PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2019,46(10):952~965
www.pibb.ac.cn

多光子显微成像技术在脑部疾病研究中的应用*

黄燕霞 周非凡 周 婷 许 皓 林丹樱 屈军乐**
（深圳大学物理与光电工程学院，光电子器件与系统（教育部/广东省）重点实验室，深圳 518060）

摘要 由于多光子显微技术具有高时空分辨率、低损伤性、可对活体长时间成像等特点，近年来已被广泛应用于生物医学等领域，并且在多种疾病诊断中展现出巨大的应用潜力. 尤其是在脑部疾病的研究中，利用多光子成像技术可实现对复杂神经网络的研究，包括对脑部神经细胞、血管、肿瘤等进行实时成像并研究各自之间的相互作用，能进一步揭示脑疾病的发病机制并指导检测治疗方法的开发. 本文简要介绍了多光子成像技术的基本原理及特点，总结了其在阿尔茨海默病、脑中风、脑肿瘤等多种脑部疾病中的应用，详细阐述了近年来利用多光子成像技术在脑部疾病研究中所获得的成果，并对多光子成像技术的发展前景进行了展望，预期其在脑部疾病的研究中将发挥更大的作用.

关键词 多光子显微成像，脑部疾病，生物光学成像
中图分类号 O437 **DOI**：10.16476/j.pibb.2019.0095

传统的脑功能成像包含功能性核磁共振（functional nuclear magnetic resonance，fMRI）、正电子发射计算机断层成像（positron emission computed tomography，PET）等，具有辐射损伤以及价格昂贵等缺点，并且很难实现多种生理参数的同时测量. 多光子显微成像技术基于非线性光学成像原理，具有高时空分辨、低细胞损伤等特点，能够在不同的时间和空间尺度上研究脑功能活动，在脑疾病的研究中发挥出巨大的作用. 相比于其他技术具有如下优点：

a. 具有高时空分辨率. 典型的多光子脑部成像系统通常能达到亚微米级的空间分辨率，能够满足脑部成像对神经细胞精细结构研究的需求.

b. 多光子成像系统通常采用波长较长的红外激光作为激发光源，这些波长在生物组织中具有较好的穿透性，可达到数百微米的成像深度，适合脑部深层组织的成像.

c. 多光子荧光成像只有在激发光焦点附近的有限区域才能达到产生荧光所需的激光照射功率密度，非焦点区域不会产生荧光，因此无需借助共聚焦针孔就可以具有天然的光学层析和三维成像能力，可通过对焦点的三维扫描来获得样品的三维显微图像. 除此之外，还可以有效减少焦点外的光漂白和光毒性，提高成像质量，更适于活体的长时间成像.

早在20世纪30年代，多光子显微技术中的典型代表——双光子激发理论，由 Göppert-Mayer [1] 提出. 1990年，Denk 等 [2] 将双光子激发用于荧光共聚焦显微系统，制造出了世界上第一台激光扫描双光子荧光显微镜，并应用于生物学研究. 至此，多光子显微技术逐渐向商业化发展，现在已被用于医学成像研究中的诸多领域，如皮肤病、角膜病的诊断等. 多光子显微镜能够较大地克服由脑部组织引起的光散射，从而可以实现深层成像. 因此，其在脑部研究中具有极大的潜力. 本文简要介绍多光子显微成像的基本原理，包括传统意义上的多光子激发荧光（multiphoton excited fluorescence，MPEF）显微成像和谐波成像，总结了其在阿尔茨

* 国家自然科学基金(61525503,61620106016,61835009,81727804)，广东省高等学校科技创新（重点）项目(2015KGJHZ002/2016KCXTD007)，广东省自然科学基金(2014A030312008)和深圳市基础研究项目(JCYJ20150930104948169,JCYJ20160328144746940,JCYJ20170412105003520)资助.
** 通讯联系人.
Tel：13714776252，E-mail：jlqu@szu.edu.cn
收稿日期：2019-05-04，接受日期：2019-07-11

海默病、脑中风、脑肿瘤等典型脑部疾病研究中的应用.

1　多光子显微成像技术的基本原理和典型装置

双光子激发荧光成像（two-photon excited fluorescence，TPEF）是一种最常见的多光子荧光成像技术，其荧光分子的吸收和发射的能级图如图1a所示. 在高光子密度的情况下，荧光分子同时吸收2个长波长光子，从基态跃迁到激发态，随后在非常短的时间内从一个较高的振动能级f_2弛豫到激发态的最低振动能级f_1，最后再从f_1自发辐射回到基态，发出荧光. 由于经历了从f_2态到f_1态的弛豫过程，双光子激发产生的荧光光子能量要小于吸收的双光子能量之和，即荧光信号的频率略小于激发光频率的2倍. 对于三光子激发而言，则产生的荧光信号频率要略小于激发光频率的3倍（图1b）. 由于脑部组织具有明显的不均匀性，对光的散射作用较强，因此随着成像深度的加大，信号光衰减，非焦点区域也出现了非线性激发现象，导致信噪比逐渐降低，故信噪比成了限制多光子成像深度的主要原因. 根据简单的数学推导，在远离焦点处，双光子和三光子的成像信号随着成像深度的增加大约分别以$1/z^2$和$1/z^4$的形式衰减[3]. 由此可见，三光子显微成像技术由于能更好地减弱背景光从而更加适合深层组织的成像. 如Cornell大学Xu等[3]利用三光子激发成像技术进行脑部成像研究，其研发的三光子成像系统在1 700 nm的光谱激发窗对小鼠脑部的成像达到约1 400 μm的成像深度，可清晰地看到小鼠海马体区域. 除此之外，多光子激发成像技术还包括四光子、五光子吸收成像，其原理与此类似. 由于多光子激发荧光显微成像中对激发光能量密度要求较高，故通常需要使用高功率锁模脉冲激光作为激发光源，如钛宝石锁模飞秒激光器等. 将多光子显微技术与多种荧光材料相结合，如外源染料、纳米材料等，可显著增强成像效果，从而对多种疾病进行快速诊断和检测，如Huang等[4]使用双光子激发荧光显微镜，利用溶酶体靶向的双光子荧光探针FC-βgal来检测卵巢癌活细胞中的β半乳糖苷酶变化，为原发性卵巢癌提供新的诊断方法.

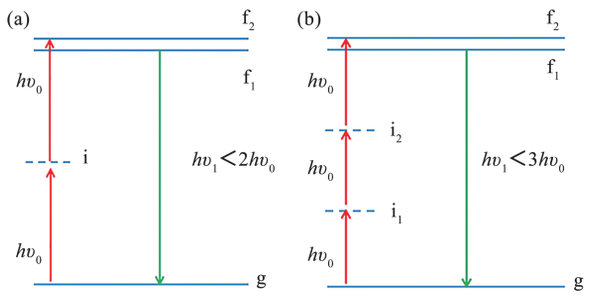


Fig. 1　Energy-level diagram for nonlinear optical processes of TPEF（a）and three-photon excited fluorescence imaging（b）

图1　双光子激发荧光（a）和三光子激发荧光（b）能级图

二次谐波（second harmonic generation，SHG）和三次谐波（third harmonic generation，THG）显微成像也是应用较多的多光子显微成像技术，但是它们与双光子和三光子激发荧光显微成像的物理机制完全不同. 其能级图如图2所示，g为实能级，其他为虚能级，即谐波在成像过程中并没有光子的吸收和能级跃迁，信号的产生是由于材料的非线性极化率引起的. 因此，谐波的产生不同于非线性荧光辐射，如双光子和三光子激发荧光成像过程中都存在光的吸收且辐射光谱存在展宽，而谐波成像则不存在光的吸收并且其产生的新光谱频率与入射光的频率成严格的倍频关系. 同时，由于介质的极化率反映了它的微观特性，如对称性、排列等，谐波成像对材料的结构变化较为敏感，可用于检测物质的微观结构. 应用于生物医学光学显微成像的二次谐波和三次谐波显微镜一般为扫描式，由于成像无需对样品进行染色或荧光标记，对样品损伤小，已被广泛应用于胶原组织等生物样品的研究. 二次谐波成像时成像样品需具有非反演对称性并满足相位匹配的条件. 相比于二次谐波，三次谐波是一种仅在非均匀介质中发生的负相位失配的三阶过程，因此

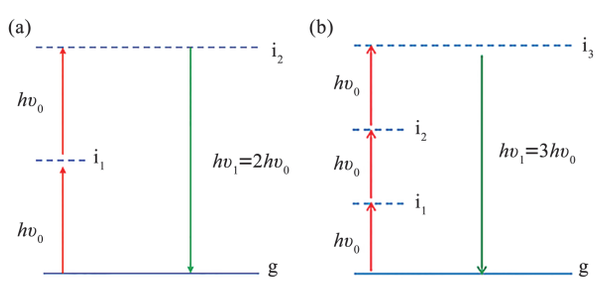


Fig. 2　Energy-level diagram for nonlinear optical processes of SHG（a）and THG（b）

图2　二次谐波（a）和三次谐波（b）产生能级图

它对介质的结构对称性没有要求，并且在介质的表面和内部均可以产生，因此在对大块组织内部成像方面更具优势，也常用于识别两种介质之间的交界面.

