第 XX 卷第 XX 期
XXXX 年 XX 月

红 外 与 毫 米 波 学 报
J. Infrared Millim. Waves

Vol. XX, No. XX
XX, XXXX

文章编号:1001-9014(XXXX)XX-0001-09

DOI:10. 11972/j. issn. 1001-9014. XXXX. XX. 001

多视场多光子成像技术在神经科学研究中的发展与应用

王健平， 王琳毅， 董必勤*
(复旦大学工程与应用技术研究院,上海)

摘要:高时空分辨率的多脑区同步成像是神经科学研究中的关键需求,然而传统多光子显微技术受限于单视场成像模式,难以实现跨脑区的大范围神经活动观测。多视场多光子成像技术通过物镜前/后光路的视场分割策略,结合波长编码、空间分光及时间门控等多维信号解析方法,有效突破了传统技术的时空分辨率限制。该技术可实现毫秒级时间分辨率与微米级空间分辨率的跨脑区同步成像,为揭示皮层间功能耦合、皮层-亚皮层神经环路协同机制以及全脑尺度神经信号传播动力学提供了全新研究范式。未来,通过与内窥成像、自适应光学像差校正、光刺激以及深度学习的图像解析等技术的深度融合,多视场多光子成像将进一步推动神经环路功能架构的精准解析,并在神经退行性疾病诊疗与脑机接口开发等临床转化领域展现重要价值。

关 键 词:多光子显微; 多视场成像; 神经功能解析
中图分类号:R318　　**文献标识码**: A

Development and Applications of Multi-FOV Multi-photon Imaging Technology in Neuroscience Research

Wang Jian-ping, Wang Lin-yi, Dong Bi-qin*
(Academy for Engineering and Technology, Fudan University, Shanghai)

Abstract: High spatiotemporal resolution multi-region brain synchronization imaging is a critical requirement in neural circuit research. However, traditional multi-photon microscopy is limited by its single field-of-view (FOV) imaging mode, making it difficult to achieve large-scale observation of neural activity across multiple brain regions. The multi-FOV multi-photon imaging technology, through a field-of-view segmentation strategy in both the front and rear optical paths of the objective lens, combined with multi-dimensional signal analysis methods such as wavelength encoding, spatial demultiplexing, and time gating, effectively overcomes the spatiotemporal resolution limitations of traditional techniques. This technology enables millisecond-level temporal resolution and micron-level spatial resolution for synchronous imaging across brain regions, providing a novel research paradigm for revealing cortical functional coupling, cortical-subcortical neural circuit coordination mechanisms, and whole-brain neural signal propagation dynamics. In the future, through in-depth integration with techniques such as endoscopic imaging, adaptive optical aberration correction, optical stimulation and deep learning-based image analysis, multi-field-of-view multi-photon imaging will further advance the precise decoding of neural circuit functional architecture and demonstrate significant value in clinical translation fields such as neurodegenerative disease diagnosis and brain-machine interface development.

Key words: Multi-photon microscopy, Multi-FOV imaging, Neural function analysis
PACS:

引言

多光子显微成像技术(Multiphoton microscopy)作为现代生物医学研究的核心光学成像工具,基于非线性光学效应实现活体组织的高分辨率三维成像[1]。与传统荧光显微技术相比,多光子成像(主要包括双光子[2]和三光子[3]显微技术)利用近红外飞秒激光(典型波长范围:700-1700 nm)进行非线性荧光激发,这种长波长激发光显著降低了组织散射效应(散射系数与λ^-n成正比,n≈1-2),从而实现了毫米级(可达0. 6-1. 5 mm)的成像穿透深度[4]。更

* 通讯作者(Corresponding author): 电子邮箱:dongbq@fudan. edu. cn

重要的是，由于激发体积被限制在亚飞升级的焦斑区域（~0.1 fl），该技术不仅大幅减少了离焦光漂白，还显著降低了光毒性[5]。这些特性使其在神经科学研究中具有不可替代的优势：一方面可实现亚微米级分辨率（横向：0.3-0.5 μm；轴向：1-2 μm）的树突棘动态成像[6]，另一方面其穿透能力可完整覆盖啮齿类动物大脑皮层（可达皮层Ⅴ-Ⅵ层）甚至部分皮层下结构（如海马体）[7]。

