

脑神经活动光学显微成像技术

莫驰^{1,2}, 陈诗源^{1,2}, 翟慕岳^{1,2}, 吴润龙³, 王子晨², 喻菁², 王爱民³, 陈良怡², 程和平^{1,2*}

1. 北京大学前沿交叉学科研究院, 北京大学-清华大学生命科学联合中心, 北京 100871;

2. 北京大学分子医学研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100871;

3. 北京大学信息科学技术学院, 北京 100871

* 联系人, E-mail: chengp@pku.edu.cn

2018-11-19 收稿, 2018-12-04 修回, 2018-12-05 接受, 2018-12-14 网络版发表

摘要 大脑包含数亿至数千亿的神经元以及更为复杂的神经突触连接网络, 是生物体中最复杂的器官. 脑科学是21世纪以来最重要的前沿新兴学科之一, 它的兴起标志着人类在认识自我、探索智慧和意识的本质中进入了一个新时代. 在活体中对大脑神经活动进行长时间、大视野、高时空分辨率的观测, 是解析大脑功能的关键. 光学显微成像技术以其时空分辨率高, 光学探针的特异性和多样性等优势, 成为了脑神经活动研究的重要工具. 针对大脑的高度散射、高速神经信号传递、超大神经元规模、精细突触连接结构等特性以及自由活动动物的脑神经活动观测需求, 本文将从超深、超快、大视场、超分辨、微型化5个发展方向, 概述包括多光子、红外二区、光声、光片、结构光以及自适应光学在内的多种光学显微成像技术在脑神经活动显微观测领域的发展进展及前沿动态, 并展望脑神经活动光学显微成像技术的未来发展方向与前景.

关键词 脑科学, 多光子荧光, 超分辨, 光片照明, 光声成像, 微型化, 荧光探针, 红外 II 区

脑科学是21世纪以来最重要的前沿学科之一. 它的兴起标志着人类认识自我、探索智慧和意识的本质、人工智能的开发进入了一个新时代. 世界发达国家相继启动了各具特色的脑科学计划. 美国在20世纪80年代就开始酝酿, 并在90年代启动“人类脑计划”的前期探索和研究. 2009年7月, 美国国立卫生研究院发起人脑连接组计划(Human Connectome Project). 2013年4月, 美国宣布启动“创新性神经技术大脑研究”计划(BRAIN Initiative). 同年10月, 欧洲开启“人脑工程”计划(The Human Brain Project, HBP). 其他国家如日本(Brain/MINDS)、澳大利亚(Australian Brain Initiative)、加拿大(Brain Canada)和韩国(Korea Brain Initiative)也纷纷跟进. 中国的脑计划于2013年萌芽, 2018年北京和上海的两个脑科学与类脑研究中心相继成立, 正式拉开中国脑计划的序幕, 2018年也

被称为“中国脑计划元年”.

大脑具有高度的复杂性, 人类大脑包含近千亿的神经元和超过百万亿纳米尺度的神经突触连接. 即使是只有人脑质量四千分之一的小鼠大脑, 也具有近一亿神经元. 如何在活体中对大脑神经活动进行长时间、大视野、高时空分辨率的观测, 是解析大脑中硬件的连接组下如何承载功能信息的关键. 即便将研究对象定为小鼠大脑, 实现单神经元分辨率的全脑神经活动记录(*in toto* recording of brain activity), 成像深度也需要达到7 mm, 并将产生约 10^8 量级的体素. “工欲善其事, 必先利其器”. 打造多模态跨尺度观测脑神经活动的技术体系, 正是现阶段脑科学最核心的任务.

目前发展较为成熟的脑成像技术包括X射线断层扫描成像(X-ray computed tomography, X-CT)、磁共

引用格式: 莫驰, 陈诗源, 翟慕岳, 等. 脑神经活动光学显微成像技术. 科学通报, 2018, 63: 3945–3960

Mo C, Chen S Y, Zhai M Y, et al. *In vivo* optical imaging of brain activity (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 3945–3960, doi: 10.1360/N972018-01142

振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射断层成像(positron emission computed tomography, PET)和超声成像(ultrasound imaging, UI), 它们都是临床上常用的医学影像技术. 此外还有脑电图(electroencephalogram, EEG)和脑磁图(magnetoencephalography, MEG)等研究手段, 这些都是在宏观到介观尺度上对大脑进行观测的重要工具. 近几十年来, 随着微电子学、材料科学、信息科学等学科的蓬勃发展, 光学成像技术在时空分辨率、光学探针的特异性和多样性等方面展现出优势, 为脑科学研究提供越来越多强有力的新工具.

本文将从超深、超快、大视场、超分辨、微型化五个发展方向, 概述光学显微成像技术在脑神经活动显微观测领域的发展动态, 并展望光学显微成像技术的未来发展方向与前景.

1 深层脑神经活动成像技术

生物组织是折射率不均一的高度散射介质, 光在其中的传播会受到极大影响. 人类大脑体积庞大, 仅是皮层的厚度就达到2.5~3 mm^[1], 外部还覆盖有厚度约6.5~7 mm的颅骨. 即使对于小鼠的大脑, 其皮层厚度(约1 mm)就已经接近传统光学成像的深度极限. 这限制了研究人员对皮层下方更深处的脑区, 例如海马体、丘脑、下丘脑等, 进行单神经元分辨率的在体观察与研究. 实现光学显微水平的小鼠全脑成像面临巨大挑战. 如何攻克成像深度壁垒实现高分辨率成像, 是脑显微成像亟待解决的关键技术问题.

光学成像的穿透深度主要由生物组织对光子的吸收和散射作用决定, 分别由吸收系数 μ_a 和散射系数 μ_s 描述, 分别表示一个光子在单位光程长度上发生吸收或散射的概率. 两者均为波长 λ 的函数. 在影响光学成像深度的多种因素中, 光的散射占主导地位. 生物组织中光子的散射过程复杂且难以定量分析, 通常使用以下公式近似得到散射系数^[2]

$$\mu_s(\lambda) = a/(1-g)(\lambda/500(\text{nm}))^{-b}, \quad (1)$$

其中, g 为各向异性系数, 定义为平均散射角余弦, 典型值为0.9^[3], 表明发生在生物组织中的散射通常为前向散射; 比例因子 a 及散射指数 b 是用于表征散射的波长依赖性的参数. 约化散射系数 μ'_s 与散射系数 μ_s 的关系为^[3]

$$\mu'_s = \mu_s(1-g), \quad (2)$$

表示一个光子在单位光程长度上发生等效各向同性散射的概率. μ'_s 与波长 λ 的关系可表示为

$$\mu'_s \propto \lambda^{-\alpha}. \quad (3)$$

在生物组织中, α 的取值范围在0.2~4之间^[4]. 图1(c)给出了不同生物组织和组织仿体的约化散射系数, 脑组织对光的散射较其他组织更为强烈. 由 μ_a 和 μ'_s 可以计算光子的传播平均自由程 l'_t ^[3]

$$l'_t = 1/(\mu_a + \mu'_s). \quad (4)$$

当光在生物组织中的传播距离超过 l'_t 后, 弹道光子及准弹道光子的比例将大幅降低, 以至于无法被有效探测. 对于波长在可见光及近红外范围内的光子, 在生物组织中的传播平均自由程 l'_t 约为1 mm^[5]. 当成像深度超过 l'_t 后, 共聚焦、多光子、光学相干层析等依赖弹道光子和准弹道光子的纯光学成像手段均无法有效成像. 因此 l'_t 也被称为光学成像深度的“软极限”^[5].

由(3)式可知, 使用更长波长的光进行成像可以降低光散射对成像的影响. 然而, 在波长1400~1500 nm附近以及1800 nm以上的范围, 水分子对光的吸收程度显著增加, 如图1(d)所示. 综合考虑组织的散射和吸收, 适合用于深度成像的波段呈现为几个窗口, 分别为700~1400和1500~1700 nm, 都在近红外区.

多光子成像及红外二区荧光成像等纯光学成像技术, 都利用了近红外光的穿透能力优势增加成像深度. 将光学成像与超声成像相结合的光声成像技术, 得益于超声信号拥有更强的生物组织穿透能力, 其成像深度远优于纯光学成像方法. 该技术在脑神经活动成像的应用中逐渐开始崭露头角.

