白. 例如, 从各种海洋生物(如水母、海葵等物种)体内克隆出发光基因(包括荧光蛋白与荧光素酶), 并不断

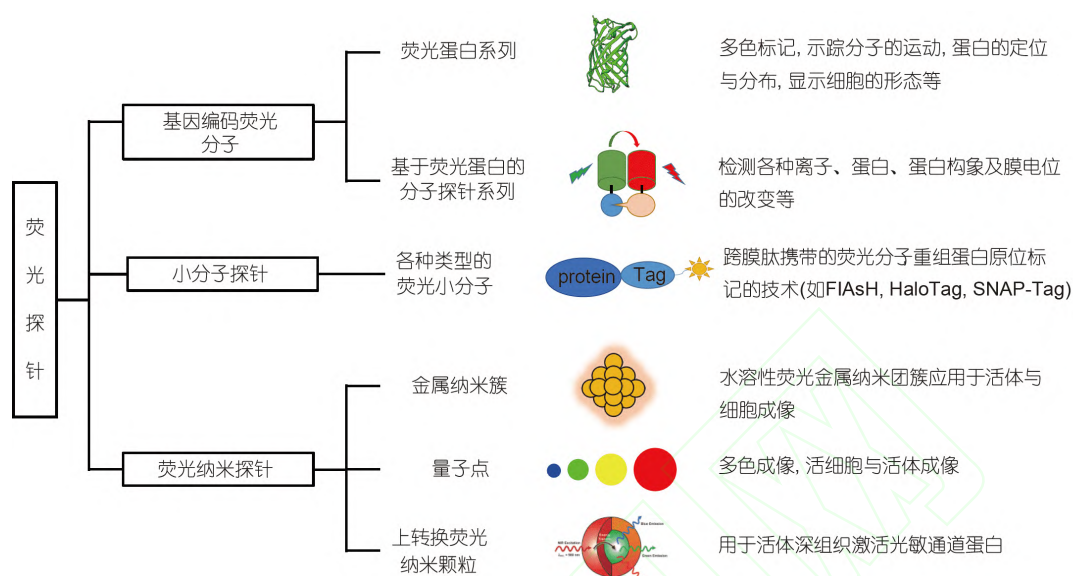


图3 荧光探针的分类及成像应用

Figure 3 Classifications and imaging applications of fluorescence probes

地进行突变优化。突变体优化的一个目标是要扩展新的发光光谱颜色,如目前突变体的光谱已遍布于紫外区到近红外区;另一个优化目标是要增加突变体的亮度。利用已开发的高亮度荧光突变体多色荧光蛋白,通过多色成像,研究人员能同时实现多分子或多细胞的并行检测并加以区分,如利用多种荧光蛋白的组合技术而发展的脑虹(Brainbow)技术可用于分辨错综复杂的神经元“线路”<sup>[60]</sup>。(ii) 发展基于发光蛋白设计的功能性分子探针。例如,发展用于探测细胞内pH值、钙离子浓度等其他基因编码的传感器,可用于监测细胞内相应分子的生化反应的变化过程。

具有生物相容性的有机小分子荧光染料也得到快速发展。由于这些有机小分子荧光染料相对于绿色荧光蛋白(分子量为27 kD)更小,因此对标记分子的生物功能干扰较小,小分子染料可作为荧光蛋白标记分子的替代物。但利用小分子染料存在两个困难:首先,许多小分子不具有透膜的能力;其次,小分子不能有效与目标分子偶联,因而应用受限。为了解决这些问题,可使用跨膜肽携带小分子荧光染料从而有效地实现透膜进入细胞<sup>[61]</sup>;一系列重组蛋白原位标记的技术(如FlAsH, HaloTag, SNAP-Tag<sup>[62]</sup>等)也能很好地解决小分子染料靶向目标分子困难的问题。上述的荧光蛋白与重组蛋白原位标记技术需要表达外源基因来实现对

分子的标记,显然不适用于临床。但安全的小分子(如ICG)在临床应用上具有明显优势,如将ICG结合第二近红外波长窗口(1000~1700 nm)的光学成像仪,可以在临床手术中进行荧光成像导航,指导切除肿瘤原发病灶和转移病灶<sup>[63]</sup>。

荧光分子标记方法的推广与应用大大加速了定量光学显微镜、细胞内和细胞间相互作用的检测技术的发展。荧光分子广泛用于监测活细胞活动、基因表达、蛋白质定位和动力学、蛋白质相互作用、细胞分裂、染色体复制和组织、细胞内运输途径、细胞器生成与消亡等。此外,早期发展起来的生物物理荧光方法,如荧光共振能量转移、荧光相关光谱、荧光交叉关系光谱、光漂白后的荧光恢复、全内反射显微镜、荧光寿命成像<sup>[64]</sup>以及超分辨成像方法也相继得以发展,使得高于衍射极限的空间分辨率成像也成为现实。