随着研究者对神经活动从单细胞到网络层面进行整合分析的需求与日俱增，学界迫切渴望一种既能深入到脑组织深部、又可兼顾细胞乃至亚细胞分辨率，并能实时记录多脑区快速活动的新型成像方案。既要兼顾跨越数毫米距离的多脑区，又要捕捉神经活动在毫秒级时间尺度上的快速传播，才能深入揭示复杂神经环路的功能耦合与信息编码机制。例如，皮层-丘脑的视觉处理环路或涉及内侧前额叶皮层和多个皮下脑区的多节点社交环路中，彼此相距≥3 mm的多个核团需要同时记录其放电活动，才能完整追踪信号如何在各区域之间传播[8][9]。感觉运动行为（如触须摆动的θ振荡4-12 Hz[10]、眼动相关的γ振荡30-80 Hz[11]）以及病理节律（如癫痫样放电或帕金森病β振荡13-30 Hz[12]）等，都要求亚毫秒级甚至毫秒级的时间分辨率，以确保不遗漏神经信号的关键时刻或快速调控过程。满足这一系列需求，意味着成像系统必须兼具大视场（或跨视场）覆盖、细胞级乃至亚细胞级的空间分辨率，以及毫秒级的时间精度，同时能穿透到皮层下1毫米以上的深部脑区。

尽管现有的多通道电生理记录、宽场钙成像、功能磁共振成像以及单视场多光子成像等手段，为探究大脑神经活动提供了基本支撑，却在不同方面存在固有的不足。多通道电生理记录可同时获得多个脑区的单细胞放电信号，时间分辨率可以达到毫秒级，但空间分辨率的局限性使其难以识别和区分特定神经元亚型[13]。宽场钙成像虽能覆盖毫米级脑区，却往往只能采集脑表浅层的荧光信号，且分辨率较低，难以深入海马或丘脑等深部核团[14]。功能磁共振成像能提供宏观尺度上的全脑连接图谱，但其时间分辨率仅达秒级，无法实时追踪神经信号的快速传播[15]。单视场多光子成像兼具细胞级分辨率与较深的皮层穿透能力，因而被视为深层活体神经成像的重要研究工具[16][17][18]。然而，这种方法一次通常只能观测不到1 mm^2的局部区域，导致在跨脑区、跨节点的同步成像方面仍有所局限，无法完整捕捉常常跨越3-6 mm范围的神经网络活动。因此，要真正满足系统神经科学对于脑功能网络大范围、实时、高分辨的观测需求，多视场多光子成像技术的并行扫描模式和深部穿透能力就显得尤为重要，成为突破传统技术瓶颈的关键解决方案。

多视场多光子成像技术（Multi-FOV Multiphoton Microscopy）凭借跨脑区多视场的同步扫描与深部组织穿透能力，在空间和时间两个维度上显著优于传统成像手段。它在空间维度上打破了单视场的局限，可覆盖更大范围且实现多脑区、高分辨率的同时观测，能有效解析跨脑区神经环路的结构和功能关联；在时间维度上，创新的并行成像架构可达到毫秒级时间分辨率，从而完整记录神经活动的动态传播过程，为阐明脑区间信号传递的因果时序关系提供了关键实验依据。此外，通过将双光子与三光子成像技术系统整合，该方案在小鼠全脑尺度上实现了从大脑皮层至海马体等深层核团的多层次成像，轴向穿透深度可达1.2 mm，大幅突破了传统单光子显微技术在深部成像方面因组织散射和像差所带来的限制[19]。相较于多通道电生理记录、宽场钙成像和功能磁共振成像等方法，多视场多光子成像不仅能覆盖大范围的脑区域，还能以细胞级分辨率快速捕捉深层神经环路活动，为研究全脑尺度的神经网络动力学提供了空前的精度与时空同步性。综上所述，多视场多光子成像技术的出现为深层活体成像和跨脑区功能连接研究带来了前所未有的解决方案，也为未来在神经科学领域的大范围普及与应用奠定了坚实基础。

1 多视场多光子成像技术的实现

多视场多光子成像技术的核心实现方法关键在于如何有效分离多个视场并同步检测这些视场。根据视场分离的物理位置差异，本文将其技术路径系统划分为物镜后分离与物镜前分离两种方法；同时，依据多视场的检测手段不同，进一步将其划分为结合波长编码、空间分光及时间门控三种实现方式。

