

☆ 方法与技术 ☆

双光子显微成像技术在针灸研究中的应用前景

苏雨昕, 王佳, 王雨晴, 刘一寒, 徐东升, 白万柱, 崔晶晶
(中国中医科学院针灸研究所, 北京100700)

【摘要】 双光子显微镜凭借其深层组织穿透能力、低光毒性、高空间分辨率、抗光散射特性及长工作距离等优势,已成为活体组织、深层结构及透明化处理厚组织成像的理想工具,并广泛应用于生物医学研究领域。然而,该技术在针灸研究中的应用尚处于起步阶段。鉴于双光子显微成像技术在针灸研究中的巨大潜力,本文系统阐述双光子显微成像技术的原理与技术优势,并综述其在针灸领域的最新应用进展。同时,通过整合二次谐波生成成像、光遗传学、基因编辑及组织透明化技术,提出面向针灸研究的创新融合,对如何利用双光子显微镜获得高质量成像提供具体建议。以期推动该技术在针灸研究中的深度应用,实现针灸效应的在体实时动态观测,为揭示针灸作用机制提供有力的技术支持。

【关键词】 双光子显微镜;针灸;融合策略;在体成像;组织透明化技术

The application prospects of two-photon microscopy imaging technology in acupuncture research

SU Yu-xin, WANG Jia, WANG Yu-qing, LIU Yi-han, XU Dong-sheng, BAI Wan-zhu, CUI Jing-jing (Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

【ABSTRACT】 Two-photon microscopy, with its exceptional capabilities in deep tissue penetration ability, low phototoxicity, high spatial resolution, anti-light scattering properties, and long working distance, has become an ideal tool for imaging living tissues, deep structures, and optically cleared thick-tissue samples, and is widely used in the field of biomedical research. However, the application of this technique in acupuncture research is still in its early stage. Given the great potential of two-photon microscopy imaging in acupuncture research, this article systematically explains the principles and technical advantages of two-photon microscopy, and reviews its latest application progress in the field of acupuncture and moxibustion. At the same time, by integrating second harmonic generation imaging, optogenetics, gene editing, and tissue clearing techniques, innovative strategies tailored for acupuncture and moxibustion research are proposed. Concrete suggestions are also provided for achieving high-quality imaging with two-photon microscopy. These efforts aim to facilitate the advanced application of this technology in acupuncture and moxibustion research, enable real-time dynamic *in vivo* observation of acupuncture effects, and provide robust technical support for elucidating the underlying mechanisms of acupuncture and moxibustion.

【KEYWORDS】 Two-photon microscopy; Acupuncture and moxibustion; Fusion strategy; *In vivo* imaging; Tissue clearing technology

针灸通过刺激特定穴位调节人体神经-内分泌-免疫系统功能,从而促进机体恢复稳态。然而,其作用机制涉及多层次生物效应,传统研究手段在实时解析针刺信号传导、动态追踪细胞响应及评估深层组织调控过程等方面存在局限性。随着现代技术的发展,如何实现针灸刺激的瞬时生物反应

捕获、跨尺度信号通路动态监测及深层组织效应可视化,已成为针灸机制研究的重要方向。

双光子显微镜(TPM)凭借其高组织穿透性、低光毒性和高空间分辨率等技术优势,成为生命科学的重要工具。TPM不仅可通过非线性光学效应实现活体组织的三维动态成像,还可与其他前沿

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250490

引用格式:苏雨昕,王佳,王雨晴,等.双光子显微成像技术在针灸研究中的应用前景[J].针刺研究,2026,51(5):653-658.