双光子、三光子荧光成像以及谐波成像通常可以在同一装置上实现[5]，典型的成像装置如图3所示. 一般采用飞秒激光器作为光源，由于双光子、三光子与谐波成像的发射光波长不同，可在光谱上进行分离，且利用前向和后向的散射信号可同时进行图像采集. 如在消化道肿瘤的诊断中，Zhuo等[6]便联合利用SHG-TPEF多光子成像系统对正常人和癌变患者的食管基质进行成像，由于SHG信号主要来源于胶原纤维，而TPEF信号主要来源于弹性纤维，故两者的复合成像能更好地展示出癌变组织的特征，给诊断提供更多的指导，展现出了多光子成像技术的优势和应用潜力.

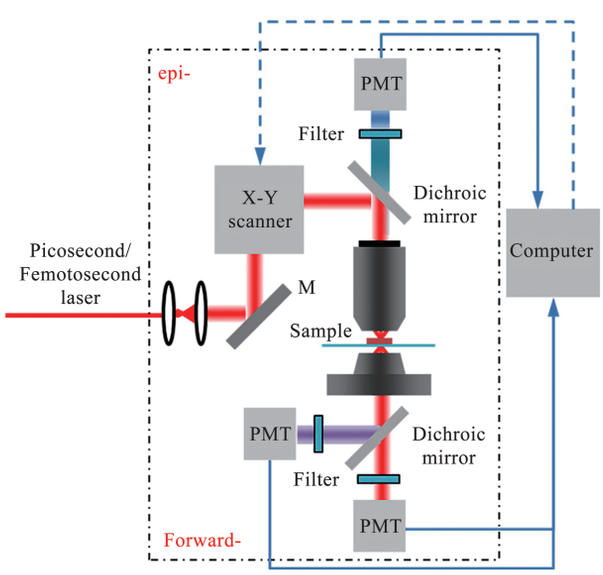


Fig. 3　Typical multiphoton imaging device[5]

图3　典型的多光子成像装置[5]

成像装置主要包括：epi-，后向探测；Forward-，前向探测；PMT，光电倍增管探测器；Filter，滤波片；Dichroic mirror，双色镜；X-Y scanner，X-Y平面扫描仪；M，反射镜；Sample，样品；Picosecond/Femotosecond laser，皮秒/飞秒激光器；Computer，计算机.

2　多光子成像技术在阿尔茨海默病研究中的应用

2.1　阿尔茨海默病病理特征

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）是一种典型的神经系统退行性疾病. 该病最早由德国医生Alois Alzheimer于1906年提出，是老年痴呆症最常见的一种类型. AD患者通常出现记忆障碍、失语、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等发病特征[7]. AD发病机制至今尚未明确，在诊断上很大程度取决于神经心理学评估. 在我国现有约1 000万痴呆患者中AD约占全部患者的50%~70%，在全世界范围内AD患病率也在逐渐增加[8]. 根据流行病学数据预测，到2050年，可能会有超过1.315亿人患有AD[9]. AD的主要病理特征是细胞外β淀粉样蛋白（amyloid β-protein，Aβ）沉积形成老年斑和细胞内τ蛋白过度磷酸化形成神经纤维缠结. 许多科学研究表明，沉积的老年斑会对其附近的神经元活性及代谢等产生影响，从而导致神经元网络结构和功能的破坏. 因此，对于沉积的老年斑及其周围神经细胞的改变进行研究有利于进一步了解AD发病机制，对AD发病机制研究及诊断方法开发具有重要的价值. 在过去的十几年里，已发展了许多新型的脑部检测技术，丰富了我们对脑结构和脑功能的理解. 用于检测AD相关脑部病理结构的成像技术除了PET[10]和fMRI[11]外，还有单光子发射计算机断层成像术（single-photon emission computed tomography，SPECT）[12]、近红外（near-infrared，NIR）荧光成像[13]、多光子显微成像[14]等. 在这些技术中，基于高分辨率、无损活体成像的优势，多光子成像技术尤其适用于对Aβ沉积及其周围脑功能变化进行长时程观察，在AD发病机制的研究中发挥重要的作用.

2.2　多光子成像技术在Aβ动力学研究中的应用

在对AD发病机制的研究中，传统认为Aβ沉积是致病的原因之一，且与AD病程的进展密切相关. 由于AD暂时缺乏特效药，尽早地进行诊断对病情的控制能起到重要作用，因此可视化的Aβ成像将能极大地提高病情确诊率[15]. 目前，对Aβ动力学的研究主要集中在模式动物如转基因小鼠中的研究，实际的临床诊断仍面临成像深度不够深的瓶颈，多光子成像技术有望在该方向上取得进一步的突破.

利用多光子荧光显微成像对Aβ进行研究主要分为无标记成像和荧光探针标记成像. 最早被发现可以作为Aβ荧光标记物的是一种名为硫磺素T（thioflavinT，ThT）的化合物，能够高特异性与淀粉样蛋白结合，并且具有较小的分子质量，虽被称做“金标准（gold standard）”，却只能用于切片组织标记. methoxy-XO4[16]是目前在AD活体研究中

应用最为广泛的荧光探针之一. 采用methoxy-XO4对Aβ斑块进行标记，利用双光子显微镜可进行连续活体成像. Meyer-Luehmann等[17]通过长时程实时成像发现，新生的Aβ斑块在24 h内急速生长，随后体积便维持在相对稳定的状态. 而Baik等[18]则观察到Aβ斑块的形成不是单一斑块体积的生长，而是由新生的Aβ向原存在的斑块聚集而形成的. 由于methoxy-XO4只对斑块致密核心区域进行染色，Farrar等[19]研发出β55探针，该探针能高度结合离体AD人脑组织和AD转基因小鼠脑部的Aβ斑块，标记范围大于methoxy-XO4且开发简易，与methoxy-XO4互补标记能够更好地提高成像分辨率（图4）. 尽管利用荧光标记能特异性对Aβ斑块进行成像并且具有较高的成像分辨率，但脑部是一个复杂的整体，外加的荧光探针有可能引起其微环境的改变，从而对AD患者产生不利的影响. 因此，科研工作人员正致力于发展无标记成像技术用于斑块的识别. 由于Aβ斑块结构满足谐波信号的产生条件，故目前科研人员利用Aβ斑块的谐波信号进行成像. 如Kwan等[20]便采用谐波对转基因AD小鼠的海马体及脑部血管的老年斑进行观察，同时结合探针进行对比，得出老年斑谐波信号和自发荧光信号与探针的信号相匹配. 而Lee等[21]则采用无标记谐波成像结合双光子成像对AD小鼠模型的海马体CA1区和齿状回区（dentategyms，DG）进行成像分析，结果表明在DG区Aβ斑块的累积较多，信号较强，图5为同时结合相干反斯托克斯拉曼散射成像（coherent anti-Stokes Raman scattering，CARS）对Aβ斑块成分进行的多模式成像.

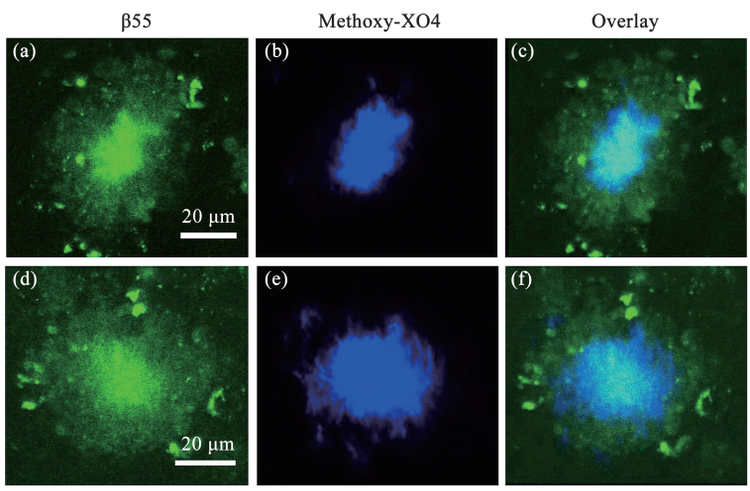


Fig. 4　Two-photon imaging of amyloid plaque which be labled by β55（a，d） and methoxy-XO4（b，e） and their merge imaging（c，f）[19]

图4　β55和methoxy-XO4标记的淀粉样蛋白斑块[19]

由双光子显微镜拍摄，β55（a，d）和methoxy-XO4（b，e）标记的AD小鼠体内Aβ斑块图以及两者的整合（c，f）.