1.1 多光子显微成像

自20世纪90年代发展起来的双光子显微成像技术^[6]是目前应用最广泛的活体脑光学成像方法, 随后发展出的三光子显微成像技术^[7]进一步拓展了高分辨率光学成像的成像深度. 在多光子显微成像技术中, 荧光基团同时吸收2或3个光子而被激发到高能级, 随后发射单个荧光光子. 这一过程所产生的荧光发射与激发光光强成平方或立方依赖关系, 聚焦区域的荧光信号大大强于非聚焦区域^[7,8], 赋予多光子显微成像光学断层的能力. 使用长波长的激发光极大地降低了组织散射, 增加了穿透深度. 除了空间聚焦外, 激发采用飞秒脉冲形式, 使能量在时间上聚

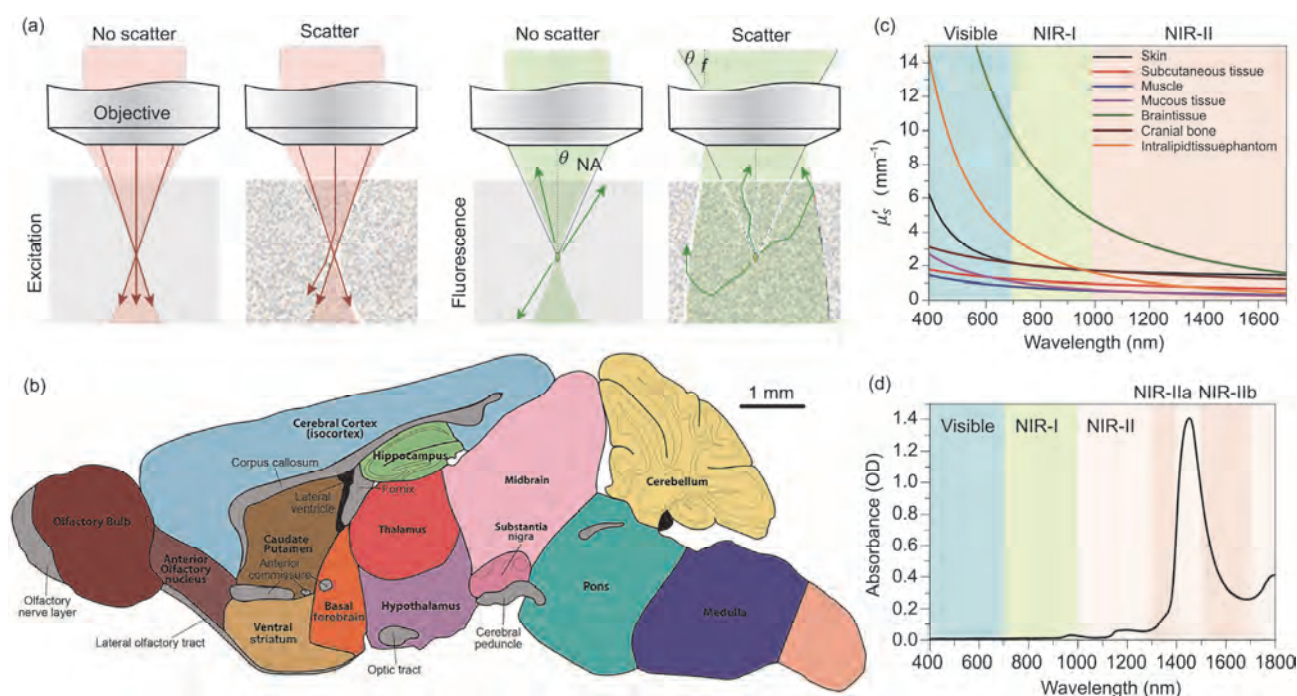


图1 生物组织深层成像的特点. (a) 透明组织及散射组织中的荧光激发与收集(以点扫描方式为例)^[8]; (b) 小鼠大脑中各脑区的尺寸及位置示意图(The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) Project, <http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=34298>); (c) 不同生物组织和组织仿体的光散射特性^[4]; (d) 水在可见光及近红外波段的吸收光谱^[4]

Figure 1 Characteristics of deep imaging of brain tissue. (a) Fluorescence excitation and collection in transparent and scattering tissues (take point scanning as an example)^[8]; (b) schematic diagram of the size and location of each brain region in the mice (The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) Project, <http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=34298>); (c) light scattering properties of different biological tissues and tissue phantom^[4]; (d) absorption spectra of water in visible and near-infrared band^[4]

焦, 增强多光子效应, 降低得到同样荧光信号所需照射到组织中的平均激发激光功率. 在典型的多光子显微镜中, 飞秒激光脉冲束被聚焦到组织中, 发射的荧光由单个光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)收集; 当扫描器件将激光焦点扫描在样品的不同位置时, PMT接收到的随时间变化的荧光信号被映射到相应的像素(pixel), 即可实现样品线扫描、面扫描和体成像. 由于PMT收集到的荧光一定来自焦点位置, 因此并不需要类似共聚焦扫描成像时的PMT前置的荧光收集针孔, 可以更加有效地收集来自散射组织深层产生的信号.

对于深层脑神经成像, 如果照射在样品表面的峰值和平均功率低于组织损伤阈值, 则可以随着深度增加以指数函数提高激光功率来补偿吸收和散射引起的信号衰减. 然而, 增加激光功率在提高信号强度的同时也会增加非焦背景信号, 信背比限制了多光子显微成像技术的最大成像深度^[9]. 研究人员为了实现更深的脑神经成像, 一方面通过增强激光的脉冲能量, 使得每个脉冲内更多的光子穿透深层组织,

比如Miller等人^[10]通过使用波长1215 nm, 脉冲能量400 nJ, 重复频率511 kHz的激光实现了深度约1.5 mm的小鼠脑组织脉管的双光子成像; 另一种增加成像深度的方式是增大激发波长, 通过使用1675 nm的激发波长, Horton等人^[11]在三光子显微镜下实现了约1.4 mm的成像深度(如图2(a)所示). 上述多光子显微成像的深度记录均在开颅窗下获得. 近年来, Wang等人^[16]在保证颅骨完好的情形下, 实现了穿颅三光子深层神经成像, 获取到最深至颅骨下500 μm 处的脑神经元动态图像. 理论上, 更长的激发波长以及更高阶的非线性激发可以提高信背比, 然而受限于脑组织对光的吸收作用, 适用于深层脑组织神经成像的激发光波长范围仅限于1300和1700 nm附近的两个光谱窗口^[4], 到目前为止结合此通光窗口的最深的多光子成像方式还是三光子激发.

1.2 近红外二区荧光成像技术

近红外波段可以划分为近红外一区(near-infrared I, NIR-I, 700~900 nm)和近红外二区(near-infrared II,

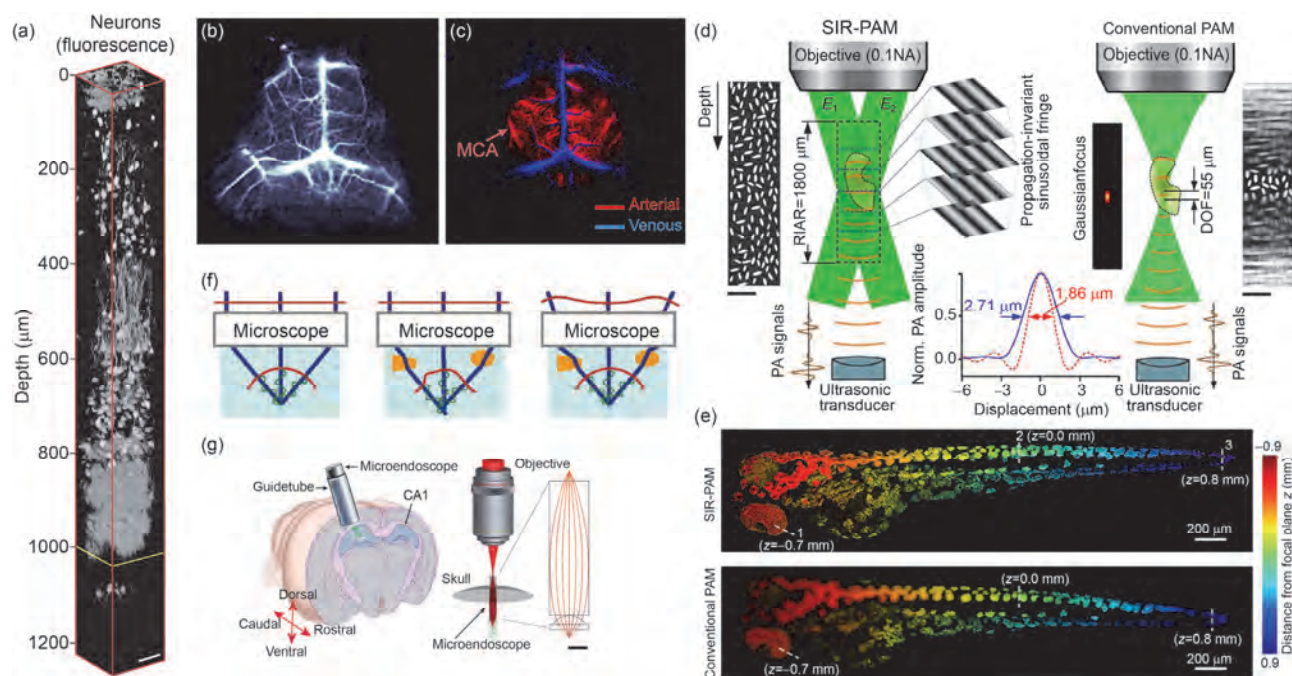


图2 实现深层成像的几类技术。(a) 小鼠脑神经的在体三光子成像^[11]；(b), (c) 在NIR-IIb窗口对小鼠脑血管实时成像^[12]；(d) 光声成像. SIR-PAM与传统光声显微镜的比较^[13]；(e) 利用SIR-PAM和传统光声显微镜对斑马鱼胚胎进行在体成像^[13]；(f) 自适应光学的基本模型^[14]；(g) 自聚焦透镜示意图^[15]