物镜后视场分离可通过多束激发光的空间参数进行一维或二维调控实现。通过独立控制各光束的偏转特性实现横向视场分离，同时利用发散角调控完成对视场轴向位置的调节。在该技术中，常见的配置如图1(a)所示，来自激光器的激发光首先

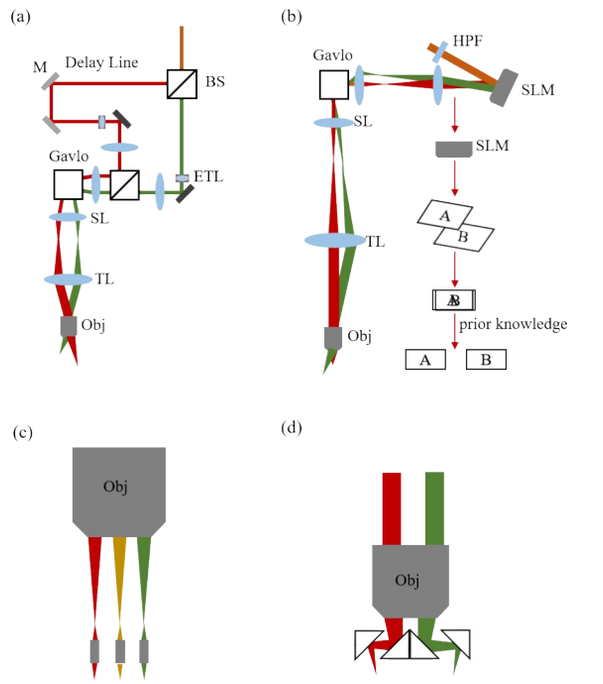

图 1　视场分离的实现方式。:(a) 发散-偏转法;(b) 相位调制法;(c) 微物镜阵列;(d) 微反射镜模块;BS, 分束镜;M,反射镜;ETL,电控可调焦透镜;Gavlo,振镜;SL,扫描透镜;TL,管透镜;Obj,物镜

Fig. 1　Implementation strategies for field-of-view separation: (a) Divergence-steering method; (b) Phase modulation method; (c) Micro-objective array; (d) Micro-mirror module; BS, beam splitter; M, mirror; ETL, electronically tunable lens; Galvo, galvanometer; SL, scanning lens; TL, tube lens; Obj, objective.

通过分光元件(如分光镜)分离为多束光,或采用多台激光器生成多束激发光。在偏转控制方面,系统采用光学偏转元件构建多维调制光路,典型方法是在各独立光束路径中分别配置一维或二维偏转反射镜组,通过赋予每束光不同的空间偏转参数($\Delta\theta_x$, $\Delta\theta_y$)实现毫米级的横向视场偏移。同时,通过集成动态调焦器件调控发散角来实现轴向位移[19]。也可以在光束传输路径中嵌入电控可调谐透镜或声梯度折射率透镜,实现数百微米范围内的轴向位移。使用远心调焦模块同样能够实现轴向视场的分离[20]。经过空间参数差异化调制的多束光通过分束镜耦合后进入扫描光路,最终实现多视场的同步扫描。

近年来也有许多工作基于设计独特的光路来实现对光束偏转角和发散角的调控,比如自由空间角度啁啾增强延时技术(Free-space Angular-chirp-enhanced Delay)基于双静态准平行反射镜的独特结构,实现了自由空间内激光脉冲时空特性的协同调控[21]。该技术通过构建类无限反射镜的几何配置,将线聚焦脉冲激光束转换为具有时空复用特性的可重构多子光束阵列。另一种基于谐振腔相位调制的回响光学环路技术(Reverberation Optical Loop)通过构建腔内循环脉冲传输路径,实现了亚脉冲序列的轴向聚焦深度编码[22]。该技术利用谐振腔的循环相位调制机制,将入射激光脉冲转换为具有深度梯度分布的多焦点亚脉冲阵列。该方案可同步获取小鼠运动皮层及嗅球区神经元Ca^{2+}动态的四平面双光子荧光显微图像,并达到视频级成像帧频(30 Hz)。值得注意的是,系统特有的腔衰荡效应导致亚脉冲强度呈现指数衰减特性,该强度梯度分布与生物组织随深度增加的散射损耗形成动力学平衡机制,进一步保证了多个视场的均匀性。