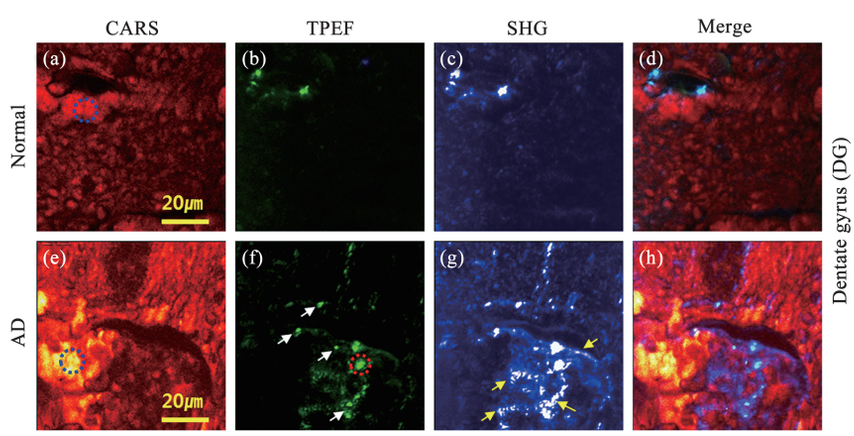


Fig. 5　Multimodal imaging of amyloid plaques in the DG region of AD transgenic mice[21]

图5　在AD转基因小鼠的DG区对淀粉样蛋白斑块进行多模式成像[21]

2.3 多光子成像技术在AD模型神经细胞研究中的应用

大脑是一个具有高度适应性的神经元共享信息网络，通过大约10^{14}个突触互相连接形成. 该神经网络能对外界刺激做出反应，同时具有高度的可塑性，能够不断适应新的环境需求并学习形成新的记忆. 突触一般包含轴突和树突，树突多呈树状分支，它可接受刺激并将冲动传向胞体，在树突分支上常见许多棘状的小突起，称树突棘. 树突棘是神经元之间形成突触的主要部位，可扩大神经元的接受面积，对外部刺激做出反应. 因此，当突触遭受破坏而导致形状改变或数量减少时，会导致神经回路遭受显著性的破坏，从而使得大脑的应激能力下降，最终导致认知和记忆的严重损害[22]. 因此，对神经元及突触进行成像研究有利于更好地理解大脑的功能作用机制. Xu等[23]采用三光子显微成像技术和GCaMP6s标记，在1 300 nm的激发波长下对小鼠海马体的神经元进行了功能性成像，实现了1 mm左右的成像深度.

研究者在尸检及转基因小动物AD模型中均发现，树突及树突棘形状的改变和数量减少的程度与AD患者大脑的损伤程度密切相关[24-25]. 基于此，有人提出淀粉样沉积物及其周围的微环境对树突有毒性作用，能够导致树突及树突棘的改变和丢失，致使突触功能异常[26]. 如Tsai等[27]发现在斑块形成的4~5周内树突棘的减少加剧，而Spires-Jones等[28]却发现该过程仅发生在斑块形成后的1 h内. 总而言之，树突及树突棘消失和改变的动力学原理至今仍未明确. Bittner等[29]利用TPEF技术，通过长时程活体成像，直观地展示了树突棘形成和消除的动力学过程. 他们选取3~4个月以及18~19个月大的双重杂交AD小鼠，此年龄阶段的小鼠刚好分别处于Aβ斑块形成停止阶段以及病理晚期阶段，随后利用methoxy-X04染料和黄色荧光蛋白（yellow fluorescent protein，YFP）分别对Aβ和树突进行标记并采用TPEF成像，研究了AD小鼠脑部神经元树突棘状态和Aβ沉积之间的关系[30]. 由于选用了近红外波段的波长作为激发光，故可在较低的激发功率下（<50 mW）获得较深的成像深度，在300 μm的成像深度下仍然能获得2 μm的纵向分辨率，既减小了光毒性又实现较大的视场范围，能够对脑部区域的Aβ沉积及其周围环境进行长时程的观察（图6）. 在长达数周的观察中，他们发现在斑块附近，3~4个月大的小鼠树突棘减少（57.9±28.3）%，18个月大的小鼠减少（67.8±20.8）%，证明树突棘的消失过程至少持续了一年时间，在此过程中观察到新生树突棘的生长速率与野生对照小鼠相同，揭示了树突棘总量的减少是由于树突棘消失的速率大于新生速率而造成的，并非是新生树突棘的生长受到了抑制. 同时，由于双光子荧光显微成像技术在活体成像中能达到亚细胞的分辨率，因此足以对树突棘的形态进行分辨. Bittner等继续选取了3种不同形态的树突棘进行TPEF成像并研究在树突棘减少的过程中不同形态所产生的影响，成像后经过三维重建分析，发现不同形态的树突棘在经历了4周后，其占总树突棘的比重仍然不变，说明树突棘的消失均匀发生在各种形状的树突棘中，不受形状的影响. 利用双光子荧光显微成像可长时间实时监测的优势，他们还对Aβ斑块新生过程中附近的树突棘进行了长达3个月的观察并发现树突棘的密度在斑块形成之前保持不变，直至初始Aβ斑块形成后4~5周，树突棘的密度才发生显著降低（图7）. 因此，在斑块形成和斑块附近的树突棘消失过程似乎存在约4周的潜伏期，这也解释了人脑的Aβ斑块从开始积累到认知衰退之间为何存在着5~10年的延迟时间. 由此可见，TPEF成像技术在成像视野、分辨率以及成像深度等方面都能满足对AD模型中树突棘消失的动力学研究，在对AD病理学认知研究中发挥巨大的作用.

在发病的AD模型中，除了树突棘会发生改变之外，小胶质细胞也会对Aβ斑块做出反应. 小胶质细胞是中枢神经系统内固有的免疫效应细胞，具有多突触和可塑性的特点[31]. 正常情况下，小胶质细胞通过与突触的接触监测突触的功能状态，为大脑提供一个高度动态和高效的监测系统. 当脑内发生炎症时，小胶质细胞会迅速被激活并产生吞噬功能. 通常来讲，在一些急性神经退行性疾病中，小胶质细胞会释放出炎症介质从而保护神经元，减少大脑的损伤. 但是在慢性神经退行性疾病，如阿尔茨海默病中，小胶质细胞由于长时间被激活，释放一系列的炎症介质会导致氧化过激反应，反而会对神经组织造成损伤，故其在阿尔茨海默病中的作用至今仍颇受争议. Meyer Luehmann等[32]在转基因B6C3-YFP小鼠中，通过YFP标记小胶质细胞，利用TPEF成像技术，使用800 nm激发波长激发荧光蛋白YFP和Aβ染料methoxy-XO4，对Aβ斑块及其附近的小胶质细胞进行实时监测. 他们发现，在斑块形成的部位，小胶质细胞很快做出应激反应并

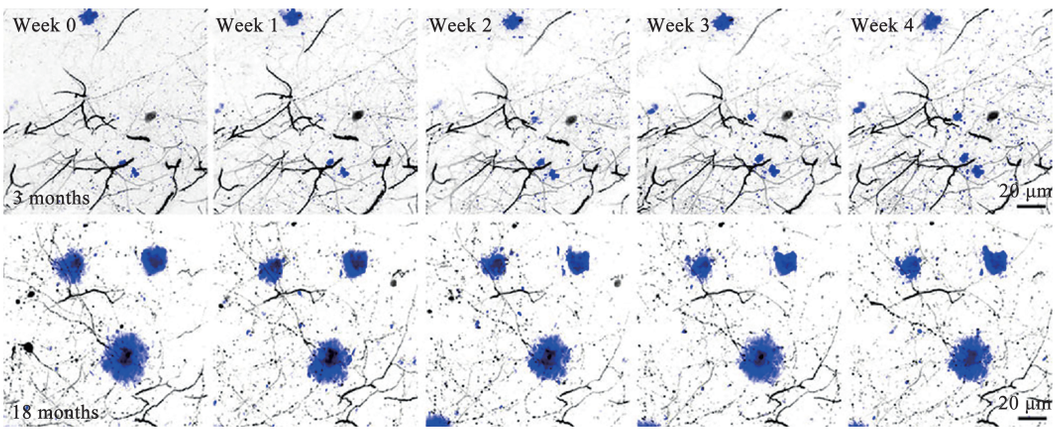


Fig. 6　Long-term *in vivo* imaging of AD mouse models using two-photon fluorescence microscopy[29]

图6　利用双光子荧光显微成像技术对AD小鼠模型进行长达数周的体内成像[29]

利用双光子荧光成像分别对年龄为3个月及18个月的AD 小鼠进行体内观察淀粉样蛋白斑块和树突的变化，蓝色表示Aβ，灰色表示树突.