Figure 2 Deep brain imaging techniques. (a) *In vivo* three-photon imaging of neurons in mice brain^[11]；(b), (c) real-time imaging of mouse cerebrovascular vessels at the NIR-IIb window^[12]；(d) photoacoustic imaging. Comparison of SIR-PAM with conventional photoacoustic microscopy^[13]；(e) *in vivo* imaging of zebrafish embryos using SIR-PAM and conventional photoacoustic microscopy^[13]；(f) a basic model of adaptive optics^[14]；(g) schematic of GRIN lens^[15]

NIR-II, 1000~1700 nm), 对应于图1(d)中的两个窗口。相较于可见光及近红外一区荧光成像技术, 近红外二区由于发射波长更长, 在生物组织中的散射较小, 因此近红外二区荧光成像技术可以显著提高成像的深度和空间分辨率。但在NIR-II波段内, 水分子对波长为1450 nm的光有比较强烈的吸收, 为了避免水的吸收, 斯坦福大学的戴宏杰等人定义了新的成像窗口, NIR-IIa(1300~1400 nm)^[17]和NIR-IIb(1500~1700 nm)^[18]。此外, 由于NIR-IIb波段的生物组织自发荧光极少, 这也有利于成像信噪比的提高^[19]。

近红外二区荧光成像技术的关键在于荧光探针, 近红外二区常用的探针可以分为4类, 分别是有机染料、单壁碳纳米管、量子点和稀土纳米粒子。针对不同的生物学问题, 红外波段的探针可以结合宽场显微镜、共聚焦显微镜、多光子显微镜和超分辨显微镜等多种成像方式^[20-22]。现阶段近红外二区荧光成像技术主要应用于小动物血管的深层成像, 肿瘤的手术切除, 以及肿瘤细胞的特异性标记(如图2(b)和(c)所示)^[12,13,23]。近红外二区荧光成像技术可以对小鼠

脑血管进行深层高分辨活体成像, 成像深度在小鼠头皮和颅骨完整的情况下可以达到2.8 mm, 横向分辨率可以达到3~4 μm^[18]。Yu等人^[24]还提出了一种可以转基因标记果蝇神经元的红外染料, 可以清晰地观神经元的胞体, 树突和轴突。

1.3 光声成像

光声效应最早由Bell于1880年发现^[25], 是指吸收体在周期性光照下, 将吸收的光能转换为声信号的物理现象, 这种声信号的频率与光照频率相同。光声效应于1998年首次应用于生物医学成像领域^[26], 在近20年间取得了迅猛的发展, 并在脑成像领域展现出巨大潜力。光声成像系统利用脉冲光或周期性调制光激发生物组织产生光声信号, 通过采集的声信号重建生物组织内部光吸收分布的图像。因为组织对超声波的散射程度要比对光的散射低2~3个数量级, 使得光声成像技术能从原理上突破光学成像深度的“软极限”, 获得比纯光学成像更深的组织穿透能力。目前在实验室条件下的光声成像已经达到最

深7 cm的成像深度^[27]。

光声成像是一种跨尺度双模态融合的成像技术,它结合了光学特异性激发和声学深度穿透特性。既可以利用内源信号的光学吸收差异,实现血氧和神经功能成像;又可以利用外源性光学染料、金纳米棒、微泡等造影剂,实现分子成像和基因表达观察^[28]。

功能光声成像利用内源性含氧血红蛋白和脱氧血红蛋白对光的吸收差异性,检测大脑中的血氧含量和动力学信息。Wang等人^[29]在2003年报道了活体无创经颅骨的大鼠脑结构和功能成像结果,但是其空间分辨率仅约为0.2 mm。在此基础上,历经多轮迭代,Yao等人^[30]在2015年报道了在完整颅骨条件下的小鼠活体脑功能成像,其横向分辨率达到了约3 μm ,轴向分辨率达到了约15 μm ,以100 kHz时间分辨率对血管血氧进行一维的追踪,其成像深度推进到0.7 mm,但仍无法观测深脑区域的血氧和神经活动情况。Li等人^[31]在2017年报道了在完整颅骨条件下的大鼠和小鼠的活体全身成像,在脑部的成像深度达到9.7 mm,分辨率为125 μm ,面成像速度为50 Hz,全身扫描大约需要12 s,包含600个横截面信息。同年,Yang等人^[13]报道了一种名为空间不变分辨率的光声显微镜(spatially invariant resolution photoacoustic microscopy, SIR-PAM)的技术。SIR-PAM基于条纹光照明和傅里叶频谱采集成像原理,能够在非扫描情况下进行三维体成像,并获得比传统光声显微镜高33倍的景深以及高1.5倍的横向分辨(如图2(d)所示)。SIR-PAM对斑马鱼进行成像(如图2(e)所示),成像深度达到1.8 mm,横向分辨率达到1.8 μm 。除了光声显微镜和光声断层技术,Razansky等人^[32]也基于光声原理在2007年报道了多光谱光声层析成像技术(multi-spectral optoacoustic tomography, MSOT),利用MSOT可以区分含氧血红蛋白和脱氧血红蛋白的光谱吸收特征的特点定量测量其浓度,实现血氧功能成像。Burton等人^[33]于2013年报道了在完整颅骨条件下活体小鼠的脑血氧成像结果,成像深度为3 mm,分辨率达到50 μm ,采集速度10 Hz。

近些年来,随着特异性的钙离子荧光探针和电压敏感探针不断被报道和采用^[34,35],利用光声成像技术对大脑神经活动进行功能成像成为领域热点。Deán-ben等人^[36]在2016年报道了一个多光谱光声层析成像平台,结合遗传编码钙离子荧光探针GCaMP5G,

首次利用光声成像系统实现了自由游动的斑马鱼活体大脑神经活动观测,该系统能够对整个体积进行每秒100次高速成像,视场大小可达50~1000 mm^3 ,对应的分辨率为35~200 μm 。随后在2017年,又报道了观察活体GCaMP6f表达的小鼠大脑神经活动的光声成像结果^[37]。但这两项工作只达到了亚毫米量级的空间分辨率,尚未取得单个神经元级别的分辨率。Kang等人^[38]报道了一种基于荧光猝灭的近红外电压敏感探针的大鼠脑神经光声成像,实现了不开颅条件下3~8 mm深脑神经电生理活动的监测,面成像速度为4 Hz,成像分辨率为亚毫米量级,尚无法观测单个神经元活动。结合钙离子荧光探针和电压敏感探针,光声成像能够突破光学成像深度“软极限”进行脑结构和功能成像^[27]。如果进一步提高空间分辨率,光声成像极有潜力成为观察大脑活动的利器。

1.4 其他辅助技术

1.4.1 自适应光学

自适应光学技术伴随着地基望远镜的天文观测活动产生,通过在望远镜中设置波前探测器实时获知波前畸变分布并由波前矫正器反馈补偿该波前畸变,使得望远镜可以克服大气湍流的影响,获得与望远镜口径相匹配的成像分辨率^[39]。生物组织的深层成像面临着相似的问题。荧光显微镜只有对组织表层几百微米范围内的区域才能实现高分辨率、高对比度成像。引入自适应光学技术,可以在一定程度上校正组织散射引起的波前畸变,从而提高成像深度与成像质量。深层组织成像的波前畸变主要来源于两个方面:一是由光学元件的加工误差、光学系统的装调误差以及扫描成像方式等因素带来的系统像差;二是由于生物组织的折射率不均匀,光在其中传播时产生的波前畸变。系统的固有像差可以通过提前标定及波前校正消除。而生物组织对激发光和荧光波前产生的影响,随着成像深度的增加而增强,这是限制成像深度及成像质量的主要因素。激发光的波前畸变使得聚焦质量下降,光斑弥散,导致图像分辨率、信背比降低;荧光信号的波前畸变会导致其携带的样品高频信息丢失,点扩散函数变形,以及信号强度下降等,导致图像质量下降。

自适应光学技术通过波前检测及波前校正,主动补偿组织的折射率不均匀带来的波前畸变(如图2(f)所示),改善焦点处的激发光或到达探测器的荧

光波前质量,从而提高深层组织的成像质量,有效增加成像深度.其中,波前探测分为基于波前探测器的直接探测方法与基于迭代算法的间接探测2种方法^[40].前者需要在生物组织中产生独立的理想点光源(导星)或者形状较为规则的拓展目标,利用波前探测器检测波前畸变.后者采用迭代的方法,以最终获得的图像质量为评价指标.这种方法无需导星和波前传感器,系统更加简单,但是迭代收敛需要耗费更多时间.在波前校正部分,通常采用变形镜或者液晶空间光调制器来改变波前不同位置的光程,实现波前校正.

借助于直接波前探测的方法,Wang等人^[41]于2014年提出了基于Descanning技术的逐层、逐等晕区的自适应光学成像,而后在2015年,他们改用近红外光作为导星,实现了700 μm 深度的小鼠脑组织成像^[42].此外,Xu等人^[43]提出超声波导引的时间反演光聚焦技术,借助超声波对超声焦点处的散射光进行频移,从而构建出处于组织深层的光导星,并记录光导星的波前信息,由此对逆向传播激发光进行波前调制,通过光学相位共轭变换完成对数毫米厚的散射组织深层的高质量光聚焦.但由于该技术单次聚焦耗时长,暂时无法用于成像.无波前传感的自适应光学技术也在组织深层成像中得到应用,Tang等人^[44]运用无波前传感的二分式迭代方法实现了小鼠大脑650 μm 深处的自适应光学成像.