分子荧光探针的未来发展趋势体现为以下几点。

以绿色荧光蛋白为代表的基因编码荧光探针方面:(i) 对不同颜色的荧光蛋白进行优化,开发出性能稳定、更高亮度的蛋白分子<sup>[65]</sup>以及荧光素酶发光体系<sup>[66]</sup>,提高成像的灵敏度。(ii) 拓展成像的光谱范围,尤其需要发展高亮度的深红色荧光分子<sup>[67]</sup>或深红色荧光素酶发光体系<sup>[68]</sup>,进一步提高活体成像检测灵敏度。(iii) 发展具有特殊功能、高效基因编码的荧光探



针, 用于活细胞或活体研究细胞内分子的精细结构和功能. 例如, 开发并优化具有高效的光激活或光转换特性的荧光蛋白, 提高成像的效率与分辨率. (iv) 针对生物体内的各种重要分子设计针对性的检测探针, 如针对神经元的钙信号<sup>[69]</sup>、膜电压变化<sup>[70]</sup>、递质类信号<sup>[71]</sup>等的检测, 用于动态检测这些分子在生物体内的活动变化. 近年来发展的针对膜电位变化的基因编码荧光传感器, 如ArcLight<sup>[72]</sup>、ASAPs<sup>[73]</sup>、AcemNeon<sup>[70]</sup>、Archon1<sup>[74]</sup>等荧光基因编码电压指示器, 通过病毒颅腔注射并结合特定基因类型的转基因鼠, 能实现不同细胞类型的靶向标记, 为高通量、高分辨率、长期记录神经元的电信号提供了可能. 将来应进一步发展高保真、高动态变化、快速响应的膜电位变化的基因编码荧光传感器. (v) 发展具有光活化特性的荧光蛋白分子, 用于对细胞生物过程的干预或基因表达的调控, 从而使用光学方法操控细胞.

有机荧光染料和荧光纳米探针方面: (i) 发展适用于实验或临床检测分析的高灵敏探针, 针对离子、小分子核酸、蛋白质及其功能进行分析与检测<sup>[75]</sup>. (ii) 针对超分辨成像方面, 发展出不同光谱的、具有生物相容的、可透过细胞膜的高亮度光转换荧光分子<sup>[61]</sup>. (iii) 发展特异性结合特定蛋白的可识别荧光分子, 用于细胞中特定基因的标记成像<sup>[76]</sup>. (iv) 开发新型的半导体量子点、金属纳米簇、上转换纳米颗粒代替荧光基团, 或者以金纳米颗粒、碳纳米管、氧化石墨烯等代替淬灭基团, 构建新型的荧光纳米探针<sup>[77]</sup>.

#### 4 发展面向生物医学共性问题的多尺度多维度成像技术

生命体是一个高度复杂的多层次系统, 包含从分子调控、细胞分化和发育、组织器官形成, 到个体发育、衰老、甚至死亡等多尺度、多维度的结构与功能信息(图4). 以大脑为例, 在结构上具有多个空间尺度, 从纳米(单个突触)到厘米(整个大脑); 在功能上具有多个时间尺度, 从亚毫秒(突触事件)到数年(行为变化); 存在多种信息维度, 包括空间分布信息、物质成分信息、化学环境信息等. 目前任何一种成像技术都难以在多尺度范围全方位、多参数地揭示生物学特征, 导致不同成像方法在宏观与微观尺度上所获取信息的相关度低. 发展多尺度多维度的成像技术, 获取多尺度和

高时空分辨率的信息, 对全面、准确理解生命系统具有重要意义, 是生物医学光学成像的发展方向之一.

以脑科学为例, 全脑范围脑连接的测量主要研究不同尺度下的全脑高分辨精准成像与空间定位方法, 建立与之相应的定位基准和标准化数据采集流程, 实现具有明确空间尺度和定位含义的精细脑网络结构与功能信息的获取和分析, 提取脑连接时空特征, 提供跨层次、多尺度的大数据, 从而揭示和掌握脑空间信息的时空变化特征及规律<sup>[78]</sup>. 以显微光学切片断层成像(micro-optical sectioning tomography, MOST)系列技术为核心的全脑定位系统(brain positioning system)是其中的代表性技术, 具备对啮齿类全脑进行多尺度成像的能力, 可提供亚微米的体素分辨率和空间定位精度, 能够同时获取特定标记脑连接结构或功能信息及其共定位解剖参考, 成像体范围可达到小鼠全脑(约 $(10 \times 10 \times 10) \text{ mm}^3$ )<sup>[79-86]</sup>.

生物医学光学成像能够结合声、电、磁、核素等多种模态, 打通时空尺度的壁垒, 精准描绘生命活动的时空过程. 多尺度多维度成像技术既包含单一模态成像, 也包含多模态成像, 如OCT/MRI系统<sup>[87]</sup>、FMT/MRI系统<sup>[88]</sup>(荧光分子断层成像, fluorescence molecular tomography, FMT)、BLT/CT系统<sup>[89]</sup>(生物发光断层成像, bioluminescence tomography, BLT), 以及FMT/PET/CT三模系统<sup>[90]</sup>等. 光学成像技术与医学影像技术结合, 得到了更全面的生理病理信息. 例如, 传统的MRI由于其分辨率不高, 对病灶的精确定位能力有限. 而OCT/MRI系统中, MRI获取的宏观尺度形态与OCT提供的微观局部结构相结合, 使病灶定位精度达到亚毫米级.