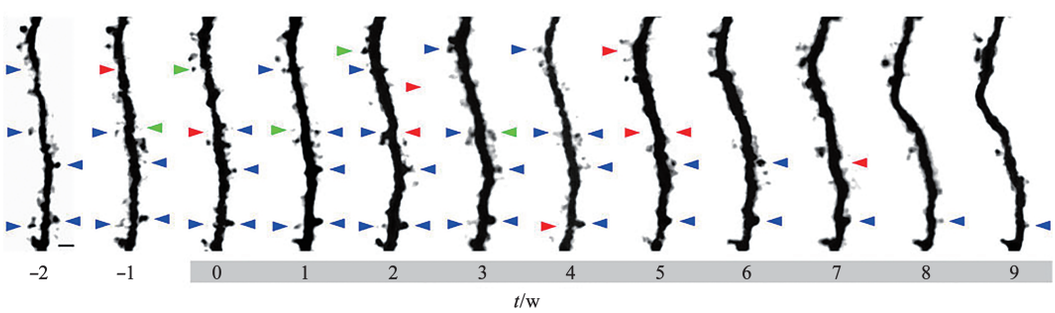


Fig. 7　Two-photon imaging of dendritic spines[29]

图7　双光子显微技术对树突棘成像[29]

利用双光子显微技术对AD小鼠进行体内成像，观察树突棘变化，成像时间间隔为1周，蓝色、红色、绿色箭头分别表示稳定、消失、新生的树突棘.

在24 h内被吸引到斑块附近. 同年，Bolmont等[33]通过TPEF成像在表达绿色荧光蛋白的AD转基因小鼠中也观察到了相似的结果. 而后Zhao等[34]通过使用刚果红标记AD小鼠中的Aβ斑块，并注射白喉素减少Aβ斑块附近小胶质细胞的数量，随后采用880 nm的双光子激发荧光对斑块进行成像，并结合MATLAB算法分析小胶质细胞的减少对Aβ斑块变化的影响，发现小胶质细胞减少的一周内，斑块逐渐变大，随后小胶质细胞再生，斑块大小又趋于稳定，从而证实了小胶质细胞对斑块的扩散起着抑制作用. 在整个研究过程中，双光子激发荧光显示较为稳定，同时由于双光子系统具有三维成像的特点，故结合MATLAB算法可通过分析荧光强度反映出斑块体积的变化. 但由于没有排除外加注射的白喉素对机体其他方面的影响，故其结果的可靠性仍有待研究. 另一方面，也有研究表明，小胶质细胞向斑块附近迁徙反而促进了斑块的聚集，如Baik等[18]利用TPEF成像技术，外加Aβ染料methoxy-XO4观察转基因AD小鼠体内由绿色荧光蛋白标记的小胶质细胞对Aβ斑块沉积的作用. 为了降低光毒性作用，整个成像过程中激光功率都控制在35 mW以下. 基于TPEF长时程、大范围的成像优势，他们通过连续体内成像和流式细胞术发现，斑块的长成是由于Aβ的不断聚集，而被激活的小胶质细胞会对Aβ进行吞噬并向Aβ斑块迁移（图8）. 迁移的过程也就是把新生的Aβ向老斑块附近带动. 随后，过量的Aβ在小胶质细胞内聚集导致了小胶质细胞的死亡，而其死后便会释放出胞内原先吞噬的Aβ，促进了斑块的聚集. 尽管不同的研究者对小胶质细胞在AD中的作用持不同看法，

但都一致认为小胶质细胞参与到AD的发病机制中，明确小胶质细胞在AD中的角色对推动AD的诊断和治疗具有重要的意义，而双光子成像的发展也为此提供了便利的观测条件.

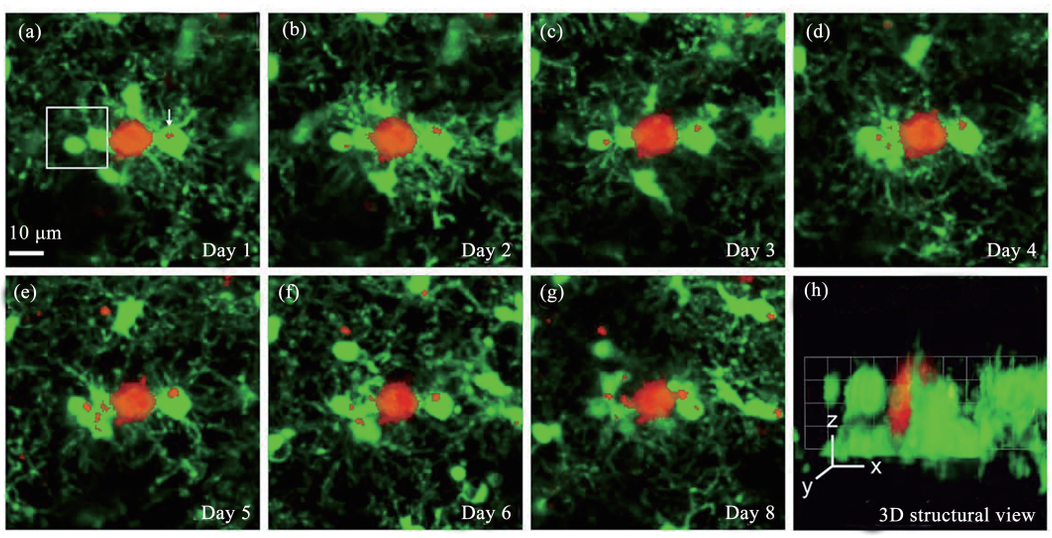


Fig. 8　Two-photon imaging of plaques（red）and microglia（green）*in vivo*[18]

图8　对体内斑块及小胶质细胞进行双光子荧光显微成像（红色为Aβ斑块，绿色为小胶质细胞）[18]

2.4　多光子成像技术在AD模型钙离子动力学研究中的应用

钙离子信号的传导是实现多种神经元功能的基础. 在研究神经网络的信号传导时，除了以细胞内钙浓度作为指标外，细胞的钙瞬变也成为重点研究对象之一. 据报道，在AD患者中，钙稳态的变化是最早发生的分子变化之一[35]. 随后，由于钙稳态的失衡，导致多种神经细胞受到损伤，神经网络的结构和功能遭受破坏. 鉴于钙离子的重要性，以往科学家研发了很多在细胞及亚细胞水平分析钙离子动力学的技术和方法. 随着光学技术的发展，高时空分辨率、低细胞损伤性的多光子体内成像技术使得能更好地对细胞内的钙离子活动进行精确的分析.