项目来源:国家自然科学基金项目(No. 82474648,82474219,82305093);国家重点研发计划青年科学家项目(No.2025YFC3510500);中国中医科学院科技创新工程项目(No.CIZJS2025001);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. ZZ-YJ2023004,ZZ-YJ2023001)

通信作者:崔晶晶,E-mail:cuijing101@163.com

技术(如光遗传学、荧光探针标记)高度兼容从而拓展观测维度^[1-2],目前已在神经环路解析、免疫细胞迁移追踪等领域获得广泛应用^[3-5],为生物医学研究提供了从离体结构解析到在体功能监测的全方位技术支持。

值得注意的是,TPM在针灸基础研究中的应用潜力尚未充分开发。通过结合二次谐波成像、基因编辑调控、光遗传学和组织透明化技术,TPM能够实时观测针灸干预下分子标记物的时空分布变化、细胞间通讯动态及神经-免疫互作网络的重构过程。这种多模态技术融合策略为阐释针灸的调控机制提供了全新的研究范式,有望推动针灸学科向量化、可视化方向发展。

1 TPM 成像原理及其优势

1.1 双光子显微成像技术原理

TPM基于双光子激发原理,其理论基础由Maria Göppert-Mayer于1931年在量子跃迁研究中首次提出^[6]。当荧光分子在高光子密度激光场中同时吸收两个长波长近红外光子(700~1 300 nm)时,其总能量可等效于单个短波长可见光/紫外光子(约350~550 nm)的激发能级,并由此发射出波长更长的特征荧光(典型范围450~650 nm)。双光子激发过程具有严格的时空同步性,要求两个入射光子到达时间差小于荧光分子激发态寿命(飞秒级脉冲窗口),这种非线性光学特性赋予了TPM独特的空间选择性。

从数学角度分析,双光子激发概率与入射光强的平方成正比,仅在激光聚焦的微小三维空间内达到有效激发阈值。这种自局限特性突破了传统显微技术的共焦针孔限制,在实现光学层析成像的同时,彻底消除了离焦背景干扰,使系统信噪比提升约2~3个数量级。经理论计算证实,TPM在活体组织中的轴向分辨率可达1~2 μm,横向分辨率优于0.5 μm,显著高于激光扫描共聚焦显微镜^[7-8]。

1.2 深层组织成像的物理基础

TPM采用近红外波段(700~1 300 nm),其深层组织穿透能力基于以下协同机制:生物组织对近红外光的散射系数较可见光降低约90%,显著减少了光散射对成像质量的影响;同时,血红蛋白和胶原等主要吸光成分在650~950 nm及1 000~1 350 nm波段的吸收系数较可见光波段下降近3个数量级,形成“光学透明窗口”。此外,长波长激发光(高穿透性)与短波长发射光(高反射率)的互补效应,进

一步提升了TPM的成像深度与信噪比。实验结果表明,TPM在小鼠大脑皮层的有效成像深度可达800 μm,较单光子荧光显微技术提升4~6倍,且能清晰分辨深层血管网络及神经元突触结构^[9]。

1.3 活体成像的生物学优势

TPM的活体兼容性源于其独特的光物理特性。首先,近红外光子的低能量相较于单光子紫外激发减少约63%,使细胞光毒性降低80%以上,显著延长活体样本的存活周期^[10];其次,双光子激发的非线性空间约束效应将荧光分子受激体积限制在亚飞升量级范围内,结合飞秒级脉冲光源的瞬时辐照特性,可将光漂白速率降低30%~50%,从而支持长达数小时的高频动态观测^[11];此外,实验数据表明,TPM连续成像48 h后细胞存活率仍高于95%,且线粒体膜电位、钙离子振荡等关键生理指标无显著异常^[12]。这种低侵入性优势使TPM能够实现对活体深层组织的长时程、高保真三维成像,为针灸干预下神经-免疫互作的动态解析提供了不可替代的技术手段。

2 TPM 在针灸研究中的应用

尽管TPM成像技术具有显著的优势,但其在针灸领域中的应用尚处于初步探索阶段,目前的研究内容相对局限,主要集中在以下几方面:①利用TPM在体钙成像技术,实时观测针刺后肌肉组织内钙信号变化^[13]和中枢神经系统中神经元与星形胶质细胞钙信号变化^[14-16],以及不同温度热刺激“足三里”诱发健康小鼠大脑左侧初级躯体感觉皮层后肢区神经元的钙离子荧光成像^[17];②采用TPM实现活体肾脏血流成像,观察电针调节糖尿病小鼠肾脏血流的可视化改变^[18-20];③结合TPM活体成像技术直接观察电针“夹脊”改善肌萎缩侧索硬化(ALS)小鼠脊髓血管白细胞激活作用^[21]。