多尺度多维度光学成像技术潜力巨大, 但也面临着诸如大数据存储和处理、实时性、图像融合等方面的挑战. 未来多尺度多维度光学成像可以从以下3个方面进行研究.

(1) 多组学多模态成像. 发展能精确获取从纳米、微米到米等多尺度和多模态的光学成像技术, 通过整合多尺度多模态的图像信息以及基于高通量测序的基因组和转录组等, 用于全方位多维度地描述生命现象、疾病诊断和治疗等. 例如, 详细精准地绘制脑细胞类型图谱是认识脑的一个必备基础. 传统的电生理、分子鉴定和新兴的MOST技术主要是从单一维度开展细胞的分型研究. 未来可发展基于形态与组学空

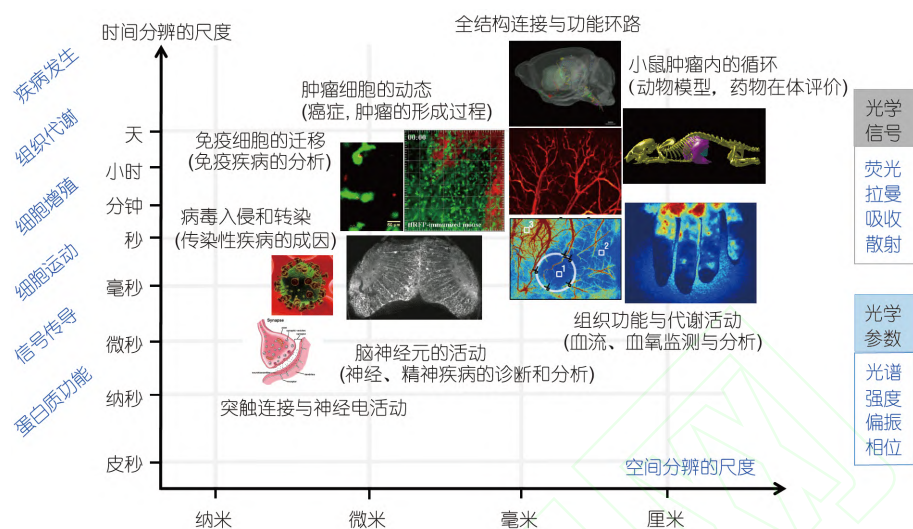


图 4 生物体中多尺度多维度的结构和功能信息及其应用

Figure 4 Multi-scale and multi-dimensional structural and functional information in organisms and their applications

间信息的细胞分型全脑测绘新技术和仪器,例如, MOST在单细胞水平解析和定位全脑神经连接形态,为神经元分类研究精准测绘神经解剖结构提供了神经元空间形态信息,且融合细胞转录组测序提供的RNA分子信息、蛋白质组的检测信息甚至更多维度的信息,有助于建立更准确的细胞分型标准,在单细胞水平实现全脑三维空间内的神经元分型,绘制出完整的全脑介观神经网络连接图谱。

(2) 活体动态光学成像. 光学成像研究正逐渐由原来的离体观测到活体研究,由结构成像到功能成像,由静态检测到动态观察. 为此,需要发展能与生物化学、分子生物学、分子遗传学等研究手段互补的多尺度结构与功能成像方法和技术,全器官高分辨揭示基因表达、细胞信号、功能信息及网络连接的时空动态和内在联系,实现从纳米到厘米、从微秒到数月的活体成像. 活体动态光学成像的挑战是如何在复杂的生物活体内发展更高空间分辨率、更高时间分辨率(实时检测)、更高检测灵敏度和更多检测参数的成像新技术,以及面向复杂多样应用的智能化仪器. 活体多尺度光学成像应突破复杂环境中光学信号的产生、增强、调控和测量,建立生命活动过程的多参数光学表征,可研制活体超高分辨光学分子成像、活体多细胞快速并行显微光学成像、活体组织器官光学成像以及整体光学成像等多种技术与仪器,在分子、细胞、组织、器

官、整体等多个层次上全面准确地描述生命活动。

(3) 图像融合、处理与分析计算. 多尺度多维度光学图像数据有数据量大、维度高、关联度强、多源异构等特点. 以脑科学研究为例,微米体素分辨率下,小鼠鼠脑的数据量达到TB级,大型灵长类脑的数据量达到PB级. 实现海量高维数据的存储、分析、整合和可视化,是多尺度多维度光学成像技术发展的关键环节. 未来可建立海量医学图像库和分布式可靠存储与管理系统,面向多尺度生物医学图像数据融合的应用支持及可视化平台,基于深度学习、内存计算、图计算的海量成像数据高效处理与深度分析挖掘平台,有效开展纳/微观、介观到宏观的多尺度生物体结构与功能成像研究,对于基因表达、细胞信号、组织代谢及功能网络的时空动态和内在联系进行科学发现和知识挖掘。