研究表明，在神经炎症发生过程中，小胶质细胞会被激活并具有吞噬和释放促炎性细胞因子等能力，而这些功能都是由小胶质细胞内的钙离子进行调控的. Brawek等[36]采用OBG-1钙离子指示剂标记小胶质细胞内钙离子浓度，利用双光子荧光显微镜观察神经细胞内的钙离子变化. 他们发现，在Aβ斑块附近的小胶质细胞的胞内自发钙离子瞬变几率显著增加，同时钙瞬变振幅也增加了5.8%左右，这些不稳定的钙离子信号会导致小胶质细胞极度活跃，释放促炎性细胞因子，造成神经退行性病变. 在AD模型中，除小胶质细胞受到钙稳态的调控外，神经元及树突功能也受其影响. Kuchibhotla等[37]利用多光子荧光成像技术，通过钙指示剂YC3.6在体内测量神经细胞突起，包括轴突和树突以及树突棘中的钙活动来研究AD模型脑部沉积的Aβ块和神经系统之间的关系. 由于YC3.6是一种基于荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）的比率式探针，将其与AVV2病毒结合可在转基因小鼠内进行特异性表达. 由于多光子成像系统具有高分辨率以及深度成像的优势，该研究能够对结合了YC3.6的神经细胞形态进行观察并定量地检测到AD小鼠皮质斑块附近的神经细胞钙离子浓度. 在具有Aβ斑块沉积的AD小鼠中，大约有20%的神经元出现钙离子超载，而在野生型小鼠以及没有斑块沉积的早期AD小鼠中钙超载的神经元比率小于5%，随后解释了神经元钙超载的现象取决于Aβ斑块的沉积以及神经元和斑块的距离，并且这种钙稳态的破坏最终会对神经网络结构和功能上的稳定性造成严重影响. Bai等[38]通过类似的实验证明了神经元钙稳态的重要性，他们利用注射Aβ寡聚体的方式构建AD小鼠模型，随后利用双光子荧光显微成像技术和钙

离子指示剂GCaMP6s对小鼠的树突进行了结构和功能成像，研究在AD小鼠模型中树突异常的钙离子信号和其形状改变之间的关系.研究发现，在静息情况下，3月龄的AD小鼠其原代运动皮层中的神经元胞体钙离子活性明显低于野生小鼠，而将AD小鼠放在特制的跑步机上观察时，神经元顶端树突表现出持续的高峰值振幅的钙瞬变，随后树突棘开始出现显著减少，他们将Aβ聚合物注射到野生小鼠中也观察到了同样的现象，因此得出Aβ聚集体会诱发神经元异常的钙瞬变这一结论，而这种长时间且高振幅的钙瞬变对树突棘产生毒性，导致树突棘数量的减少.由此可见，钙离子稳态对维持神经系统的功能有着重要的作用，而在体双光子钙离子成像已成为分析完整脑中神经元群体、个体神经元，甚至亚细胞神经元区室功能的有效方法，对推动理解神经系统稳态性起着重要的作用.

3　多光子成像技术在脑中风研究中的应用

3.1　脑中风病理特征

脑中风是一种因脑血管阻塞或破裂引起的脑血液循环障碍和脑组织机能或结构损害的疾病，又称脑卒中或脑血管意外，具有极高的病死率和致残率，主要分为出血性脑中风（脑出血或蛛网膜下腔出血）和缺血性脑中风（脑梗塞、脑血栓形成）两大类，以脑梗塞最为常见.常见的中风症状包括无法移动单侧的肢体或者是一边身体失去感觉，丧失单眼视力，出现语言障碍、眩晕等.脑中风发病急骤，病情凶险，在很短的发病时间内即可引起脑部细胞一连串的改变并造成脑部损伤.近几十年的研究表明，当大脑受到损伤时，多种类型的细胞以不同的方式共同对脑部损伤做出反应，甚至同一种细胞，在整体防御过程中可能担任不同的角色[39]，因此对脑中风发病情况下脑部结构和功能的检测，理解各种细胞对损伤做出的反应以及神经元、神经胶质等多种脑部细胞和血管区的相互作用有利于为此病提供有效的预防和治疗方案.目前临床采用影像技术如fMRI、PET等来探测血流量变化以提供患者的脑部信息，但这些技术在时间和空间分辨率上无法满足研究人员的需求.相比之下，多光子显微成像技术能够在细胞水平上可视化脑中风发生时大脑的结构和功能的变化，同时能在体内实时研究不同细胞之间的相互作用，对脑中风的主要发病特征——血流量的成像也具有明显的优势，能更好地提供关于组织损伤和修复过程中的脑部信息，促进中风的诊断和治疗的研究.

3.2　多光子成像技术在脑中风发病模型脑部细胞研究中的应用

神经元是组成神经中枢系统的重要组成部分，因此，在脑中风发病情况下对神经元形态和功能进行观察非常必要.Sigler等[40]利用局部注射内皮素来诱发脑中动脉缺血（middle cerebral artery occlusion，MCAO）环境，利用双光子成像观察到当血流量供应为正常情况下的50%时，在5 h内树突的形状尚未发现明显的变化，而当血流量的供应减少到只剩10%时，树突和树突棘的形状在10 min内便发生了较大的变化，原本连贯的树突结构变成了明显的珠状.随后，他们中止缺血实验，并对其进行再灌注.实验结果显示，再灌注后树突和树突棘均进行了重塑，恢复到了之前的形状.Kislin等[41]也进行了相似的研究，他们采用的双光子系统在活体检测时可达到0.332 μm的横向分辨率和1.640 μm的轴向分辨率.不同的是，他们在树突形状变成珠状时尝试观察神经元的线粒体状况.由于大视野成像限制了图像的信噪比，难以对单个线粒体的形状变化进行分析，故他们在成像过程中采用了算法对成像结果进行统计分析并建立3D模型.发现在脑部缺血情况下神经元线粒体发生严重肿胀，与对照组对比观察到缺血情况下肿胀的球状线粒体通过薄的线粒体片段相互连接，表明了线粒体正在发生裂变，线粒体网络被损坏，引发了线粒体自身的严重损伤并且可能导致细胞的死亡.线粒体的裂变和树突的损伤同时发生，表明脑损伤时树突出现的珠状现象也有可能是由于线粒体的裂变引起的，并且在中度和轻度损伤中，线粒体碎裂是可逆的，在1~2周后其结构可完全恢复.神经元线粒体对于脑部损伤具有很高的敏感性，而将双光子成像技术与其他技术相结合，能够在脑部损伤时对其进行实时成像分析，为疾病的研究提供有力的观测手段.

脑中风发病时，除了上述的神经元形态和功能会发生改变外，其他脑部细胞也会对损伤区域做出相应的反应.研究表明，星形胶质细胞在脑部损伤后会产生极化和增殖的现象.为了探究其动力学机制，Bardehle等[42]在GLAST/eGFP转基因小鼠中，分别用绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）和Texas Red－dextran标记星形胶质细胞和

血管并通过双光子荧光显微镜观察急性损伤后数周内成年小鼠大脑皮层中星形胶质细胞的反应. 由于双光子成像系统可进行长时程成像，故可对星形胶质细胞反应进行实时观察并记录其动态过程. 研究发现，星形胶质细胞对于损伤区域的反应具有异质性，其中有些星形胶质细胞保持着原先的状态，有些突触在脑部损伤后开始往损伤区域延伸，而邻近血管的星形胶质细胞则出现选择性增殖的现象. 内皮细胞对于脑血管梗塞的反应则较为明显. Carson 等[43]在表达绿色荧光蛋白的转基因小鼠中建立血栓模型，随后通过线扫描双光子显微成像记录血流速度以验证微血管闭塞和血管的重建，同时观察血管微栓子的移动情况. 发现血管微栓子附近的内皮细胞膜逐渐向外延伸，最终围绕微栓子，随后原始内皮细胞经历回缩，形成内皮开口，微栓子便通过该开口渗出，移位到血管周围实质中，血管重新恢复畅通（图9）. 观察到这种细胞变通机制对于闭塞血管的再通起到重要的作用，这种保护机制可能对微血管病变、中风恢复等有着重要的影响.

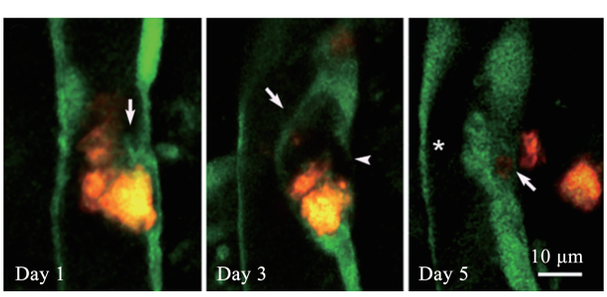


Fig. 9　Two-photon imaging of blood vessels（green）and emboli（orange）[43]

图9　利用TPEF成像技术对血管及微栓子进行观察[43]

通过双光子荧光成像技术观察到内皮细胞的扩增，使得微栓子从血管里移除，绿色代表血管，橙色代表微栓子.