当前,越来越多的工作引入了自适应光学技术,改善厚样品的成像效果.然而,该技术对成像深度的改善依然有限.其主要原因在于,现有的技术以校正低阶像差为主,然而随着成像深度增加,一方面组织的散射给波前探测带来极大的困难,另一方面高阶像差成分也随深度增加而不断增加,这超出了现有波前校正器件的校正范围.自适应光学技术正在克服上述缺陷,随着新型探测技术,更高分辨率的波前校正器件的出现以及控制技术的进步,自适应光学技术将会在深层脑组织成像中发挥更大的作用.

1.4.2 侵入式深度成像

一类侵入式的成像技术利用微棱镜或者微型自聚焦透镜实现深层组织成像.微棱镜是尺寸为1~2 mm的直角棱镜,通过将微棱镜植入小鼠颅骨与脑组织之间,可以收集来自侧面皮层的荧光信号,实现对脑组织不同方向的观测成像.用该方法可以对皮层进行长达几个月的亚细胞级分辨率成像^[45,46].自聚

焦透镜(gradient-index lens, GRIN lens)又称为梯度折射率透镜(如图2(g)所示),这种圆柱形透镜内部的折射率沿径向逐渐减小,从而使光线汇聚. GRIN lens具有良好的成像特性和小巧的尺寸,在微型光学系统中有广泛的应用. Attardo等人^[15]开发的基于GRIN lens的成像技术是将一根直径为1 mm的GRIN lens插入要观察的脑区,可以长时间观察到神经元树突棘的动态变化.利用基于GRIN lens的侵入式成像技术,目前已能实现对小鼠大脑深度5 mm核团的单细胞级别的成像^[47].此外, Murayama等人^[48]将微棱镜粘接于GRIN lens顶端,用于观测位于自聚焦透镜侧面核团的神经元活动.但此类侵入式深度成像技术容易造成脑组织的出血及炎症,且成像分辨率、视场和工作距离相比物镜成像方式也有很大差距.

1.4.3 组织透明化技术

组织透明化是一种利用特殊配方的介质处理降低生物组织光散射程度的方法,目的是让生物组织在所观测的光学波段范围内变得“透明”,从而增加光学成像深度.组织透明化按照实现方式不同可以分为两大类,第一类是去除组织中折射率差异较大的物质,第二类是使用与组织折射率相似的介质溶液,利用浸泡或灌注的方式使组织器官透明.这两类方法通常综合起来使用^[49,50].针对传统的透明化方法会使组织失去生物活性的缺陷,Zhang等人^[51]提出了一种活体颅骨透明化方法,可以使小鼠颅骨在涂抹药物后保持透明状态15 min.该方法可以对同一处组织重复使用,且未发现明显的炎症和代谢毒性.

2 高速脑神经活动成像技术

神经活动的钙信号脉冲宽度在百毫秒量级,动作电位脉冲宽度在毫秒量级,为观测神经元集群、环路、核团乃至多脑区中快速的神经活动过程,一方面需要荧光探针具有适当的响应速度,另一方面对成像系统的时间分辨率提出了相应的要求.

在高速探针方面,Hochbaum等人^[52]开发的电压敏感探针QuasAr1和QuasAr2已具有微秒级响应速度且不产生光电流. Gong等人^[53]开发的电压敏感探针较前者进一步提高了荧光激发效率.近年来,多个课题组开发出了多种激发效率更高的更具实用价值的电压敏感探针^[54,55].

在高速成像系统方面,传统双光子显微镜利用压电位移台驱动物镜转换成像平面,这样的系统因

驱动质量较大, 轴向扫描速度有限. 利用可变焦液体透镜(最大扫描速度约500 Hz)^[56]、超声透镜(扫描速度约450 kHz)^[57]、声光透镜(如图3(a)所示, 扫描速度约30~50 kHz)^[58]等高速光学器件代替压电位移台, 可以实现快速轴向扫描, 提高体成像速度. Kong等人^[57]将一个455 kHz的可调声梯度透镜集成于双光子显微镜中, 实现了速度1 kHz的面成像以及 $375\ \mu\text{m} \times 375\ \mu\text{m} \times 130\ \mu\text{m}$ 区域5.6 Hz的体成像.

光片照明成像方式容易获得高的体成像速度. Ahrens等人^[61]于2013年利用光片成像技术已经实现了对斑马鱼全脑区域($800\ \mu\text{m} \times 600\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$)0.8 Hz的在体成像. 然而传统光片照明方式容易受到介质散射影响, 更适合对斑马鱼等较为透明的样品进行成像. Zong等人^[62]于2015年提出一种基于可调声梯度透镜的双光子三轴数字扫描光片显微镜. 该成像系统通过可调声梯度透镜配合振镜, 高速扫描形成双

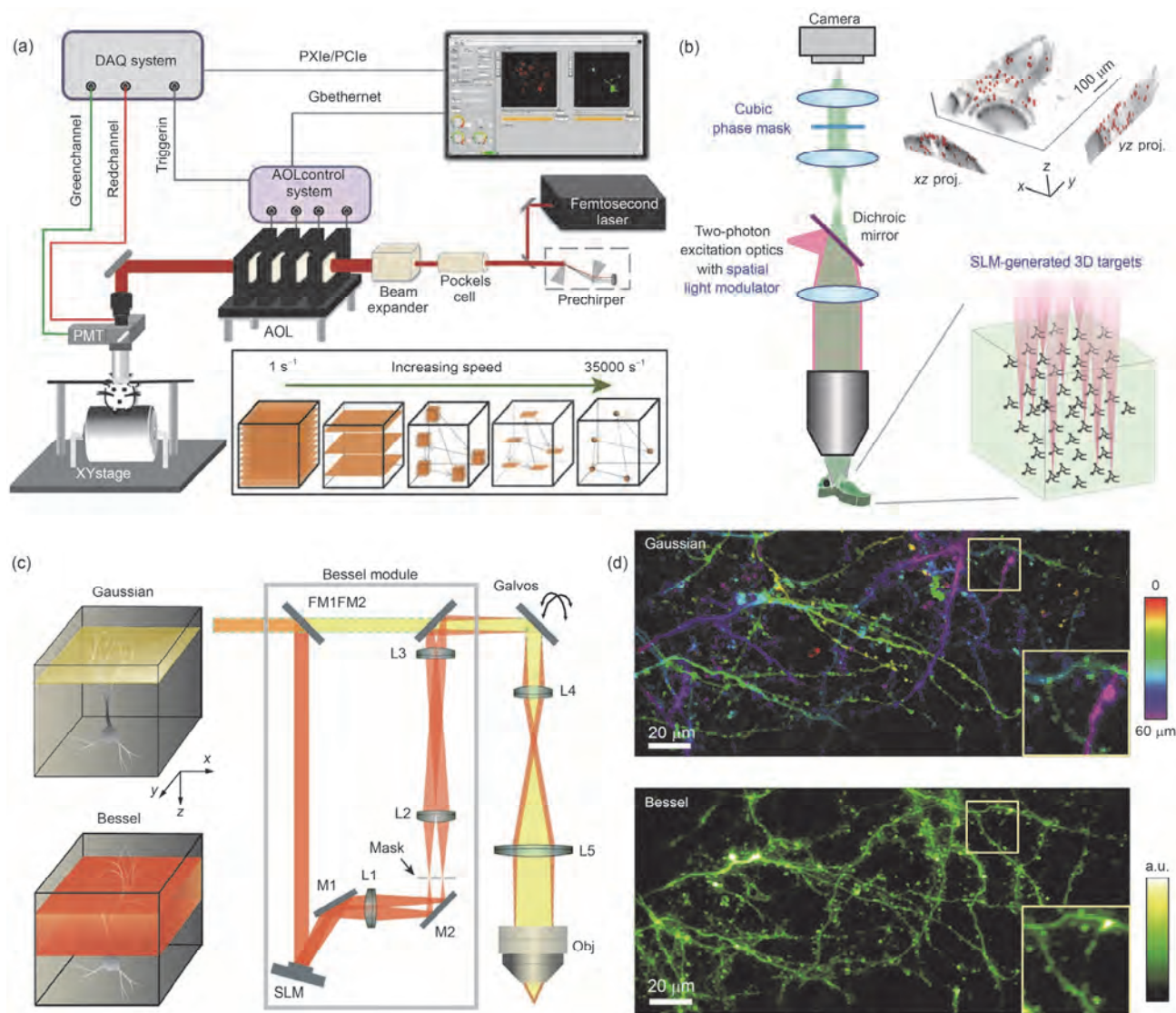


图3 几种高速体成像技术. (a) 基于声光透镜的成像系统示意图^[58]; (b) 基于空间光调制器的全息成像系统示意图^[59]; (c) 基于贝塞尔光束的双光子成像系统示意图^[60]; (d) 对一个厚度为 $60\ \mu\text{m}$ 区域的高斯光三维点扫描成像以及贝塞尔光成像^[60], 后者在成倍提高成像速度的同时依然保持单突触的横向分辨率. 图中比例尺代表 $20\ \mu\text{m}$

Figure 3 High-speed volumetric imaging techniques. (a) Schematic diagram of imaging system based on acousto-optic lens^[58]; (b) schematic diagram of holographic imaging system based on spatial light modulators^[59]; (c) schematic diagram of multiphoton imaging system based on Bessel beam^[60]; (d) three-dimensional imaging of a $60\ \mu\text{m}$ -thick region by point-scanning Gaussian focus and a projection image of the same region taken with Bessel beam at video rate and single-spine resolution^[60]. Scale bars, $20\ \mu\text{m}$

光子光片,具有大视场($170\ \mu\text{m}\times 170\ \mu\text{m}$)、高成像深度($170\ \mu\text{m}$)、高空间分辨率(横向 $420\sim 450\ \text{nm}$,纵向 $700\sim 800\ \text{nm}$),以及高采样速度($100\ \text{Hz}$, $2048\text{像素}\times 2048\text{像素}$)等特点.