## 5 发展面向临床应用的光学成像器件与仪器

临床上的光学成像技术包括离体和在体两类. 其中,最常用的离体光学成像技术是基于显微成像的病理学检测,包括在组织、细胞和亚细胞水平对样本的形态结构特征进行成像,结合抗体技术对目标蛋白的定位、分布和表达进行成像(免疫组化、免疫荧光),



以及核酸检测/DNA测序中的光学成像(显色原位杂交、荧光原位杂交)等。离体的光学成像技术所使用的设备主要为显微镜,包括明场、暗场、荧光三种模式。在体的光学成像技术包括内窥镜、手术显微镜、眼底相机、光学相干断层成像等。

仪器的研制离不开核心器件,核心器件的诞生又加速了光学成像仪器在临床中的应用。临床中使用到的关键器件包括特种光源(超快激光、连续谱激光、微型激光器等)、镜头(自聚焦透镜、高数值孔径镜头、长工作距离镜头等)、光调制器(声光调制器、电光调制器、空间光调制器、可变形反射镜等)、光偏转器(共振反射镜、MEMS振镜、声光偏转器等)、特种光纤(光子晶体光纤、成像光纤束等)、光谱模块等。仪器是实施临床应用的载体,其中的光学技术包括器件技术和整机集成技术,两者共同推进仪器的发展。

面向临床应用的光学成像器件与仪器的发展应以充分发挥光学成像优势,突破光学成像现有瓶颈为方向,包括以下两个方面。

(1) 提高器件与仪器的时空指标。光学成像比放射成像和声波成像具有更高的时空分辨率,应充分发挥这一优势。在器件方面,开发高数值孔径低像差物镜和高量子效率高像素数低噪声相机是提升空间分辨率的最直接方法。光学成像还可发挥实时检测的优势,满足临床诊疗所需的高效与快速。对于宽场成像,成像速度取决于相机帧率;对于扫描成像,成像速度则主要受限于扫描器的速度;提升成像速度还可以通过优化物镜像差设计、提升物镜成像视场、优化图像拼接算法来实现。此外,大量新技术也具备进入临床应用的潜力。例如,傅里叶叠层成像可借助结构性照明多次曝光,利用低数值孔径大视场范围的物镜获取高分辨率成像,可省略平移台从而简化病理显微镜结构<sup>[91]</sup>;相位对焦技术可测量离焦程度和方向,从而实现快速对焦,相比传统基于图像对比度的对焦方法,速度大大提升<sup>[92]</sup>。

(2) 提高器件与仪器的微型化和国产率。生命活动的可视化研究及临床疾病的精准诊疗,迫切需要对生物体内部脏器进行高分辨可视化的技术手段。器件与仪器的微型化可提高便携性,从而实现床边诊断,同时也利于实现微创、无创诊疗。例如,共聚焦内窥成像是一种微型化的探头式成像技术,是唯一具有细胞分辨能力的内窥诊疗手段,是近年来内窥镜领域的

颠覆性技术。共聚焦内窥镜使用微型光纤扫描器<sup>[93]</sup>和显微物镜<sup>[94]</sup>,使内窥镜探头外径仅为2.6 mm,可实现光学活检,实时提供常规病理切片显示的细胞结构信息,并能有效提高组织活检的检出率。新型的微型透镜和光纤器件有助于进一步增加成像深度和层析能力<sup>[95]</sup>。

提高器件和仪器的国产率,从而降低研制和维护成本,是光学诊疗推广应用并向基层普及的必要条件。例如,宫颈细胞病理学检查可实现宫颈癌的早发现早治疗,因现有显微镜体积大、价格昂贵,宫颈筛查需要采集细胞病理样本并送至检测机构,难以覆盖大中城市以外地区,尤其是农村地区。基于塑料非球面透镜的微型显微镜或者内窥式体内原位检测技术有望在该领域发挥潜力。

## 6 融合人工智能与光学成像

在光学成像中,成像速度、深度、视场、空间分辨率、图像信噪比等参数相互影响并相互制约。机器学习技术可通过挖掘和学习成像数据信息,对成像对象进行精准估计<sup>[96]</sup>。特别是以深度学习为代表的机器学习技术,能模拟复杂的成像过程,不受限于光学成像的原理和装置,可极大改进成像结果<sup>[97]</sup>。深度学习在光学成像的应用主要包括如下方面。