TPM在针灸机制研究中的优势,主要体现在能够在体条件下对活体组织实现高分辨率成像,不仅突破了传统体外实验的局限性,还满足了对组织长时程动态变化的实时观测需求。通过多色荧光标记技术,TPM可同步捕捉神经元与胶质细胞等不同类型细胞的协同活动,为解析其相互作用机制提供直接证据。该技术还能整合结构成像与功能分析,既可清晰呈现微血管网等精细结构,又能定量评估血流动力学等生理参数。这些优势使其成为研究针刺效应的理想工具。然而,TPM在针灸研究中的应用仍面临挑战,主要源于其对活体/离体样

本的高要求,以及实验动物个体差异导致的样本制备与成像条件优化难题。

尽管面临诸多挑战,随着 TPM 技术的持续革新与跨学科融合,其在针灸机制研究中的应用前景愈发广阔。基于此,本文将系统阐述 TPM 成像技术的核心功能及其多技术协同整合策略,为针灸研究提供有力的技术支撑,促进针灸学科的科研创新与技术进步。

3 TPM 成像技术在针灸研究中的应用前景

3.1 利用二次谐波生成(SHG)技术在体无创观察针灸效应

SHG 是一种非线性光学现象,通过激发非中心对称分子结构产生倍频信号,在无标记条件下实现高分辨率、无创性成像^[22]。TPM 可利用 SHG 技术对组织的内源性非对称结构进行扩展应用,通过倍频效应精确观测生物样品,并无创揭示其内部的微观结构^[23]。人体皮肤内源性成分能够产生特征性光学信号,其中角蛋白、细胞质、弹性纤维及细胞外基质等产生双光子激发荧光信号;胶原纤维、微管蛋白和肌球蛋白等非中心对称结构通过 SHG 信号形成倍频光学效应,而细胞核和血管管腔一般不产生荧光信号^[24]。TPM 通过同步采集以上信号,在无标记条件下可实现亚细胞级别的三维成像^[25-27]。研究表明,SHG 信号的成像质量随着组织厚度的增加而提高,这一特性使其在深层组织成像中表现出显著优势^[28]。肌腱由于富含胶原蛋白且属于细胞外基质高度富集的组织,也成为 TPM 进行无创性分析的理想样本^[29]。此外,基于 SHG 成像技术的内源性信号特性,能够对皮肤、肌肉等组织的微观结构和能量代谢进行实时、无创的动态监测,在活体皮肤和肌肉组织研究中展现出独特的应用价值和技术优势^[30]。综上,TPM 与 SHG 技术相结合不仅显著提高了成像分辨率和深度,还在活体深层组织和动态变化的研究中展现出独特优势。

SHG 的独特性使其能够实现针刺干预过程进行长时程、纵向跟踪观察,在不干扰正常生理状态的前提下,无创记录针灸刺激后局部皮肤和肌肉组织的动态变化,并进一步解析刺激后局部组织在微观层面的结构与功能调整,揭示针灸的作用机制。

3.2 结合光遗传学技术在体观察针灸效应

作为神经科学领域的一项重要工具,光遗传学技术通过光刺激精准激活或抑制特定神经元,为解析神经回路与功能调控机制开辟了全新研究路径。

近年来,该技术已广泛应用于针灸研究,在清醒的实验动物模型中,通过靶向特定神经通路的活动和分子表达调节,揭示了针刺效应对神经元活动的动态影响和脑功能的整体调控^[31]。然而,传统成像手段在提高时空分辨率方面受限,难以满足细胞及亚细胞尺度下的长时程动态观测需求。在这一背景下,TPM 活体成像技术凭借单细胞和单血管级的高分辨率优势,弥补了脑科学研究的技术瓶颈,为在体研究针刺干预对大脑微观结构和功能的动态影响提供了强有力的技术支持^[32]。