对于稀疏标记的样品,利用长针状贝塞尔光束,只需要进行二维扫描即可获得三维样品的投影像,再利用先验的空间结构信息,推求信号的深度定位,从而大幅缩短体成像时间(如图3(c)和(d)所示). 2013年至今,已有多个小组发展了双光子贝塞尔显微镜技术^[60,63-65]. Chen等人^[66]于2018年发表的工作实现了三光子贝塞尔显微镜,能够对 $500\ \mu\text{m}\times 500\ \mu\text{m}\times 300\ \mu\text{m}$ 体素空间以 $5\ \text{Hz}$ 速度进行在体高速神经成像,并且得益于三光子激发,成像深度达到 $1.7\ \text{mm}$. 该技术大大改进了传统三光子显微镜三维成像速度慢的问题,并获得比双光子贝塞尔显微镜更高的图像信背比.

对于点扫描成像方式,为了保证一定的图像信噪比,每个像素的驻留时间存在下限(取决于荧光探针的发光特性),这是限制点扫描显微镜成像速度的根本性因素. 除了开发更加明亮的探针,另一个解决思路是将单点扫描变为多点同时扫描^[67]. Nikolenko等人^[68]于2008年首次提出基于双光子激发的“全息成像”系统. 这类系统利用空间光调制器对激发光的波前相位进行调制,将激发光分为多束,实现对不同空间位置的目标进行同时成像(如图3(b)所示). 后期需要通过算法将重叠的图像进行分离. Yang等人^[69]发展的双光子全息成像系统,能够对轴向相距 $300\ \mu\text{m}$ 的两个平面内的目标进行同时成像,以 $10\ \text{Hz}$ 的帧率记录近400个神经元的活动.

提高成像速度不仅有助于更加完整地记录神经活动的时空信息,也有助于克服活体成像时可能出现的运动模糊的影响. 随着空间光调制器、光电探测器、声光透镜等硬件性能的不断优化,以及荧光探针的不断改进,光学显微成像速度有望取得进一步突破.

3 大视场脑神经活动成像技术

大脑功能的执行既依赖于局部信息处理,也离不开神经环路及网络中各区域神经核团、神经元之间的协同工作. 血氧水平依赖功能磁共振成像显示,左右半球不同脑区之间的活动存在关联性^[70]. 近年发现的单个“超级神经元”的投射范围可以覆盖全脑^[71],并与许多脑区的神经元建立突触连接. 普通显微镜

的视场大小与分辨率两者不能同时兼顾. 选用小放大率的物镜可以获得更大的视场,但同时数值孔径也会下降,损失了空间分辨率. 在保持单细胞分辨率的前提下,传统显微镜的视场只能达到约 $1\ \text{mm}^2$ ^[72]. 开发大视场高分辨率的成像系统,需要对光路中的扫描透镜、镜筒透镜、像差校正元件等组成部分进行专门设计,并协调机械结构与光学结构的参数以获得理想的成像速度、分辨率与视场大小. 多个课题组在该方向发表了令人印象深刻的工作^[72-74],将成像视场提升10倍左右,并保持全视场单细胞分辨率. 特别是McConnell等人^[75,76]设计的大型显微成像系统Mesolens,该系统拥有 $6\ \text{mm}$ 横向视野以及 $3\ \text{mm}$ 轴向视野,同时横向、轴向分辨率分别达到 0.7 和 $7\ \mu\text{m}$,可获得鼠脑组织、胚胎等样品的大视野高分辨图像(如图4所示)该系统在脑科学及发育生物学领域具有广阔的应用前景.

4 超分辨成像技术

神经元中的各类亚细胞结构与神经元功能密切相关. 例如,树突棘的形态与尺寸对突触可塑性有重大影响,与大脑的学习和记忆过程相关^[77,78]. 在突触可塑化过程中,神经递质受体如 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, AMPAR)会在突触后膜募集与弥散^[79,80],同时局部胞浆蛋白质及细胞骨架也会发生动态变化^[81,82]. 然而,这些结构的特征尺寸远小于传统光学显微镜的极限分辨率,给脑科学研究带来了尺度上的屏障. 虽然电子显微镜的空间分辨率更高,但缺乏光学显微镜的特异性以及活体成像能力,因而光学显微镜仍然是主要的研究工具. 近10年来,超分辨荧光显微成像技术备受关注. 借助该技术,科研人员得以突破尺度屏障,对隐藏在光学衍射极限之下的结构进行精确定量分析.

超分辨成像技术主要包括单分子定位显微镜(single-molecule localization microscopy, SMLM)^[83-85]、受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微镜^[86]以及结构光照明显微镜(structured illumination microscopy, SIM)^[87]等. 单分子定位显微镜的分辨率最高可超过 $10\ \text{nm}$ ^[88],主要用于对体外固定细胞进行成像,揭示细胞内部的精细结构. Dani等人^[89]利用随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)以横向 $14\ \text{nm}$ 、纵向 $35\ \text{nm}$

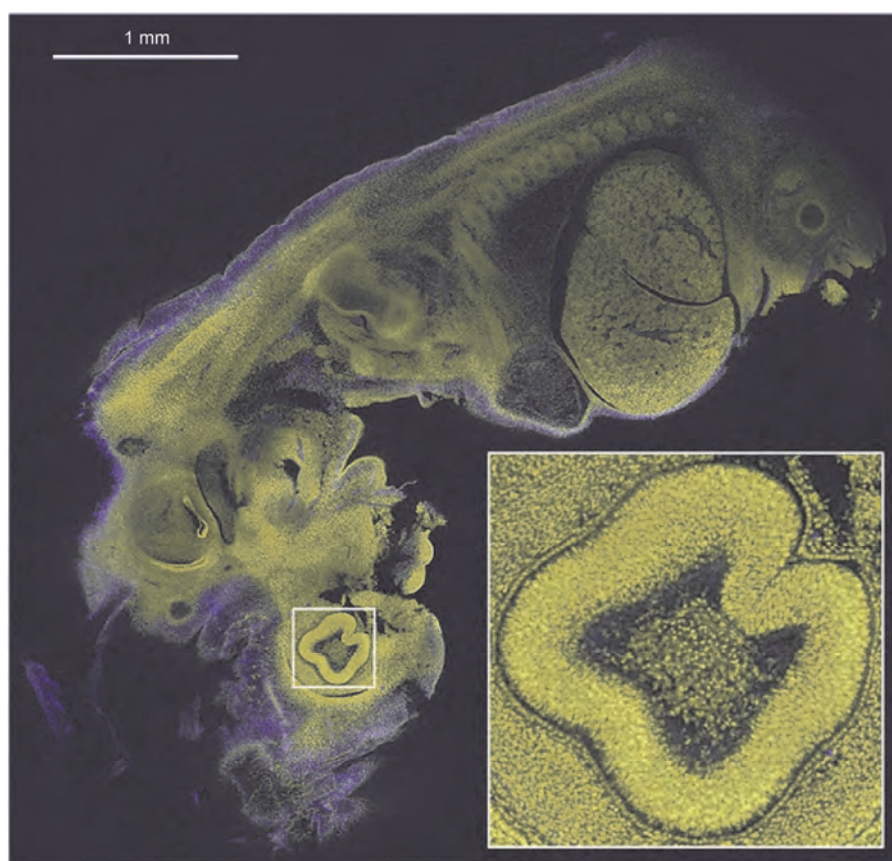


图4 Mesolens系统对小鼠胚胎的共聚焦模式成像^[76]

Figure 4 Imaging of a mouse embryo by Mesolens in confocal mode^[76]

的定位精度解析了10种蛋白质在突触前后膜的空间分布. Xu等人^[90]同样利用该技术,发现了神经元轴突中细胞骨架和钠离子通道的周期性空间结构. STED是最早应用于在体神经成像的超分辨成像技术, Nägerl等人^[91]于2008年首次报道了以超越光学衍射极限的分辨率(约70 nm^[92])^[92]在体观察树突棘可塑性的动态过程. STED还可以进一步结合空心贝塞尔损耗光^[93]或者双光子激发^[94,95],将成像深度提升至100 μm左右. SIM通过对照明光的调制,使样品的高频信息被调制在可被显微镜探测到的低频区域,可得到两倍于衍射极限分辨率的图像.此外,通过对荧光分子饱和激发的非线性效应,还能进一步提升分辨率^[96]. SIM相对于前两种技术具有高成像速度以及低光毒性等特点,广泛应用于活细胞成像.在神经成像应用中,通过结合组织透明化技术^[97]或者双光子激发^[98],SIM可以对脑片等厚样品进行超分辨成像. Huang等人^[99]通过海森结构光显微镜,实现了188 Hz(滚动重建时564 Hz)、88 nm的时空分辨率,并能够对

活细胞样品进行长时程成像.该技术在活细胞中观察并记录了线粒体内嵴动态融合与重组的过程,解析了囊泡与细胞质膜融合过程中更加精细的动态结构,展现出应用于研究突触信号传递、神经元细胞器的相互作用等过程的巨大潜力.2018年*Nature Methods*发表综述系统阐述了结构光超分辨率成像领域现状时,也指出海森结构光显微镜可以在保持图像超分辨率的前提条件下有效的去除伪迹,比一般的结构光超分辨率显微镜灵敏10倍以上,连续成像张数也比传统结构光显微镜高至少一个数量级^[100].