(1) 时空分辨率及信号水平提升。深度学习技术通过学习建立高低分辨率图像之间的映射,能够从低分辨图像推断出高分辨图像,且推断出的高分辨图像与低分辨图像保持时间分辨率一致<sup>[98]</sup>。深度学习技术可从低信噪比图像预测其相应的高信噪比图像,在缩短曝光时间、减少光毒性的情况下,实现长时程高时空分辨率成像<sup>[99]</sup>。超分辨定位显微镜技术常常通过叠加数千帧图像获取一帧超分辨图像,限制成像的时间分辨率。将深度学习网络用于超分辨定位显微成像技术,能识别出更加密集分子位置,同时学习高分辨图像结构特征,构成超分辨图像所需成像数据的帧数能因此降低两个量级,显著提升时间分辨率<sup>[100]</sup>。

(2) 多模态图像转换。不同成像模态有各自独特的优势,而深度学习能构建起不同成像模态的纽带,融合各模态的优势。相比荧光成像,无标记透射光学成像能避免光毒性及荧光分子对生物组织的影响,但无特异性标识。深度学习技术可以将无标记成像数据转换为

相应的荧光成像数据, 对生物样本的长时程成像有重要的应用价值<sup>[101]</sup>. 通过对同一生物样本成像, 深度学习能建立起共聚焦显微图像和STED超分辨显微图像之间的映射关系, 将共聚焦显微图像转换为STED图像<sup>[102]</sup>, 也可以建立宽场成像与共聚焦显微镜成像数据的联系, 获得具有层析能力的大视场图像<sup>[103]</sup>.

(3) 光学显微图像分割. 传统的图像分割方法尽管充分考虑图像的先验信息, 但仍需设置系列阈值识别信号与背景, 难以对低信噪比、信号动态范围大、背景不均匀的图像实现准确分割. 而深度学习分割网络能够自动学习信号不同尺度形态特征来识别信号与背景, 极大提升光学显微图像分割的准确度. Unet网络是极具代表性的一种网络框架, 在光学显微图像分割中得到广泛应用<sup>[104]</sup>. 针对全脑血管数据, 简化结构的深度学习网络在不损失重建精度的情况下, 图像分割速度比传统的3D-UNet网络提升了50倍, 首次实现全脑尺度血管分割, 为特定类型的海量光学图像分割提供了解决思路<sup>[105]</sup>.

深度学习技术还在相位成像<sup>[106]</sup>、散斑成像<sup>[107]</sup>、光纤成像<sup>[108]</sup>、相干成像<sup>[109]</sup>等领域展示了应用潜力. 同时, 深度学习技术与光学成像的融合面临获取高质量训练集、网络生成数据的高通量、在光学成像中的

泛化能力等挑战. 未来的深度学习技术需要与具体应用结合, 产生虚拟的量化光学成像系统, 降低训练集获取难度. 在识别或分割密集分布的生物结构时, 将超分辨网络与分割网络串联, 无需高分辨成像数据用于训练网络, 可输入低分辨图像直接产生高分辨分割结果. 未来的深度学习技术还可与光学成像系统相结合, 构建数据与模型双驱动的网络结构, 精简网络结构并提升网络的泛化性能力.

## 7 结束语

通过探索光学成像的新机制与新方法、光学标记技术, 发展面向生物医学共性问题的多尺度多维度成像技术、面向临床应用的光学成像器件与仪器, 融合人工智能与光学成像, 都将进一步推进光学成像在生物医学领域的应用. 未来除了在基础科学问题上突破瓶颈, 更需要以脑科学、临床诊疗等重大需求为牵引, 实现原理、器件、仪器与应用的全链条、交叉创新. 随着物理、化学、生物医学等基础学科的深入研究, 以及计算机科学与技术、先进制造与加工产业的发展, 生物医学光学成像必然会有变革性发展与更广阔的应用前景.

**致谢** 感谢华中科技大学胡庆磊博士、杨杰副教授、全庭伟副教授、黄歆媛博士、高秀娟博士、袁菁教授、张智红教授、曾绍群教授、龚辉教授, 海南大学刘谦教授和加州大学伯克利分校的陈韡博士对本文的建议和修改.

## 参考文献

- 1 Sheppard C J R, Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscope. *J Microsc*, 2011, 124: 107–117
- 2 Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography. *Science*, 1991, 254: 1178–1181
- 3 Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, 248: 73–76
- 4 Ormo M, Cubitt A B, Kallio K, et al. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 1996, 273: 1392–1395
- 5 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802–805
- 6 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 7 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, 19: 780–782
- 8 Lord S J, Conley N R, Lee H D, et al. A photoactivatable push-pull fluorophore for single-molecule imaging in live cells. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 9204–9205
- 9 Pang K, Gu B, Liu F, et al. Recent advances in fluorescence-based *in vivo* flow cytometry. *J Innov Opt Health Sci*, 2019, 12: 1930008
- 10 Lin J L, Shen Z Z, Liu L, et al. Tracking the spatial distribution of Cx43 in different differentiated esophageal cancer cells using fluorescence images (in Chinese). *Acta Laser Biol Sin*, 2019, 28: 439–444 [林珏龙, 沈志忠, 刘柳, 等. 用荧光图像示踪不同分化的食管癌细胞Cx43的空间分布].