波前直接调制是物镜后视场分离的另一实现途径。如图1(b)所示,通过空间光调制器调制光束波前,使光束形成多个光斑聚焦小鼠大脑上的不同位置,同时获得多个视场的叠加信息。结合对成像脑区的先验知识(通过预扫描获取神经元空间分布特征)对多个视场的叠加信息进行解码,得到多个视场的信息。Yang 等人使用这种方法分别对轴向相距 300 μm 的两个视场和横向相距 300 μm 的两个视场进行了同步成像[23]。这种方法依赖于神经活动的时空稀疏特性和先验结构信息,限制了其在临床研究的应用。

物镜后视场分离在原理上更偏向于在激发光进入物镜之前做好多束化与调控,然而,它的空间覆盖范围依然取决于物镜本身的视场大小。一旦研究目标需要横跨数毫米乃至更大距离,单纯扩大横向偏转就可能陷入视场边界的瓶颈。因此,研究人员常采用介观物镜等较低倍率的成像物镜,以使单个视场可扩展到毫米量级覆盖。然而,倍率降低必然会牺牲分辨率,系统最终只能维持在细胞级别,而不能精确到亚细胞结构。在物镜后视场分离的策略中,为了实现多场景大范围并行观测,就需在系统分辨率与视场尺寸之间进行权衡,这成为了一个重要的技术挑战。

与此相比,物镜前视场分离则将多束光经额外几何配置的方式,在物镜靠近样本的部分进行二次视场分离。通常的方法是在物镜焦平面附近或其下方设计微型聚焦物镜阵列、微型反射镜阵列或其他光学分离模块,将原本单一的视场通道分割成若干空间子通道,从而在样本上生成多个彼此独立的

焦点。具体实现策略如图1(c)所示,研究者可以在物镜前端直接集成微型聚焦物镜阵列,使激发光通过这些小型光学元件发生空间偏转与聚焦分离,从而形成多个彼此独立的焦点投射到样本上。Yang等人基于此思路,通过在物镜下方放置微物镜阵列,实现了可同时覆盖相距10 mm的两个视场,以及距离3.5 mm的三个视场的多区域同步成像[24]。在这一系统中,每个子视场都能分别获得清晰的荧光信号,并行观测多脑区间的神经活动,大大拓展了传统单视场成像所能及的空间范围。另一种方法则利用微型反射镜阵列来进一步细分光路。如图1(d)所示,Chi等人先通过二向色分束器将激发光分成两束,使其在进入物镜前的扫描光路中就已偏离原本的共轴位置,随后在物镜下方配置微型反射镜阵列,以精确地导引这两束光分别指向相隔约9 mm的小鼠脑区,从而实现了并行成像[25]。这种方法同样证明了物镜前视场分离在跨区域覆盖与灵活光路布局上的可行性。

物镜前视场分离能更加直接地将成像范围延展到跨毫米量级,尤其适合对小鼠或啮齿类大脑相距数毫米区域的同步观测。然而,这种方法也对物镜本身提出了更苛刻的要求。要在物镜下方放置一系列光学分离器件(例如微型反射镜阵列、微物镜阵列),物镜的工作距离通常需要达到5 mm甚至更高。常见的水浸物镜工作距离有限,且在物镜与样本之间封装光学器件还会干扰介质折射率分布,因此往往难以兼容,需要使用干式长工作距离物镜。Yu等人曾提出一种专门针对多光子成像波长优化设计的超长工作距离空气物镜,不仅能提供4 mm^2以上的视场范围,还能保持亚微米级的空间分辨率[26]。然而,随着微型光学组件布设的增多及其排布方式的复杂化,机械稳定性、噪声控制、光学畸变校正等都变得更具挑战。与此同时,整个多视场系统的成本与组装难度亦会相应上升。

多视场多光子成像技术还需要结合波长编码、空间分光和时间门控等方法分解不同视场图像。如图2(a)所示,波长编码通过预置不同荧光探针的光谱特征,利用二向分光镜阵列进行波长选择性分离,并借助多通道光电倍增管实现分光检测。Wu等人成功实现轴向间距80 μm的双平面同步探测,分别采集双光子荧光与三次谐波信号[27]。该技术的实施受制于两个关键因素:其一,荧光探针的光谱分离度需要足够大以避免通道串扰;其二,跨视场的生物标记物需具备异质性光谱特征。空间分