超分辨成像技术为脑科学研究带来了新工具和新发现,也为进一步提升脑神经成像系统的空间分辨率提供了许多有益的思路.

5 微型化显微成像技术

21世纪以来,随着微机电、材料科学和微纳米加工技术的发展,诸多科学家开始研制真正意义上的微型化显微镜.将显微镜和自由运动的动物结合在

一起,让动物“带着显微镜跑”,同时获取动物在自由活动状态下的实时动态神经成像数据.这成为神经科学领域日益关注的焦点^[101].其中,微型单光子宽场显微镜,因其原理和结构相对简单,成为最早的突破点^[102].但由于宽场成像方式受背景信号干扰,成像对比度低,无法达到单细胞分辨率,并且没有光学断层成像能力,因此其应用受到一定的局限,世界上多个双光子成像技术研究组也开始微型双光子显微镜的探索.2001年,Helmchen等人^[103]的工作被认为是研制微型双光子显微镜的第一步,但是其体积大(长7.5 cm,重25 g),成像速度仅有0.5 帧/秒(512像素×512像素).Engelbrecht等人^[104]在2008年报道了他们的微型双光子成像系统,重仅0.9 g,实现了512像素×512像素下的8 帧/秒的成像速度.该系统实现了大鼠的在体钙信号成像,但是其空间分辨率较低,并且没有实现真正意义的自由运动动物神经元成像.2009年,Piyawattanametha等人^[105]也发表了他们的微型双光子成像系统,他们的系统首次使用了微机电扫描振镜来进行扫描,并将Z轴聚焦模块集成在显微镜探头之中,但是其扫描频率很低,且空间分辨率也不够理想.Sawinski等人^[106]在2009年报道了他们的系统,这套系统的空间分辨率更高,但是重量达5.5 g,使用振动光纤的方式进行扫描,成像速度较慢,理论上在512像素×512像素下为1.25 帧/秒.

先前的所有微型双光子显微镜都不能实现对目前最广泛使用的GCaMP钙探针进行有效的成像,这

也极大地限制了微型双光子显微镜的发展和应用.之所以早期的微型化双光子显微镜没有得到真正的应用和推广,一是双光子显微成像技术相比于单光子显微成像技术要复杂和困难得多,其次要在保证成像分辨率、速率、荧光收集效率和稳定性的前提下,进行小型化和微型化更加的困难.必须突破以下几个关键性问题:(1) 将飞秒激光无失真的传导至微型显微镜;(2) 保证足够高的光激发和收集效率;(3) 高效的激光扫描方式;(4) 自由活动的行为下,成像速度足够快,从而克服佩戴时的晃动获得稳定的图像;(5) 保证性能的前提下,尽可能的小、轻、柔.

2017年5月,北京大学Zong等人^[107]成功研制了新一代高速高分辨微型双光子荧光显微镜,突破了高时空分辨微型双光子在体显微成像的技术瓶颈,取名为FHIRM-TPM(如图5所示).此项技术解决了上述所提及的早期微型化双光子显微镜研制中存在的问题,首次获得了小鼠在自由运动行为过程中大脑神经元和神经突触活动清晰、稳定的图像.

新一代微型双光子荧光显微镜体积小,重仅2.2 g,适于佩戴在小型动物头部,通过颅窗实时记录数十个神经元、上千个神经突触的动态信号.采用双轴对称高速微机电系统转镜扫描和自主研发设计的光子晶体光纤,可实现920 nm飞秒激光传输,成像帧频达40 帧/秒(256像素×256像素),同时具备多区域随机扫描和每秒1万线的线扫描能力.其横向分辨率为0.65 μm ,成像质量可与商品化大型台式双光子

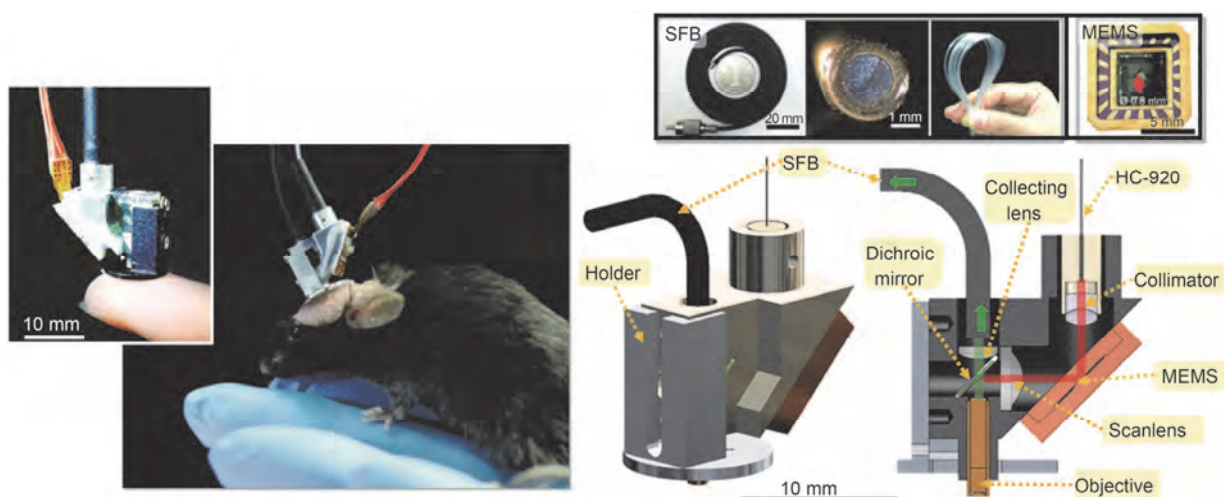


图5 FHIRM-TPM实物照片与结构示意图^[107].

Figure 5 Photographs and schematic diagram of FHIRM-TPM^[107]

荧光显微镜相比拟。荧光信号接收采用自主设计的柔性光纤束,在高效率收集荧光信号的同时很好地避免了传输光纤对动物行为干扰的难题,在悬尾、社交和小鼠跳台等实验过程中,得到了高分辨率和稳定的神经活动图像。该系统使用了迄今为止商业化数值孔径最高的微型物镜,数值孔径为0.8,直径仅有1.4 mm、长6 mm,并且对900和450 nm进行了色差校正,非常适合微型双光子显微成像技术,但其工作距离仅为200 μm ,较大地限制了更深脑神经组织的成像。

目前该课题组及产业化公司正在研发的新一代的微型双光子显微镜,新设计制作了一系列新型微型物镜:其中数值孔径为0.7,工作距离为400 μm 的物镜,成像视场可达200 $\mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}$,是第一代微型双光子成像视野的1.5倍;数值孔径为0.5,成像视场高达450 $\mu\text{m}\times 450 \mu\text{m}$,并且工作距离长达1 mm,横向分辨率1.5 μm ,可同时记录数百个神经元的动态变化。应用新一代的高分辨率微型物镜,获得了更大视野、更深层次的成像,且实现了全程自主设计定制和国产化。

6 结论与展望

新千年以来,在蓬勃兴起的脑科学的强力推动下,光学显微成像技术在成像深度、速度、分辨率、视场等方面不断拓展新的边界,涌现了许多新原理、新器件、新探针以及计算成像和图像处理的新技术和新方法。实现神经元级别的全脑光学成像的技术体系已初具雏形,目前已取得斑马鱼全脑成像的突破性进展,下一个重要里程碑将是在啮齿动物实现全脑活动记录。这个目标虽然宏大,但也并非遥不可及:现有技术体系的集成创新仍有很大的潜力,未来

可在新型探针、激发模式、探测器件、计算成像等方向拓展。特别是,结合多光子激发、自适应光学、组织透明化等技术,融合声学、光声等成像模态,有望在多模态跨尺度全脑成像技术上取得突破。此外,传统的X射线结合相衬技术展现出高分辨多尺度成像能力^[108],借助同步辐射光源产生高亮度、高相干的X射线,有望发展出前所未有的全脑成像模式。基于先验知识的智能学习成像^[109,110],这一悄然而生的新方向能为脑成像带来什么样的进步,也是值得期待的。

第一代微型双光子显微成像技术实现了自由活动动物的活体脑动态功能成像。该技术可在动物处于觅食、哺乳、跳台、打斗、嬉戏、睡眠、社交等自然行为条件下,或者在学习前、学习中和学习后,长时间的观察神经突触、神经元、神经网络、远程连接的脑区等多尺度、多层次动态变化。未来与光遗传学技术的结合,可望在结构与功能成像的同时,精准地操控神经元和大脑神经回路的活动。结合自适应光学技术,一方面可以矫正光学器件上带来的畸变,另一方面可以实时地矫正深层组织带来的散射,极大地提高系统的分辨率和成像深度。同时可以应用多个显微镜同步记录多个脑区,研究多脑区、核团信息之间的相互传递和相互作用。此外,微型化三光子显微镜理论上更有更深的成像深度,结合新型红外探针,可实现更深脑区的神经活动观测。

总之,在体观测脑活动的显微成像技术的发展,特别是全脑神经元水平的功能成像目标的达成,将为实现“分析脑、理解脑、模仿脑”的脑科学目标发挥重要作用,进而启迪人工智能研究,最终服务人类的福祉。

参考文献

- 1 Fischl B, Dale A M. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11050–11055
- 2 Jacques S L. Optical properties of biological tissues: A review. *Phys Med Biol*, 2013, 58: R37–R61
- 3 Wang L V, Wu H. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007
- 4 Hong G, Antaris A L, Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 10
- 5 Wang L V. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography. *Nat Photon*, 2009, 3: 503–509
- 6 Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, 248: 73–76
- 7 Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1369–1377
- 8 Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2005, 2: 932–940
- 9 Theer P, Hasan M T, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier.