- 间分布. 激光生物学报, 2019, 28: 439–444]
- 11 Gao L, Liang J, Li C, et al. Single-shot compressed ultrafast photography at one hundred billion frames per second. *Nature*, 2014, 516: 74–77
  - 12 Wu J, Liang Y, Chen S, et al. Kilohertz two-photon fluorescence microscopy imaging of neural activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2020, 17: 287–290
  - 13 Zhang T, Hernandez O, Chrapkiewicz R, et al. Kilohertz two-photon brain imaging in awake mice. *Nat Methods*, 2019, 16: 1119–1122
  - 14 Kazemipour A, Novak O, Flickinger D, et al. Kilohertz frame-rate two-photon tomography. *Nat Methods*, 2019, 16: 778–786
  - 15 Hoffman D P, Shtengel G, Xu C S, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells. *Science*, 2020, 367: eaaz5357
  - 16 de Boer P, Hoogenboom J P, Giepmans B N G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nat Methods*, 2015, 12: 503–513
  - 17 Cheng H, Luo Q, Zeng S, et al. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution. *J Biomed Opt*, 2003, 8: 559–564
  - 18 Li P, Ni S, Zhang L, et al. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging. *Opt Lett*, 2006, 31: 1824–1826
  - 19 Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs. *Science*, 2012, 335: 1458–1462
  - 20 Fujimoto J G, Pitris C, Boppart S A, et al. Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia*, 2000, 2: 9–25
  - 21 Svoboda K, Yasuda R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, 2006, 50: 823–839
  - 22 Betzig E. Nobel lecture: Single molecules, cells, and super-resolution optics. *Rev Mod Phys*, 2015, 87: 1153–1168
  - 23 Evans C L, Xie X S. Coherent anti-stokes raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annu Rev Anal Chem*, 2008, 1: 883–909
  - 24 Heimstadt O. Das fluoreszenzmikroskop. *Z Wiss Mikrosk*, 1911, 28: 330–337
  - 25 Minsky M. Microscopy apparatus. US patent 3 013 467. 1961 Dec 19
  - 26 Huiskens J, Swoger J, Del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 2004, 305: 1007–1009
  - 27 Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, 2008, 322: 1065–1069
  - 28 Xu C, Zipfel W, Shear J B, et al. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10763–10768
  - 29 Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nat Photon*, 2013, 7: 205–209
  - 30 Betzig E, Lewis A, Harootunian A, et al. Near field scanning optical microscopy (NSOM). *Biophys J*, 1986, 49: 269–279
  - 31 Harootunian A, Betzig E, Isaacson M, et al. Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy. *Appl Phys Lett*, 1986, 49: 674–676
  - 32 Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 168–172
  - 33 Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 2000, 198: 82–87
  - 34 Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8206–8210
  - 35 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–796
  - 36 Hong J, Wang Y, Chen X, et al. Fluctuations of temporal contrast in laser speckle imaging of blood flow. *Opt Lett*, 2018, 43: 5214–5217
  - 37 He H, Liao R, Zeng N, et al. Mueller matrix polarimetry—An emerging new tool for characterizing the microstructural feature of complex biological specimen. *J Lightwave Technol*, 2019, 37: 2534–2548
  - 38 Wilson T, Neil M A, Juškaitis R. Real-time three-dimensional imaging of macroscopic structures. *J Microsc*, 1998, 191: 116–118
  - 39 Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, 2008, 320: 1332–1336
  - 40 Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc*



- Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 13081–13086
- 41 Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, et al. Observing the cell in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science*, 2018, 360: eaaq1392
- 42 Yoon S, Kim M, Jang M, et al. Deep optical imaging within complex scattering media. *Nat Rev Phys*, 2020, 2: 141–158
- 43 Booth M. Wave front sensor-less adaptive optics: a model-based approach using sphere packings. *Opt Express*, 2006, 14: 1339–1352
- 44 Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. *Nat Methods*, 2010, 7: 141–147
- 45 Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, et al. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 2995–2999
- 46 Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, 319: 810–813
- 47 Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Phys Rev Lett*, 1999, 82: 4142–4145
- 48 Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated raman scattering microscopy. *Science*, 2008, 322: 1857–1861
- 49 Wei L, Chen Z, Shi L, et al. Super-multiplex vibrational imaging. *Nature*, 2017, 544: 465–470
- 50 Levoy M, Ng R, Adams A, et al. Light field microscopy. *ACM Trans Graph*, 2006, 25: 924–934
- 51 Prevedel R, Yoon Y G, Hoffmann M, et al. Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy. *Nat Methods*, 2014, 11: 727–730
- 52 Greenbaum A, Luo W, Su T W, et al. Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy. *Nat Methods*, 2012, 9: 889–895
- 53 Fan J, Suo J, Wu J, et al. Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution. *Nat Photon*, 2019, 13: 809–816
- 54 Wang J, Yang M, Yang L, et al. A confocal endoscope for cellular imaging. *Engineering*, 2015, 1: 351–360
- 55 Qin H, Fu L, Hu B, et al. A visual-cue-dependent memory circuit for place navigation. *Neuron*, 2018, 99: 47–55.e4
- 56 Zong W, Wu R, Li M, et al. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice. *Nat Methods*, 2017, 14: 713–719
- 57 Kliutchnikov A, Wallace D J, Frosz M H, et al. Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats. *Nat Methods*, 2020, 17: 509–513
- 58 Khorasaninejad M, Chen W T, Devlin R C, et al. Metalenses at visible wavelengths: diffraction-limited focusing and subwavelength resolution imaging. *Science*, 2016, 352: 1190–1194
- 59 Lassaline N, Brechbühler R, Vonk S J W, et al. Optical Fourier surfaces. *Nature*, 2020, 582: 506–510
- 60 Livet J, Weissman T A, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 2007, 450: 56–62
- 61 Han Y, Li M, Qiu F, et al. Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions. *Nat Commun*, 2017, 8: 1307
- 62 Jing C, Cornish V W. Chemical tags for labeling proteins inside living cells. *Acc Chem Res*, 2011, 44: 784–792
- 63 Hu Z, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 259–271
- 64 Liu X, Lin D, Becker W, et al. Fast fluorescence lifetime imaging techniques: a review on challenge and development. *J Innov Opt Health Sci*, 2019, 12: 1930003
- 65 Bindels D S, Haarbosch L, van Weeren L, et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat Methods*, 2017, 14: 53–56
- 66 Yeh H W, Karmach O, Ji A, et al. Red-shifted luciferase-luciferin pairs for enhanced bioluminescence imaging. *Nat Methods*, 2017, 14: 971–974
- 67 Oliinyk O S, Shemetov A A, Pletnev S, et al. Smallest near-infrared fluorescent protein evolved from cyanobacteriochrome as versatile tag for

- spectral multiplexing. [Nat Commun](#), 2019, 10: 279
- 68 Iwano S, Sugiyama M, Hama H, et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. [Science](#), 2018, 359: 935–939
- 69 Broussard G J, Liang Y, Fridman M, et al. *In vivo* measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging. [Nat Neurosci](#), 2018, 21: 1272–1280
- 70 Gong Y, Huang C, Li J Z, et al. High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor. [Science](#), 2015, 350: 1361–1366
- 71 Patriarchi T, Cho J R, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. [Science](#), 2018, 360: eaat4422
- 72 Jin L, Han Z, Platisa J, et al. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. [Neuron](#), 2012, 75: 779–785
- 73 Yang H H, St-Pierre F, Sun X, et al. Subcellular imaging of voltage and calcium signals reveals neural processing *in vivo*. [Cell](#), 2016, 166: 245–257
- 74 Piatkevich K D, Jung E E, Straub C, et al. A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters. [Nat Chem Biol](#), 2018, 14: 352–360
- 75 Pershin A, Hall D, Lemaure V, et al. Highly emissive excitons with reduced exchange energy in thermally activated delayed fluorescent molecules. [Nat Commun](#), 2019, 10: 597
- 76 Duc H, Ren X. Labelling halotag fusion proteins with halotag ligand in living cells. [Bio Protocol](#), 2017, 7
- 77 Jiang Y, Chen Z, Han Y, et al. Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution. [Nature](#), 2018, 559: 343–349
- 78 Luo Q M. Brainsmatics—bridging the brain science and brain-inspired artificial intelligence. [Sci Sin Vitae](#), 2017, 47: 1015–1024 [骆清铭. 脑空间信息学——连接脑科学与类脑人工智能的桥梁. [中国科学: 生命科学](#), 2017, 47: 1015–1024]
- 79 Li A, Gong H, Zhang B, et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain. [Science](#), 2010, 330: 1404–1408
- 80 Gong H, Zeng S, Yan C, et al. Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution. [NeuroImage](#), 2013, 74: 87–98
- 81 Zheng T, Yang Z, Li A, et al. Visualization of brain circuits using two-photon fluorescence micro-optical sectioning tomography. [Opt Express](#), 2013, 21: 9839–9850
- 82 Gong H, Xu D, Yuan J, et al. High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. [Nat Commun](#), 2016, 7: 12142
- 83 Jiang T, Long B, Gong H, et al. A platform for efficient identification of molecular phenotypes of brain-wide neural circuits. [Sci Rep](#), 2017, 7: 13891
- 84 Luo Y, Wang A, Liu M, et al. Label-free brainwide visualization of senile plaque using cryo-micro-optical sectioning tomography. [Opt Lett](#), 2017, 42: 4247–4250
- 85 Chen X, Zhang X, Zhong Q, et al. Simultaneous acquisition of neuronal morphology and cytoarchitecture in the same Golgi-stained brain. [Biomed Opt Express](#), 2018, 9: 230–244
- 86 Ning K, Zhang X, Gao X, et al. Deep-learning-based whole-brain imaging at single-neuron resolution. [Biomed Opt Express](#), 2020, 11: 3567–3584
- 87 John R, Rezaeiipoor R, Adie S G, et al. *In vivo* magnetomotive optical molecular imaging using targeted magnetic nanoprobe. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 8085–8090
- 88 Li B, Maafi F, Berti R, et al. Hybrid FMT-MRI applied to *in vivo* atherosclerosis imaging. [Biomed Opt Express](#), 2014, 5: 1664–1676
- 89 Gao Y, Wang K, An Y, et al. Nonmodel-based bioluminescence tomography using a machine-learning reconstruction strategy. [Optica](#), 2018, 5: 1451–1454
- 90 Liu M, Guo H, Liu H, et al. *In vivo* pentamodal tomographic imaging for small animals. [Biomed Opt Express](#), 2017, 8: 1356–1371
- 91 Zheng G, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy. [Nat Photon](#), 2013, 7: 739–745
- 92 Guo C, Bian Z, Jiang S, et al. OpenWSI: a low-cost, high-throughput whole slide imaging system via single-frame autofocus and open-source hardware. [Opt Lett](#), 2020, 45: 260–263