目前,光遗传学技术与 TPM 的联合应用在中医药脑科学研究中取得了诸多突破性进展^[33]。借助光遗传学技术的高时空分辨率及细胞类型特异性优势,结合 TPM 更清晰地观测神经元活动及组织结构,不仅有助于深入探究针灸对特定神经元的作用,还可研究其在分子信号通路调控中的精确定位及动态变化。这种结合为全面阐释针灸的神经生物学效应及其潜在机制提供了新的技术思路。

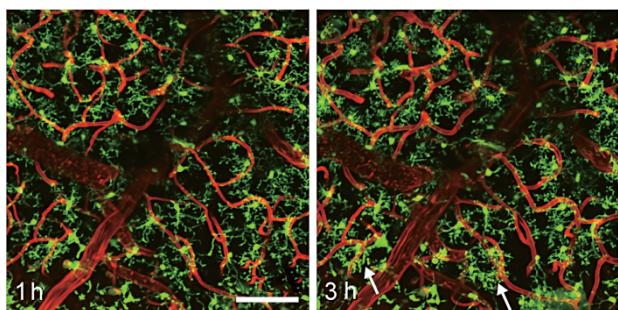
3.3 结合转基因动物在体观察针灸效应

荧光报告动物是基因编辑技术在活体研究中的重要工具,能够通过荧光蛋白或生物发光标记,在特定波长激发下实现细胞或组织的精准标记和动态观测^[34]。相比传统荧光成像技术,TPM 凭借其非线性光学效应,显著减少了组织光散射对信号分辨率的影响,从而在更深组织层中实现动态的结构和功能成像^[35]。当 TPM 与转基因荧光示踪动物模型相结合时,通过荧光蛋白标记可实时动态监测细胞功能活动,如神经元兴奋性及细胞迁移等,见图 1。

荧光报告动物和 TPM 的结合应用,为针灸研究提供了细胞和分子水平的可视化手段。借助遗传编码荧光探针(如 GCaMP),研究者可以在活体动物模型中实时监测针灸刺激诱导的神经元钙信号变化,从而揭示针灸对特异神经元活动的影响。此外,通过神经肽荧光探针的应用,研究者可进一步解析针灸引起的神经肽的释放动态和调控机制^[36]。因此,转基因动物模型与 TPM 的整合应用,为针灸机制研究提供了高度可控的实验手段。

3.4 结合组织透明化技术进行针刺干预后的厚组织标本成像

组织透明化技术可有效去除散射介质(如脂质),在维持组织结构完整性的同时,使厚组织透明化,从而实现不切片直接成像^[37]。这在宏观尺度下研究神经元、神经纤维、血管网络空间分布等提



注:标尺=100 μm。采用小胶质细胞发光小鼠制备大脑中动脉闭塞模型,通过眶后静脉注射染料(德克萨斯红)标记血管。造模后1 h,可在双光子显微镜下清晰观察到皮层血管及激活的小胶质细胞,3 h时可看到小胶质细胞进一步激活并向缺血部位迁移(箭头所指)。图中绿色为激活的小胶质细胞,红色为德克萨斯红染料标记的脑血管。

图1 双光子显微成像在体动态观察大脑中动脉闭塞模型中小胶质细胞的激活与迁移

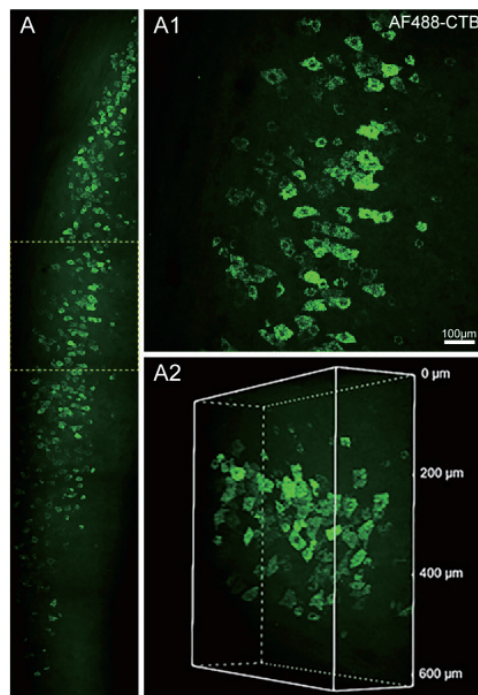
Fig. 1 Two-photon microscopy was used to dynamically observe the activation and migration of microglia in a middle cerebral artery occlusion model *in vivo*