- Opt Lett, 2003, 28: 1022–1024
- 10 Miller D R, Hassan A M, Jarrett J W, et al. *In vivo* multiphoton imaging of a diverse array of fluorophores to investigate deep neurovascular structure. Biomed Opt Express, 2017, 8: 3470–3481
- 11 Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. Nature Photon, 2013, 7: 205–209
- 12 Zhong Y, Ma Z, Zhu S, et al. Boosting the down-shifting luminescence of rare-earth nanocrystals for biological imaging beyond 1500 nm. Nat Commun, 2017, 8: 737
- 13 Yang J, Gong L, Xu X, et al. Motionless volumetric photoacoustic microscopy with spatially invariant resolution. Nat Commun, 2017, 8: 780
- 14 Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. Nat Methods, 2009, 7: 141–147
- 15 Attardo A, Fitzgerald J E, Schnitzer M J. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. Nature, 2015, 523: 592–596
- 16 Wang T, Ouzounov D G, Wu C, et al. Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull. Nat Methods, 2018, 15: 789–792
- 17 Hong G, Diao S, Chang J, et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. Nat Photon, 2014, 8: 723–730
- 18 Diao S, Blackburn J L, Hong G, et al. Fluorescence imaging *in vivo* at wavelengths beyond 1500 nm. Angew Chem, 2015, 127: 14971–14975
- 19 Diao S, Hong G, Antaris A L, et al. Biological imaging without autofluorescence in the second near-infrared region. Nano Res, 2015, 8: 3027–3034
- 20 Wan H, Yue J, Zhu S, et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues. Nat Commun, 2018, 9: 1171
- 21 Liu W, Wang Y, Han X, et al. Fluorescence resonance energy transfer (fret) based nanoparticles composed of AIE luminogens and NIR dyes with enhanced three-photon near-infrared emission for *in vivo* brain angiography. Nanoscale, 2018, 10: 10025–10032
- 22 Li D, Ni X, Zhang X, et al. Aggregation-induced emission luminogen-assisted stimulated emission depletion nanoscopy for super-resolution mitochondrial visualization in live cells. Nano Res, 2018, 11: 6023–6033
- 23 Antaris A L, Chen H, Cheng K, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging. Nat Mat, 2016, 15: 235–242
- 24 Yu D, Gustafson W C, Han C, et al. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. Nat Commun, 2014, 5: 3626
- 25 Bell A G. On the production and reproduction of sound by light. Am J Sci, 1880, 20: 305–324
- 26 Hoelen C, De Mul F, Pongers R, et al. Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue. Opt Lett, 1998, 23: 648–650
- 27 Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *In vivo* imaging from organelles to organs. Science, 2012, 335: 1458–1462
- 28 Witte R S, Kim K, Agarwal A, et al. Enhanced photoacoustic neuroimaging with gold nanorods and pebbles. SPIE, 2008, 685614–685619
- 29 Wang X, Pang Y, Ku G, et al. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain. Nat Biotechnol, 2003, 21: 803–806
- 30 Yao J, Wang L, Yang J, et al. High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action. Nat Methods, 2015, 12: 407–410
- 31 Li L, Zhu L, Ma C, et al. Single-impulse panoramic photoacoustic computed tomography of small-animal whole-body dynamics at high spatiotemporal resolution. Nat Biomed Eng, 2017, 1: 0071
- 32 Razansky D, Vinegoni C, Ntziachristos V. Multispectral photoacoustic imaging of fluorochromes in small animals. Opt Lett, 2007, 32: 2891–2893
- 33 Burton N C, Patel M, Morscher S, et al. Multispectral opto-acoustic tomography (MSOT) of the brain and glioblastoma characterization. Neuroimage, 2013, 65: 522–528
- 34 Rao B, Zhang R, Li L, et al. Photoacoustic imaging of voltage responses beyond the optical diffusion limit. Sci Rep, 2017, 7: 2560
- 35 Zhang H K, Yan P, Kang J, et al. Listening to membrane potential: Photoacoustic voltage-sensitive dye recording. J Biomed Opt, 2017, 22: 045006
- 36 Deán-Ben X L, Sela G, Lauri A, et al. Functional optoacoustic neuro-tomography for scalable whole-brain monitoring of calcium indicators. Light Sci Appl, 2016, 5: e16201
- 37 Gottschalk S, Deán-Ben X L, Shoham S, et al. Non-invasive *in vivo* functional optoacoustic calcium imaging of neural activity in GCaMP6f-expressing mice. In: Optics and the Brain. San Diego: Optical Society of America, 2017. BrTu3B.3
- 38 Kang J, Zhang H K, Kadam S D, et al. Transcranial *in vivo* recording of neural activity in the rodent brain with near-infrared photoacoustic voltage-sensitive dye imaging. BioRxiv, 2018, 202408

- 39 Mao H, Tao L, Chen L Y. Application and development of adaptive optics to three-dimensional *in vivo* deep tissue fluorescent microscopy(in Chinese). *Infrared Laser Eng*, 2016, 45: 602001 [毛珩, Tao L, 陈良怡. 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和发展. *红外与激光工程*, 2016, 45: 602001]
- 40 Booth M J. Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image. *Light Sci Appl*, 2014, 3: e165
- 41 Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes. *Nat Methods*, 2014, 11: 625–628
- 42 Wang K, Sun W, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 7276
- 43 Xu X, Liu H, Wang L V. Time-reversed ultrasonically encoded optical focusing into scattering media. *Nat Photon*, 2011, 5: 154–157
- 44 Tang J, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2012, 109: 8434–8439
- 45 Andermann M L, Gilfoy N B, Goldey G J, et al. Chronic cellular imaging of entire cortical columns in awake mice using microprisms. *Neuron*, 2013, 80: 900–913
- 46 Low R J, Gu Y, Tank D W. Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: Imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 18739–18744
- 47 Bocarsly M E, Jiang W, Wang C, et al. Minimally invasive microendoscopy system for *in vivo* functional imaging of deep nuclei in the mouse brain. *Biomed Opt Express*, 2015, 6: 4546–4556
- 48 Murayama M, Larkum M E. *In vivo* dendritic calcium imaging with a fiberoptic periscope system. *Nat Protoc*, 2009, 4: 1551–1559
- 49 Chung K, Wallace J, Kim S, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 2013, 497: 332–337
- 50 Yang B, Treweek J B, Kulkarni R P, et al. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, 2014, 158: 945–958
- 51 Zhang C, Feng W, Zhao Y, et al. A large, switchable optical clearing skull window for cerebrovascular imaging. *Theranostics*, 2018, 8: 2696–2708
- 52 Hochbaum D R, Zhao Y, Farhi S L, et al. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods*, 2014, 11: 825–833
- 53 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
- 54 Kulkarni R U, Kramer D J, Pourmandi N, et al. Voltage-sensitive rhodol with enhanced two-photon brightness. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2813–2818
- 55 Chamberland S, Yang H H, Pan M M, et al. Fast two-photon imaging of subcellular voltage dynamics in neuronal tissue with genetically encoded indicators. *eLife*, 2017, 6: e25690
- 56 Grewe B F, Voigt F F, van T Hoff M, et al. Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens. *Biomed Opt Express*, 2011, 2: 2035–2046
- 57 Kong L, Tang J, Little J P, et al. Continuous volumetric imaging via an optical phase-locked ultrasound lens. *Nat Methods*, 2015, 12: 759–762
- 58 Nadella K N S, Roß H, Baragli C, et al. Random-access scanning microscopy for 3d imaging in awake behaving animals. *Nat Methods*, 2016, 13: 1001–1004
- 59 Yang W, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity. *Nat Methods*, 2017, 14: 349–359
- 60 Lu R, Sun W, Liang Y, et al. Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 620–628
- 61 Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods*, 2013, 10: 413–420
- 62 Zong W, Zhao J, Chen X, et al. Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy. *Cell Res*, 2015, 25: 254–257
- 63 Thériault G, De Koninck Y, McCarthy N. Extended depth of field microscopy for rapid volumetric two-photon imaging. *Opt Express*, 2013, 21: 10095–10104
- 64 Thériault G, Cottet M, Castonguay A, et al. Extended two-photon microscopy in live samples with Bessel beams: Steadier focus, faster volume scans, and simpler stereoscopic imaging. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 00139
- 65 Yang Y, Yao B, Lei M, et al. Two-photon laser scanning stereomicroscopy for fast volumetric imaging. *PLoS One*, 2016, 11: e168885
- 66 Chen B, Huang X, Gou D, et al. Rapid volumetric imaging with Bessel-beam three-photon microscopy. *Biomed Opt Express*, 2018, 9: 1992–2000
- 67 Yang W, Yuste R. Holographic imaging and photostimulation of neural activity. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 50: 211–221
- 68 Nikolenko V, Watson B O, Araya R, et al. SLM microscopy: Scanless two-photon imaging and photostimulation using spatial light modulators. *Front Neural Circuit*, 2008, 2: 5