3.3　多光子成像技术在脑中风发病模型血流量研究中的应用

脑中风是由脑部血液循环障碍导致的以局部神经功能缺失为特征的疾病，高血压、动脉粥样硬化、颅内血管发育异常等脑部血管疾病是造成脑中风的主要原因. 因此，对脑部血管进行成像并对其血流量等进行实时监测是检测脑中风发病的重要方法之一. 由于多光子成像能够以高分辨率对脑部血流和脑神经元活动进行活体实时成像，故利用多光子成像技术有助于我们理解神经血管耦合机制的内在逻辑，对于进一步研究脑部血流动力学以及相应的脑血管病有着重要的作用. 在利用多光子技术对脑部血流进行成像时，通常在实验模型的血液中注入荧光造影剂，随后红细胞在血管中的流动反映为视野下暗影的移动. 目前已研发了多种适用于血液成像的荧光造影剂. 由于小的荧光分子能透过血脑屏障，而当荧光分子渗透到组织液中时会增加背景亮度，降低了成像的分辨率，故通常将荧光团与大的惰性分子结合起来，如重葡聚糖等[44]. 这类探针通常具有低细胞毒性、高量子产率和高光稳定性等特点，适合血管动力学的深度成像. 除此之外，也可使用近红外探针来进一步增加成像深度. 总之，适用于多光子激发的新型探针开发使得血管成像成为可能，同时也为研究血管功能和血脑屏障渗透性奠定了基础. Nishimura 等[45]就是通过双光子激光扫描显微镜，利用荧光素结合重葡聚糖标记红细胞，通过开颅手术形成成像窗口并利用激光照射使小鼠形成血栓，随后观察血管闭塞前后的血流情况. 他们在研究中，通过双光子成像可清晰看见血管中的血栓，同时移动的红细胞在视野里呈现出暗条纹的形状，而条纹斜率的方向和大小则分别代表了红细胞移动的方向和速度（图10）.

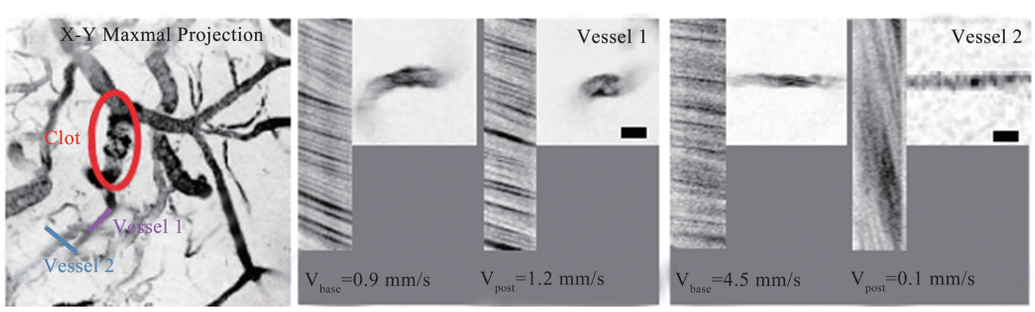


Fig. 10　Multiphoton imaging of blood clots and nearby blood flow using[45]

图10　利用多光子成像技术对血栓及附近的血流量进行成像[45]

X-Y Maxmal Projection：X-Y最大截面图；Clot：血栓；Vessel 1：血管1；Vessel 2：血管2.

用多光子成像技术结合其他技术也可对成像系统进行优化从而获得更好的成像效果. 当脑部中风发作后，许多患者在没有进行任何治疗的情况下，脑部损伤区域会出现新的血管结构，组织细胞和血管也会发生再灌注现象. 因此，为了研究其损伤恢复机制，需要一种技术能够对脑部损伤区域进行无损的、定量的、长达数周的成像. Schrandt等[46]结合双光子成像技术和多次曝光散斑成像技术对中风模型进行了长期观察. 多次曝光散斑成像技术能对测量提供准确的定量数据，而多光子荧光显微成像技术通过FITC-dextran标记使得微血管结构直接可视化，因此将两者结合可观察光致血栓闭塞后血管的延伸情况并跟踪整个期间脉管系统的变化. 结果发现，在由血栓引起的脑部缺血过程中，受损区域血流量降到标准值的25%左右，而在发病后的第14 d，发病区域血流量大幅回升，严重缺血区域面积只有发病后第3 d的1%，到发病后的第28 d，几乎整个发病区域的脉管系统都完成了再灌注. 除此之外，利用双光子成像也可以看到150 μm深处的毛细血管壁在发病后的恢复过程. 由于缺血后造成的严重皮质损伤再加上表皮脉管的染料渗透，在发病后的第7 d受损区域依然无法看到微脉管结构，直到发病后第14 d才得以观察到微脉管的再灌注现象，并且在血栓阻塞区域的脉管内会产生轻微的撞击现象，导致原始的表皮血管位置下降，随着机体的恢复，受损区域逐渐明亮，证明了新鲜染料已通过血液流向该区域，完成了再灌注.

4　多光子成像技术在其他脑疾病中的应用

除了在上述脑部疾病研究中发挥重要作用之外，多光子成像技术也可应用于脑肿瘤切除手术，通过对肿瘤进行成像，提高医生的确诊率和切除效率，避免手术过程伤到其他正常的脑部组织[47]. 脑肿瘤中以胶质瘤最为常见，且多属于恶性肿瘤，该肿瘤又称为弥散性神经胶质瘤. 其在脑实质周围呈现弥散性生长，是由于先天的遗传高危因素和环境的致癌因素相互作用所导致. 通常情况下，手术往往是胶质瘤治疗的第一步，通过手术不仅可以提供最终的病理诊断，而且可以迅速去除大部分的肿瘤细胞，缓解患者症状，并为下一步的其他治疗提供便利. 研究表明，胶质瘤患者的后续恢复状况与手术切除的范围有关[48]，故在手术中可利用多光子成像技术对胶质瘤进行成像，通过获取较大的成像视野和较高的成像分辨率来提高外科医生的诊断能力，使之能更好地识别肿瘤与正常组织的边界. 虽然该研究仍处于实验阶段，但由于多光子成像技术的高时空分辨率和较好的成像深度，以及具有对病理组织进行无标记实时成像等特点，使得研究人员能够通过这项技术，清楚地识别出人脑组织中细胞的增殖情况和核形态的多样性，这些特征对于脑部肿瘤的诊断极其有利，故利用多光子成像技术对脑部肿瘤进行研究也成为当前的研究热点并且有望推向临床.

早期脑肿瘤和正常的脑部组织之间具有完整的血脑屏障且几乎不吸收循环染料，故利用多光子对脑肿瘤进行成像时则要求能够对肿瘤细胞进行无标记成像并且能够在手术过程中实时将图像反馈给外科医生. 基于此，Kuzmin等[49]采用谐波成像技术对脑部胶质瘤进行无标记成像. 由于在弥散性神经胶质瘤中细胞的有丝分裂特别活跃，并且容易出现核变形以及微血管的增殖和坏死. 在这种情况下，谐波成像技术具有大尺度可视化组织完整形态的能力，因此在弥散性神经胶质瘤的研究中极具潜力. 他们先通过SHG/THG对正常脑部组织进行无标记成像并将成像结果与染料标记的图像进行对比，发现从整体到单个细胞水平的成像结果都一一相对应，证明了利用SHG/THG可对脑部组织进行成像分析. 随后对患有早期胶质瘤的脑部组织进行成像，发现肿瘤细胞很容易被区分开来，因为胶质细胞在THG技术成像时显示出暗圆形状，而在肿瘤区域，明显看出THG亮度降低，通过放大观察到细胞密度增加、神经纤维网变得稀疏、有的细胞能明显看到核仁、证明细胞正处于有丝分裂中（图11a）. 为了区分早期神经胶质瘤和晚期神经胶质瘤形态上的不同，他们继续对晚期神经胶质瘤的组织切片进行成像，发现在肿瘤区域细胞密度更大，细胞核占细胞质体积比重加大，细胞核出现多形性，为了供应肿瘤细胞极快的新陈代谢速率，其附近的血管也加速形成（图11b）. 同时，肿瘤还会破坏细胞内离子平衡，导致胞体对胞外溶液的摄取增加. 除此之外，由于成像的最终目标是为了对肿瘤边界进行病理学分析，使得在切除肿瘤组织时能够提高医生的诊断能力. Kuzmin等对多光子成像系统进行改进，通过由一个平凸透镜和两个带像差补偿的梯度折射率透镜组成高数值孔径的微物镜，使其多光子系统初具显微内窥镜雏形，并通过实验证实了成像的可靠性，证明多光子脑部肿瘤成像技术正朝着活检方向发展，有望对外科手术过程作出改

进. 由于双光子成像技术和二次谐波成像可在同一套成像系统中同时进行，故将双光子荧光成像技术与二次谐波结合也能对脑部肿瘤进行较好的成像分析. 如Jiang等[50]通过结合双光子和谐波来提高脑部成像的对比度，发现通过该方法能够获得与传统HE染色成像时相同的分辨率并足以识别脑膜、白质、海马体等脑部结构信息. 除此之外，还可以同时检测人脑肿瘤细胞、细胞外基质的胶原纤维以及在肿瘤微环境中的胶原沉积. 通过这种多模态成像，能够识别肿瘤微环境的变化，对于病情的诊断和监控具有重要的意义.