供了有力的支持^[38-39]。TPM在厚组织成像中具有独特优势,与透明化技术结合后,可以穿透5~8 mm的厚组织,实现厚组织在高分辨率下的三维成像。二者的结合能够精确揭示生理和病理状态下组织器官的微观结构变化,同时避免传统切片技术可能导致的空间信息丢失问题。

TPM结合组织透明化技术为针灸机制研究提供了新的三维可视化研究策略。在针灸研究中,该技术可对完整针灸穴位样本实现毫米级深度、亚微米级分辨率的三维成像进而系统解析穴位区域的神经纤维分布、血管网络构筑及免疫细胞的空间定位,并结合免疫荧光标记定量分析针灸刺激后不同分子靶点的空间表达变化。后期通过优化透明化方案与多色标记策略,有望建立针灸穴位的高精度三维图谱,并结合TPM实现快速大样本筛查,为针灸的形态学基础及分子调控网络研究提供新的技术支持,见图2。

4 在针灸研究中应用TPM成像技术获得高质量成像的方法

TPM成像技术获得的微观结构图像拥有较高的完整性和高空间分辨率,但该技术对生物样品制备及拍摄条件的要求严苛,这可能是其尚未在针灸研究领域得到广泛应用的重要原因之一。样品的细微差异会显著影响成像质量,为确保TPM成像技术在针灸基础研究中的有效应用,研究人员需要注意以下几点:首先,活体观察需确保动物状态良



注:通过小鼠坐骨神经注射0.5 μL 0.1%荧光素488结合霍乱毒素亚单位B(AF488-CTB),3 d后经心脏灌流取出脊髓,并对腰段脊髓采用RapiClear方法进行透明化处理;TPM为双光子显微镜,采用TPM的25倍水镜成像,AF488-CTB标记的阳性运动神经元在脊髓前角呈柱状分布(图A),图A1是图A方框区域的放大图,图A2为图A1的三维立体渲染图,清晰展示了阳性标记运动神经元的空间分布特征。

图2 逆行示踪、组织透明化与TPM成像联合揭示小鼠脊髓前角运动神经元的三维空间分布

Fig. 2 Combined retrograde tracing, tissue clearing, and TPM imaging reveals the three-dimensional spatial distribution of motor neurons in the ventral horn of the mouse spinal cord.

好,固定方法恰当,应选用适配的固定装置以提升实验稳定性与可重复性^[18,40-42]。其次,对于透明化组织,在样本制备过程中,需确保组织达到完全透明化状态,来实现荧光标记的高分辨率成像。具体而言,在组织透明化结合多重免疫荧光染色时,应依据研究目标的特异性,选择具有显著光谱差异性的荧光分子探针,避免串色。同时,需根据TPM物镜的数值孔径和折射率等光学参数,优化选择相匹配的透明化试剂和成像介质,从而实现组织深层结构的清晰成像。再次,拍摄条件的合理选择对成像质量至关重要。需依据样品特性,精准调整激发波长、信噪比等参数,以呈现最优的成像效果,减少噪声干扰,提升图像质量。最后,实验人员应深入了解相关领域的背景知识,特别是荧光标记物的特性,提高实验效率,以便进行针对性的拍摄方案设计,确保TPM成像技术在针灸研究中发挥最大效能。