- 69 Yang W, Miller J K, Carrillo-Reid L, et al. Simultaneous multi-plane imaging of neural circuits. *Neuron*, 2016, 89: 269–284
- 70 Fox M D, Raichle M E. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 700–711
- 71 Reardon S. A giant neuron found wrapped around entire mouse brain. *Nat News*, 2017, 543: 14
- 72 Stirman J N, Smith I T, Kudenov M W, et al. Wide field-of-view, multi-region, two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 857–862
- 73 Tsai P S, Mateo C, Field J J, et al. Ultra-large field-of-view two-photon microscopy. *Opt Express*, 2015, 23: 13833–13847
- 74 Pacheco S, Wang C, Chawla M K, et al. High resolution, high speed, long working distance, large field of view confocal fluorescence microscope. *Sci Rep*, 2017, 7: 13349
- 75 McConnell G, Trägårdh J, Amor R, et al. A novel optical microscope for imaging large embryos and tissue volumes with sub-cellular resolution throughout. *eLife*, 2016, 5: e18659
- 76 Chhetri R K, Keller P J. Microscopy: Imaging far and wide. *eLife*, 2016, 5: e21072
- 77 Bourne J N, Harris K M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 2008, 31: 47–67
- 78 Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 1999, 399: 66–70
- 79 Shi S, Hayashi Y, Petralia R S, et al. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic nmda receptor activation. *Science*, 1999, 284: 1811–1816
- 80 Carroll R C, Lissin D V, von Zastrow M, et al. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci*, 1999, 2: 454–460
- 81 Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, et al. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 2008, 57: 719–729
- 82 Hotulainen P, Hoogenraad C C. Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 2010, 189: 619–629
- 83 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 84 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–796
- 85 Hess S T, Girirajan T P, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 2006, 91: 4258–4272
- 86 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, 19: 780–782
- 87 Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 2000, 198: 82–87
- 88 Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Methods*, 2012, 9: 185–188
- 89 Dani A, Huang B, Bergan J, et al. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, 2010, 68: 843–856
- 90 Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 2013, 339: 452–456
- 91 Nägerl U V, Willig K I, Hein B, et al. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18982–18987
- 92 Berning S, Willig K I, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living mouse brain. *Science*, 2012, 335: 551–551
- 93 Yu W, Ji Z, Dong D, et al. Super-resolution deep imaging with hollow Bessel beam STED microscopy. *Laser Photon Rev*, 2016, 10: 147–152
- 94 Ding J B, Takasaki K T, Sabatini B L. Supraresolution imaging in brain slices using stimulated-emission depletion two-photon laser scanning microscopy. *Neuron*, 2009, 63: 429–437
- 95 Bethge P, Chéreau R, Avignone E, et al. Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophys J*, 2013, 104: 778–785
- 96 Gustafsson M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13081–13086
- 97 Sawada K, Kawakami R, Shigemoto R, et al. Super-resolution structural analysis of dendritic spines using three-dimensional structured illumination microscopy in cleared mouse brain slices. *Eur J Neurosci*, 2018, 47: 1033–1042
- 98 Urban B E, Xiao L, Dong B, et al. Imaging neuronal structure dynamics using 2-photon super-resolution patterned excitation reconstruction microscopy. *J Biophoton*, 2018, 11: e201700171
- 99 Huang X, Fan J, Li L, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with hessian structured illumination microscopy. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 451–459

- 100 Wu Y, Shroff H. Faster, sharper, and deeper: Structured illumination microscopy for biological imaging. *Nat Methods*, 2018, 15: 1011–1019
- 101 Kerr J N, Nimmerjahn A. Functional imaging in freely moving animals. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 45–53
- 102 Flusberg B A, Nimmerjahn A, Cocker E D, et al. High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice. *Nat Methods*, 2008, 5: 935–938
- 103 Helmchen F, Fee M S, Tank D W, et al. A miniature head-mounted two-photon microscope: High-resolution brain imaging in freely moving animals. *Neuron*, 2001, 31: 903–912
- 104 Engelbrecht C J, Johnston R S, Seibel E J, et al. Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging *in vivo*. *Opt Express*, 2008, 16: 5556–5564
- 105 Piyawattanametha W, Cocker E D, Burns L D, et al. *In vivo* brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror. *Opt Lett*, 2009, 34: 2309–2311
- 106 Sawinski J, Wallace D J, Greenberg D S, et al. Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 19557–19562
- 107 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
- 108 Töpperwien M, van der Meer F, Stadelmann C, et al. Three-dimensional virtual histology of human cerebellum by X-ray phase-contrast tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 6940–6945
- 109 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
- 110 Waller L, Tian L. Computational imaging: Machine learning for 3D microscopy. *Nature*, 2015, 523: 416–417

Summary for “脑神经活动光学显微成像技术”

In vivo optical imaging of brain activity

Chi Mo^{1,2}, Shiyuan Chen^{1,2}, Muyue Zhai^{1,2}, Runlong Wu³, Zichen Wang², Jing Yu², Aimin Wang³, Liangyi Chen² & Heping Cheng^{1,2*}¹ Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China;² State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China;³ School of Electronics Engineering and Computer Science, Peking University, Beijing 100871, China

* Corresponding author, E-mail: chengp@pku.edu.cn

In the new millennium, the brain and neuroscience have taken center-stage in international collaborative efforts. The brain comprises billions of neurons interconnected at trillions of synapses. To decipher its structure and function is one of the boldest projects ever pursued by the scientific community. The development of better imaging technology once again affords powerful tools to meet this grand challenge. Different imaging modalities have been widely used in revealing the complex structural organization and functional dynamics of the brain, including X-ray computed tomography, magnetic resonance imaging, positron emission computed tomography, ultrasound imaging, electron microscopy, and fluorescence microscopy. Among these, only fluorescence microscopy provides high contrast, high specificity, and high spatiotemporal resolution imaging *in vivo*.

Thanks to the recent progress in photonics, laser physics, computer and information science, and nanomaterial science, the century-old optical imaging field is now being revitalizing and is booming. Recent developments in three-photon microscopy enable the optical resolution of single-neuron activity as deep as 2 mm beneath the surface of the cortex, and non-invasively visualization of single-neuron activity through the intact opaque skull. The emergence of photon-efficient super-resolution Hessian structured illumination microscopy allows live cells to be imaged with a spatial resolution <90 nm and an acquisition rate of 564 frames per second, and enables time-lapse super-resolution imaging for over an hour with minimal photo-bleaching. Light-sheet microscopy, on the other hand, is capable of imaging ~100000 neurons in the entire zebrafish brain, at a volumetric imaging rate >10 Hz. Other innovations such as near-infrared II imaging, photoacoustic tomography, and adaptive optics are also extending the spatial and temporal resolution, imaging depth, and trans-scale volumetric imaging capacity.

Another paradigm-shift is to record brain activity in freely-moving and behaving animals, which involves technological innovation in miniaturized microscopy with high spatiotemporal resolution. In this regard, we recently developed a fast, high-resolution, miniaturized two-photon microscope (FHIRM-TPM), with a headpiece weighing only 2.2 g and occupying less than 1 cm³, equipped with a GRIN lens of NA 0.8. Because the fluorescent Ca²⁺ indicators GFP and GCaMP6 are commonly used in biomedical science, we designed and custom-manufactured a hollow-core photonic crystal fiber to deliver 920-nm femtosecond laser pulses with little dispersion and attenuation. FHIRM-TPM is capable of long-term recording neuronal activity in freely-behaving mice at single-spine and sub-millisecond spatiotemporal resolution (0.64 μm laterally and 3.35 μm axially, 40 Hz at 256 pixel×256 pixel for raster scanning and 10000 Hz for free-line scanning). Future applications of this technology in many behavioral paradigms will help to address many fundamental questions such as spatial and temporal information-processing, learning and memory, decision-making, and social interactions.

In summary, with the emphasis on developing more advanced imaging technologies, scientists can directly visualize neuronal activity deeper in the brain, markedly faster with super-resolution, and over many orders of spatiotemporal scales. With technical advances unfolding in multiple fronts (e.g., probes, detectors, modality fusion, and deep-learning assisted imaging), systematic breakthroughs will provide brain scientists and neuroscientists with the ability to gain a holistic view of multi-layered brain activity at the levels of neuron clusters, nuclei, and the circuitry of long-range connectivity. Finally, we envision that high-resolution imaging methods enabling *in toto* recording of brain activity at single-neuron resolution in small mammals may become a reality within the next decade.

brain science, multi-photon fluorescence microscopy, super-resolution microscopy, light-sheet illumination, photoacoustic imaging, miniaturized microscopy, fluorescence probes, near-infrared II

doi: 10.1360/N972018-01142