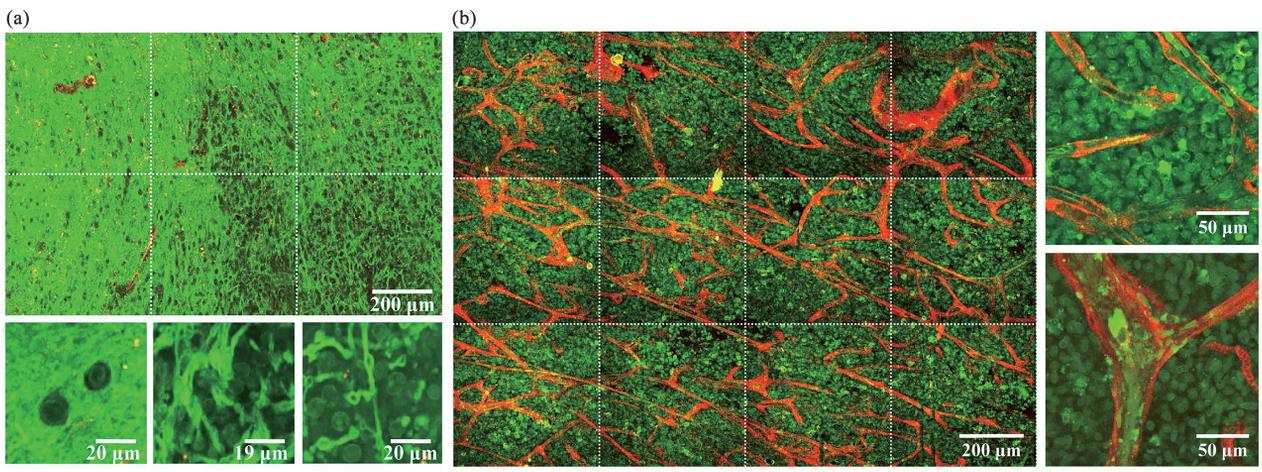


Fig. 11　Multiphoton imaging of gliomas and nearby blood vessels[49]

图11　对神经胶质瘤及其附近血管的多光子成像[49]

多光子成像技术在癫痫病的研究中也发挥重要的作用. 由于癫痫的发病机制非常复杂，中枢神经系统兴奋与抑制间的不平衡都会导致其发病. 有研究猜想，在颞叶癫痫中存在着异常的神经元-星形胶质细胞的代谢偶联，而辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NADH）在氧化和非氧化的细胞代谢中都是不可或缺的物质，并且属于内源性荧光分子. 因此，利用多光子荧光成像技术对该内源荧光信号进行成像，可以实现对离散细胞群体代谢水平的实时检测，从而反映出神经元和星形胶质细胞之间的变化，对疾病的诊断起到辅助作用[51]. Kelly等[52]利用多光子荧光成像技术对癫痫模型中的钙离子进行检测，并证实了钙离子浓度对癫痫患者脑部海马体齿状回区域的兴奋性能产生一定的影响. 除此之外，多光子成像技术在神经信号之间的传导，脑部细胞的代谢以及药物的导向监测等方面都具有重要的作用.

5　总结与展望

经过几十年的发展，多光子成像技术以其高成像分辨率、低生物损伤性以及可进行三维成像等优势在生物医学研究领域占据了重要的地位并向人们展示了其在生物医学应用上的前景. 本文综述了多光子成像技术在阿尔茨海默病、脑中风、脑肿瘤等脑部疾病研究中的相关应用，但这些应用大部分还处于基础研究阶段，并且多光子成像技术存在系统体积较大、成像光谱窗口较窄等问题，通过以下方面的改进，有望使之能更适应于临床的需要：a. 装置尺寸微型化. 由于临床诊断及治疗通常要求微型装置甚至是通过内窥镜成像，故多光子成像技术需在平衡分辨率及体积的前提下进一步做出改进. 随着光纤技术及微纳光子学技术的发展，目前已成功实现了活体内窥成像. 如Liang等[53]在2017年搭建了第一个拥有亚细胞水平分辨率的光纤内窥系统，实现了对小鼠肾脏的无标记双光子内窥成像，但其系统的稳定性和成像速度仍然无法满足临床要求. b. 实现多色（荧光）成像. 由于在医学诊断过程中通常需要对多种病理特征进行监测，故需对不同标记荧光团同时激发进行多色成像，以便快速区分并实时动态监测这些荧光标记物. 而由于不同种类的荧光团最佳激发波长不同，使用传统的多光子成像会导致激发效率低下以及光谱重叠等问题，故

需对激发光源进行改进. 目前已报道可使用包含多种波长的激发光源进行多色双光子成像，如Herz等[54]就采用一个传统的波长调谐范围为700~1 000 nm的钛蓝宝石激光器以及一个光参量振荡器实现了对脑部神经系统和免疫系统的多色双光子荧光成像，但其成本昂贵且系统的搭建较为复杂，将其商业化还需科研工作者付出更多的努力. c. 与其他成像技术的联用. 由于不同的成像技术有其各自的优势，将多光子成像技术与其他成像技术结合形成多模态成像，能够实现优势互补，获取更多的样品信息，更有利于促进多光子显微技术在医学诊断中的应用. 相信随着多光子成像技术的发展和推广，其在脑部疾病的研究及其他领域的应用将会更加广阔，有望成为一种临床辅助诊断技术.

参 考 文 献

[1] Goeppert Mayer M. Über Elementarakte Mit Zwei Quantensprüngen(On elementary processes with two quantum steps). Annalen Der Physik, 1931, **401**(3):273-294

[2] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning microscopy. Science, 1990, **248**(4951): 73-76

[3] Horton N G, Wang K, Kobat D, *et al*. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. Nature Photonics, 2013,**7**(3):205-209

[4] Huang J, Li N, Wang Q, *et al*. A lysosome-targetable and two-photon fluorescent probe for imaging endogenous β-galactosidase in living ovarian cancer cells. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, **246**(2):833-839

[5] Li R, Wang X, Zhou Y, *et al*. Advances in nonlinear optical microscopy for biophotonics. Journal of Nanophotonics, 2018, **12**(03):1

[6] Zhuo S, Chen J, Xie S, *et al*. Extracting diagnostic stromal organization features based on intrinsic two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation signals. Journal of Biomedical Optics, 2009,**14**(2):020503

[7] Chan K Y, Wang W, Wu J J, *et al*. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. Lancet, 2013, **381**(9882): 2016-2023

[8] Prince M. Progress on dementia—leaving no one behind. Lancet, 2017,**390**(10113):e51

[9] Danborg P B, Simonsen A H, Waldemar G, *et al*. The potential of microRNAs as biofluid markers of neurodegenerative diseases - a systematic review. Biomarkers , 2014,**19**(4): 259-268

[10] Sehlin D, Fang X T, Cato L, *et al*. Antibody-based PET imaging of amyloid beta in mouse models of Alzheimer's disease. Nature Communications, 2016,**7**:10759

[11] Chaddad A, Desrosiers C, Toews M. Local discriminative characterization of MRI for Alzheimer's disease//Lelieveldt B, Rohr K. 2016 IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI). Prague, Czech Republic: IEEE, 2016: 1-5

[12] Debay D R, Reid G A, Pottie I R, *et al*. Targeting butyrylcholinesterase for preclinical single photon emission computed tomography (SPECT) imaging of Alzheimer's disease. Alzheimers & Dementia Translational Research & Clinical Interventions, 2017,**3**(2):166-176

[13] Park K S, Seo Y, Kim M K, *et al*. A curcumin-based molecular probe for near-infrared fluorescence imaging of tau fibrils in Alzheimer's disease. Organic &Biomolecular Chemistry, 2015, **13**(46):11194-11199