5 小结与展望

TPM成像技术凭借其穿透性强、光毒性低和空间分辨率高等优势,在工作距离、成像速度及成像深度等关键指标上,已经突破了传统光学显微镜的限制。该技术能够实现活体动物多部位的长时程、可视化观测,为在体研究中的动态观测提供了不可替代的手段。凭借其强大的实时动态观测能力,TPM成像技术大大推动了研究从离体实验向在体实验、从结构解析至功能探索的跨越,为深入揭示针灸生物学效应的复杂机制开辟了新的研究路径。此外,TPM成像技术展现出强大的整合能力,能够与基因编辑工具、光遗传学及组织透明化等前沿技术相结合,实现对神经结构的高分辨率成像与功能活动的精准解析。这种多技术融合进一步扩展了研究的广度与深度,给针灸作用机制研究提供了新的探索方向。作为未来科学研究的重要技术工具,TPM成像技术在揭示穴位效应启动与调控的分子机制、解析特定穴刺激激活的神经纤维类型,以及结合其他技术研究针刺信号从中枢整合到靶器官效应的神经环路等方面,展现出了巨大潜力。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者白万柱为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] ADESNIK H, ABDELADIM L. Probing neural codes with two-photon holographic optogenetics [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(10): 1356-1366.
- [2] 袁士阳. 基于活体钙成像观察脊髓损伤后大脑皮层钙信号变化的实验研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2020.
YUAN S Y. The study of cortical calcium signal changes after spinal cord injury based on in vivo calcium imaging (in Chinese)[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2020.
- [3] BARSON D, HAMODI A S, SHEN X L, et al. Simultaneous mesoscopic and two-photon imaging of neuronal activity in cortical circuits[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 107-113.
- [4] ZHANG T, HERNANDEZ O, CHRAPKIEWICZ R, et al. Kilohertz two-photon brain imaging in awake mice [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1119-1122.
- [5] GROOTVELD A K, KYAW W, PANOVA V, et al. Apoptotic cell fragments locally activate tingibile body macrophages in the germinal center[J]. *Cell*, 2023, 186(6): 1144-1161.
- [6] GÖPPERT MAYER M. Elementary processes with two quantum transitions [J]. *Ann Phys-Berlin*, 1931, 9 (3): 273-294.
- [7] OHEIM M, BEAUREPAIRE E, CHAIGNEAU E, et al. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth[J]. *J Neurosci Methods*, 2001, 111(1): 29-37.
- [8] CHEN W, NATAN R G, YANG Y H, et al. In vivo volumetric imaging of calcium and glutamate activity at synapses with high spatiotemporal resolution [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6630.
- [9] 李少强, 耿俊娴, 李艳萍, 等. 多光子成像技术的生物医学应用新进展[J]. *物理学报*, 2020, 69(22): 258-275.
LI S Q, GENG J X, LI Y P, et al. New advances in biomedical applications of multiphoton imaging technology (in Chinese)[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(22): 258-275.
- [10] RYU J, KANG U, SONG J W, et al. Multimodal microscopy for the simultaneous visualization of five different imaging modalities using a single light source[J]. *Biomed Opt Express*, 2021, 12(9): 5452-5469.
- [11] QIN Z Y, CHEN C P, HE S C, et al. Adaptive optics two-photon endomicroscopy enables deep-brain imaging at synaptic resolution over large volumes [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(40): eabc6521.
- [12] AHANONU B, CROWTHER A, KANIA A, et al. Long-term optical imaging of the spinal cord in awake behaving mice [J]. *Nat Methods*, 2024, 21(12): 2363-2375.
- [13] LI G, LIANG J M, LI P W, et al. Physiology and cell biology of acupuncture observed in calcium signaling activated by acoustic shear wave [J]. *Pflugers Arch*, 2011, 462(4): 587-597.
- [14] CHANG X Y, CHEN K, CHENG T, et al. In vivo neuronal and astrocytic activation in somatosensory cortex by acupuncture stimuli [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(11): 2526-2529.
- [15] 华丽博. 电针对疼痛小鼠前扣带回皮层神经元影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
HUA L B. Study on the effect of electroacupuncture on neuronal activity in the anterior cingulate cortex (in Chinese) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2023.
- [16] 朱传安. 电针水沟穴对小鼠急性脑缺血半暗带神经元活动的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
ZHU C A. Effect of EA at DU26 acupoint on neuronal activity in the penumbra of acute cerebral ischemia in mice (in Chinese) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2020.
- [17] 朱海滨, 金传阳, 周航, 等. 小鼠初级体感皮层后肢区神经元对“足三里”不同温度热刺激的响应规律[J]. *针刺研究*, 2024, 49(4): 341-348, 375.
ZHU H B, JIN C Y, ZHOU H, et al. Responsive regularity of neurons in the hindlimb region of primary somatosensory cortex to different temperature thermal needle stimulation of “Zusanli” (ST36) in mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(4): 341-348, 375.
- [18] 魏文静, 廖美华, 谭宇航, 等. 基于双光子技术研究电针对糖尿病小鼠肾血管微循环的调控作用[J]. *针刺研究*, 2022, 47(6): 497-503.
WEI W J, LIAO M H, TAN Y H, et al. Effect of electroacupuncture on renal vascular microcirculation in diabetic mice based on in vivo two-photon microscopy imaging (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(6): 497-503.
- [19] XIANG J Q, WEI W J, LIAO M H, et al. Mitigation of renal microvascular injury in diabetic kidney disease model mice by electroacupuncture [J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2023, 33(3): 262-272.
- [20] 魏文静. 电针改善糖尿病小鼠早期肾血管损伤及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2022.
WEI W J. Study on the improvement of early renal vascular