- 93 Wang Y, Li Z, Liang X, et al. Four-plate piezoelectric actuator driving a large-diameter special optical fiber for nonlinear optical microendoscopy. [Opt Express](#), 2016, 24: 19949–19960
- 94 Yang L, Wang J, Tian G, et al. Five-lens, easy-to-implement miniature objective for a fluorescence confocal microendoscope. [Opt Express](#), 2016, 24: 473–484
- 95 Wang J, Li H, Tian G, et al. Near-infrared probe-based confocal microendoscope for deep-tissue imaging. [Biomed Opt Express](#), 2018, 9: 5011–5025
- 96 Barbastathis G, Ozcan A, Situ G. On the use of deep learning for computational imaging. [Optica](#), 2019, 6: 921–943
- 97 Weigert M, Schmidt U, Boothe T, et al. Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy. [Nat Methods](#), 2018, 15: 1090–1097
- 98 Zhou H, Cai R, Quan T, et al. 3D high resolution generative deep-learning network for fluorescence microscopy imaging. [Opt Lett](#), 2020, 45: 1695–1698
- 99 Jin L, Liu B, Zhao F, et al. Deep learning enables structured illumination microscopy with low light levels and enhanced speed. [Nat Commun](#), 2020, 11: 1934
- 100 Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy. [Nat Biotechnol](#), 2018, 36: 460–468
- 101 Christiansen E M, Yang S J, Ando D M, et al. In silico labeling: predicting fluorescent labels in unlabeled images. [Cell](#), 2018, 173: 792–803.e19
- 102 Wang H, Rivenson Y, Jin Y, et al. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy. [Nat Methods](#), 2019, 16: 103–110
- 103 Zhang X, Chen Y, Ning K, et al. Deep learning optical-sectioning method. [Opt Express](#), 2018, 26: 30762–30772
- 104 Falk T, Mai D, Bensch R, et al. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry. [Nat Methods](#), 2019, 16: 67–70
- 105 Todorov M I, Paetzold J C, Schoppe O, et al. Machine learning analysis of whole mouse brain vasculature. [Nat Methods](#), 2020, 17: 442–449
- 106 Jo Y J, Cho H, Lee S Y, et al. Quantitative phase imaging and artificial intelligence: a review. [IEEE J Sel Top Quantum Electron](#), 2019, 25: 1–14
- 107 Li Y, Xue Y, Tian L. Deep speckle correlation: a deep learning approach toward scalable imaging through scattering media. [Optica](#), 2018, 5: 1181–1190
- 108 Borhani N, Kakkava E, Moser C, et al. Learning to see through multimode fibers. [Optica](#), 2018, 5: 960–966
- 109 Rivenson Y, Wu Y, Ozcan A. Deep learning in holography and coherent imaging. [Light Sci Appl](#), 2019, 8: 85



# Progress and prospect of biomedical optical imaging

FU Ling<sup>1</sup> & LUO QingMing<sup>2,1</sup>

*1 Britton Chance Center for Biomedical Photonics, MoE Key Laboratory for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;*

*2 School of Biomedical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China*

The interdisciplinary of optical imaging and biomedical science dates back to the seventeenth century when the first observation of microorganisms with the microscope. Over the centuries, optical imaging has continuously expanded its connotation and extension. Due to its advantages of high resolution, multi-scale, multi-dimensional, low radiation, and easy to integrate, it has shown a steady stream of vitality in the field of biomedical science ranging from basic research to clinical diagnosis and treatments. It provides transformative scientific instruments and tools for the acquisition, processing, and visualization of bioscience information. It is the source of innovation for human beings from observing microscopic biological structures to understanding dynamic life processes. The review starts with the developments of biomedical optical imaging, focusing on several essential directions of imaging technologies, and expounds its progress and future trends.

**optical imaging, microscopy, labeling technology, multi-scale, multi-dimensional, clinical applications, artificial intelligence**

doi: [10.1360/SSV-2020-0263](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0263)