[14] Jesse S, Hyman B T, Bacskai B J. Preclinical characterization of amyloid imaging probes with multiphoton microscopy. Journal of Alzheimers Disease Jad, 2006,**9**(3 Suppl):401-407

[15] Dong J, Revilla-Sanchez R, Moss S, *et al*. Multiphoton *in vivo* imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease. Neuropharmacology, 2010,**59**(4-5):268-275

[16] Klunk W E, Bacskai B J, Mathis C A, *et al*. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. J Neuropathol Exp Neurol, 2002,**61**(9):797-805

[17] Meyer-Luehmann M, Spires-Jones T L, Prada C, *et al*. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature, 2008,**451**(7179):720-724

[18] Baik S H, Kang S, Son S M, *et al*. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid beta in the brain of Alzheimer's disease mouse model. Glia, 2016,**64**(12):2274-2290

[19] Farrar C, William C, Hudry E, *et al*. RNA aptamer probes as optical imaging agents for the detection of amyloid plaques. PLoS One, 2014,**9**(2): e89901

[20] Kwan A C, Duff K, Gouras G K, *et al*. Optical visualization of Alzheimer's pathology *via* multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation. Opt Express, 2009, **17**(5):3679-3689

[21] Lee J H K D H S. Label-free imaging and quantitative chemical analysis of Alzheimer's disease brain samples with multimodal multiphoton nonlinear optical microspectroscopy. Journal of Biomedical Optics, 2015,**5**(20):56013

[22] Knobloch M, Mansuy I M. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. Molecular Neurobiology, 2008, **37**(1):73-82

[23] Ouzounov D G, Wang T, Wang M, *et al*. *In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. Nature Methods, 2017,**14**(4):388-390

[24] Androuin A, Potier B, U. Valentin Nagerl, *et al*. Evidence for altered dendritic spine compartmentalization in Alzheimer's disease and functional effects in a mouse model. Acta Neuropathologica, 2018, **135**(6):839-854

[25] Scheff S W, Price D A, Schmitt F A, *et al*. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. Neurology, 2007,**68**(18):1501-1508

[26] Arendt T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta

Neuropathologica, 2009, **118**(1):167-179

[27] Tsai J, Grutzendler J K, Gan W B. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. Nature Neuroscience, 2004,**7**(11):1181-1183

[28] Spires-Jones T L, Melanie M L, Osetek J D, *et al*. Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. American Journal of Pathology, 2007, **171**(4):1304-1311

[29] Bittner T, Burgold S, Dorostkar M M, *et al*. Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. Acta Neuropathologica, 2012,**124**(6):797-807

[30] Karel S, Ryohei Y. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. Neuron, 2006,**50**(6):823-839

[31] Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, *et al*. GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. Glia, 2015, **63**(6):1036-1056

[32] Meyer-Luehmann M, Spires-Jones T L, Prada C, *et al*. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature, 2008,**451**(7179):720-724

[33] Bolmont T, Haiss F, Eicke D, *et al*. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. Journal of Neuroscience, 2008,**28**(16):4283-4292

[34] Zhao R, Hu W, Tsai J, *et al*. Microglia limit the expansion of β-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration, 2017,**12**(1): 47-57

[35] Khachaturian Z S. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. Ann N Y Acad Sci, 1994, **747** (1):1-11

[36] Brawek B, Schwendele B, Riester K, *et al*. Impairment of *in vivo* calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. Acta Neuropathologica, 2014,**127**(4):495-505

[37] Kuchibhotla K V, Goldman S T, Lattarulo C R, *et al*. Aβ plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis *in vivo* resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. Neuron, 2008,**59**(2):214-225

[38] Bai Y, Li M, Zhou Y, *et al*. Abnormal dendritic calcium activity and synaptic depotentiation occur early in a mouse model of Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration, 2017, **12**(1): 86-100

[39] Sakadžić S, Lee J, Boas D A, *et al*. High-resolution *in vivo* optical imaging of stroke injury and repair. Brain Research, 2015, **1623**:174-192

[40] Sigler A, Murphy T H. In vivo 2-photon imaging of fine structure in the rodent brain: before, during, and after stroke. Stroke, 2010, 41 (10, Supplement 1):S117-S123

[41] Kislin M, Sword J, Fomitcheva I V, *et al*. Reversible disruption of neuronal mitochondria by ischemic and traumatic injury revealed by quantitative two-photon imaging in the neocortex of anesthetized mice. The Journal of Neuroscience, 2017, **37**(2): 333-348

[42] Bardehle S, Krüger M, Buggenthin F, *et al*. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. Nature Neuroscience, 2013,**16**(5):580-586

[43] Lam C K, Yoo T, Hiner B, *et al*. Embolus extravasation is an alternative mechanism for cerebral microvascular recanalization. Nature, 2010,**465**(7297):478-482

[44] Urban A, Golgher L, Brunner C, *et al*. Understanding the neurovascular unit at multiple scales: Advantages and limitations of multi-photon and functional ultrasound imaging. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017,**119**:73-100

[45] Nishimura N S C B F. Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **104**(1): 365-370

[46] Schrandt C J, Kazmi S M, Jones T A, *et al*. Chronic monitoring of vascular progression after ischemic stroke using multiexposure speckle imaging and two-photon fluorescence microscopy. J Cereb Blood Flow Metab, 2015,**35**(6):933-942

[47] Zanello M, Poulon F, Pallud J, *et al*. Multimodal optical analysis discriminates freshly extracted human sample of gliomas, metastases and meningiomas from their appropriate controls. Scientific Reports, 2017,**7**: 41724

[48] Sanai N, Berger M S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery, 2008,**62**(4):753-764, 264-266

[49] Kuzmin N V, Wesseling P, Hamer P C D W, *et al*. Third harmonic generation imaging for fast, label-free pathology of human brain tumors. Biomedical Optics Express, 2016,**7**(5):1889-1904

[50] Jiang L, Wang X, Wu Z, *et al*. Label-free imaging of brain and brain tumor specimens with combined two-photon excited fluorescence and second harmonic generation microscopy. Laser Physics Letters, 2017,**14**(10):105401

[51] Chia T H, Williamson A, Spencer D D, *et al*. Multiphoton Fluorescence Imaging of NADH to investigate metabolic changes in human epileptic tissue *in vitro*//Kaertner F, Meyer J. 2007 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO). Baltimore, MD, USA:IEEE, 2008:1-2

[52] Kelly T, Beck H. Functional properties of granule cells with hilar basal dendrites in the epileptic dentate gyrus. Epilepsia, 2017, **58**(1):160-171

[53] Liang W, Hall G, Messerschmidt B, *et al*. Nonlinear optical endomicroscopy for label-free functional histology *in vivo*. Light: Science & Applications, 2017,**6**(11):e17082

[54] Herz J, Siffrin V, Hauser A E, *et al*. Expanding two-photon intravital microscopy to the infrared by means of optical parametric oscillator. Biophysical Journal, 2010,**98**(4):715-723

Application of Multiphoton Microscopic Imaging in The Research on Brain Disease*

HUANG Yan-Xia, ZHOU Fei-Fan, ZHOU Ting, XU Hao, LIN Dan-Ying, QU Jun-Le**

(*Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen* 518060, China)

Abstract　Multiphoton microscopy is an important biomedical imaging modality with great potential in the diagnosis of various diseases, due to high resolution, low damage, and long-term imaging of living organisms. Especially for the research on brain diseases, multiphoton microscopy can be used to observe neuron, blood vessels, tumors, and their interactions, which can further reveal the pathogenesis of brain diseases and direct the developement of diagnosis and treatment methods. This review introduces the basic principles and characteristics of multiphoton microscopy, and its applications in the study of various brain diseases, such as Alzheimer's disease, stroke and tumor. We highlight recent achievements in brain diseases using multiphoton microscopy and give an outlook on the development of multiphoton microscopy that isexpected to play a greater role in the study of brain diseases.

Key words　multiphoton microscopic imaging, brain disease, bio-optical imaging

DOI：10.16476/j.pibb.2019.0095

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China（61525503，61620106016，61835009，81727804），Science and Technology Innovation（Key）Project of Guangdong Higher Education Institutions（2015KGJHZ002，2016KCXTD007），Guangdong Provincial Natural Science Foundation （2014A030312008） and Shenzhen Basic Research Project （JCYJ20150930104948169，JCYJ20160328144746940，JCYJ20170412105003520）.

** Corresponding author.

Tel：13714776252，E-mail：jlqu@szu.edu.cn

Received：May 4，2019　Accepted：July 11，2019