- injury in diabetic mice by electroacupuncture and its mechanism (in Chinese) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2022.
- [21] 谭宇航. 电针夹脊穴改善肌萎缩侧索硬化症脊髓炎症损伤机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2022.
- TAN Y H. Study on mechanism of electroacupuncture at Jiayi point improving amyotrophic lateral sclerosis, spinal cord inflammatory injury (in Chinese) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2022.
- [22] AGHIGH A, BANCELIN S, RIVARD M, et al. Second harmonic generation microscopy: a powerful tool for bio-imaging [J]. *Biophys Rev*, 2023, 15(1): 43-70.
- [23] ZHANG Z Y, WANG M X, LIU Z H, et al. Application of second harmonic generation in biomedical imaging [J]. *Chin J Laser*, 2020, 47(2): 0207008.
- [24] SENDÍN-MARTÍN M, POSNER J, HARRIS U, et al. Quantitative collagen analysis using second harmonic generation images for the detection of basal cell carcinoma with ex vivo multiphoton microscopy [J]. *Exp Dermatol*, 2023, 32(4): 392-402.
- [25] 陈建新, 卓双木, 罗天舒, 等. 上皮组织的深度分辨非线性光谱成像技术 [J]. *中国科学(G辑: 物理学 力学 天文学)*, 2007, 37(S1): 132-137.
- CHEN J X, ZHUO S M, LUO T S, et al. Depth-resolved nonlinear spectral imaging of epithelial tissue (in Chinese) [J]. *Scientia Sinica (Physica, Mechanica & Astronomica)*, 2007, 37(S1): 132-137.
- [26] 孟潇琦, 刘亭微, 许阳. 双光子成像在皮肤科的临床应用进展 [J]. *皮肤科学通报*, 2024, 41(2): 154-158, 178.
- MENG X Q, LIU T W, XU Y. Advances in clinical application of two-photon imaging in dermatology (in Chinese) [J]. *Dermatology Bulletin*, 2024, 41(2): 154-158, 178.
- [27] 方娜, 吴赞艺, 王行富, 等. 多光子技术可视化血管型脑膜瘤 [J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617025.
- FANG N, WU Z Y, WANG X F, et al. Multiphoton technique for visualization of angiomatic meningiomas (in Chinese) [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617025.
- [28] 韩琴, 吴航军, 武灵云, 等. 双光子显微镜二次谐波成像条件探索及其应用 [J]. *分析测试学报*, 2025, 44(3): 521-526.
- HAN Q, WU H J, WU L Y, et al. Exploration and application of second harmonic imaging using two-photon microscope (in Chinese) [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2025, 44(3): 521-526.
- [29] VILLASEÑOR S, GRINSTEIN M. Two-photon microscopy for the study of tendons [J]. *J Vis Exp*, 2024(205): e65853.
- [30] DUDENKOVA V V, SHIRMANOVA M V, LUKINA M M, et al. Examination of collagen structure and state by the second harmonic generation microscopy [J]. *Biochemistry*, 2019, 84(Suppl 1): 89-107.
- [31] ZHU H, XIANG H C, LI H P, et al. Inhibition of GABAergic neurons and excitation of glutamatergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray participate in electroacupuncture analgesia mediated by cannabinoid receptor [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 484.
- [32] ISHII H, TAKAHASHI T, YAMAGUCHI K, et al. Advanced observation of brain and nerve cells using two-photon microscopy with novel techniques [J]. *Microscopy*, 2023, 72(2): 144-150.
- [33] 汪涛, 董钰婷, 李熯, 等. 光遗传和化学遗传在中医药脑科学研究中的应用 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(11): 1535-1539, 1545.
- WANG T, DONG Y T, LI M, et al. Application of optogenetics and chemogenetics in the brain research of traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2020, 15(11): 1535-1539, 1545.
- [34] 李欣, 刘昕昕, 牛铭晨, 等. 转基因动物技术及其应用 [J]. *东北农业科学*, 2024, 49(6): 72-77.
- LI X, LIU X X, NIU M C, et al. Transgenic animal techniques and applications (in Chinese) [J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2024, 49(6): 72-77.
- [35] OCANA-SANTERO G, PACKER A M, SHARP T, et al. In vivo two-photon microscopy reveals sensory-evoked serotonin (5-HT) release in adult mammalian neocortex [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2024, 15(3): 456-461.
- [36] 梁越, 张宁, 赵耀, 等. 脑神经环路常用技术及其在针灸领域应用研究 [J]. *针灸临床杂志*, 2024, 40(11): 6-12.
- LIANG Y, ZHANG N, ZHAO Y, et al. Common techniques for studying neural circuits and their application in acupuncture research (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2024, 40(11): 6-12.
- [37] 田婷, 杨朝阳, 李晓光. 组织透明化技术的研究与应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(21): 3363-3371.
- TIAN T, YANG Z Y, LI X G. Research and application of tissue optical clearing technique (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2020, 24(21): 3363-3371.
- [38] 唐倩, 侯兰伟, 刘宇宁, 等. 组织透明化技术在器官可视化应用中的初步探讨 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2024, 42(4): 393-398.
- TANG Q, HOU L W, LIU Y N, et al. Preliminary study on the application of tissue transparency technology in organ visualization (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2024, 42(4): 393-398.
- [39] 周康为, 杨林海, 邱棋, 等. 组织光透明技术在骨透明化中的生物医学成像应用与展望 [J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(20): 2000001.
- ZHOU K W, YANG L H, QIU Q, et al. Bone transparency imaging using tissue optical clearing technique (in Chinese) [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(20): 2000001.
- [40] 戎叶, 韩琴, 肖桂凤, 等. 长时间活体成像的小动物固定解决方案 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2024, 30(2): 67-75.
- RONG Y, HAN Q, XIAO G F, et al. Fixation devices for intravital imaging of small animals (in Chinese) [J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2024, 30(2): 67-75.
- [41] 李娟, 关苑君, 梁翠莎, 等. 小鼠双光子激光扫描显微镜活体成像窗口构建技术 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2022, 39(2): 229-235.
- LI J, GUAN Y J, LIANG C S, et al. Construction technologies of in vivo imaging window of mice for two-photon laser scanning microscopy (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2022, 39(2): 229-235.
- [42] 程雨飞, 张龙浩. 肺部活体显微成像技术的研究进展 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2023, 30(8): 1204-1209.
- CHENG Y F, ZHANG L H. Research progress of intravital microscopy of the pulmonary immune environment (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2023, 30(8): 1204-1209.