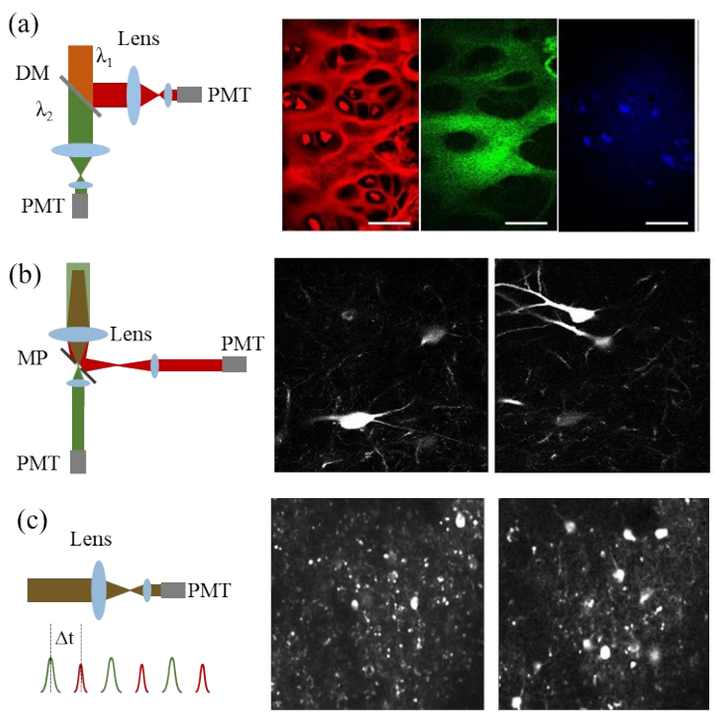

图2 视场同步检测的实现方式:(a) 波长编码[27];(b) 空间分光[28];(c)时间门控[22];DM,二向色镜;λ1、λ2,波长;PMT,光电倍增管;Lens,透镜;MP,针孔反射镜。

Fig. 2 Implementation approaches for synchronous field-of-view detection: (a) Wavelength encoding[27]; (b) Spatial demultiplexing[28]; (c) Time gating[22]; DM, dichroic mirror; λ1/λ2, wavelengths; PMT, photomultiplier tube; MP, micro-pinhole reflector.

光则利用视场之间的空间位置差异构建轴向隔离通道。如图2(b)所示,通过定制化的共焦针孔倾斜反射镜,实现空间信号的解耦。然而,该方法对光学装校的精度要求较高,并且由于受限于收集光路的空间布局,视场的扩展能力通常受到限制。Hu等人使用这种方法实现了最远相距51 μm双平面双光子成像[28]。时间门控依赖于时空复用技术,通过为不同视场的光引入不同的延迟,从时间维度上区分不同视场的信号。由于多光子成像技术采用的是飞秒脉冲激光器,荧光信号在时间维度上存在差异,因此可以通过时间窗来区分不同视场的信号,如图2(c)所示。常见的延迟引入方式是在物镜前将光束分离后,使不同光束引入不同的光程,从而在荧光信号产生时形成固定的时间延迟,便于区分[29]。该方法所能区分的最小视场延迟主要受荧光寿命与采集卡带宽与采样速度的限制。当前多光子神经成像中常用的 GCaMP 系列钙离子指示剂的荧光寿命约为 3 ns,而采集卡通常的采样率范围在 62.5 MHz 至 2.7 GHz,相应的视场时间分辨率大约处于 3 至 16 ns 之间。

多视场多光子成像技术通过物镜前后不同的视场分离方法以及多种同步检测手段,能够实现对复杂生物样品的高效、精准成像。物镜后视场分离依赖于双维度的光束调控,适用于广范围的视场覆盖,但在分辨率与视场范围之间存在权衡。物镜前视场分离则通过微型光学架构的集成,实现更为灵活的视场解耦,尽管对物镜的性能要求较高。同步检测方面,波长窗、空间窗和时间窗分离方法各有优势和适用场景,能够根据具体应用需求选择最优方案。在神经科学研究中,精准、高效的成像技术对于揭示脑功能与结构的复杂关系至关重要。多视场成像技术凭借其多角度、多区域同步成像的能力,为全脑成像、神经网络动态监测及大规模神经活动解析提供了强有力的工具。

2 多视场多光子成像在神经科学中的典型或者潜在应用

近年来,神经科学研究对于在大尺度空间范围内研究皮层跨脑区功能耦合方面需求愈发迫切。当不同功能区域之间存在较远的空间距离,又需要对它们的动态变化进行同步监测时,传统显微镜受视场范围所限,往往难以兼顾足够的时空分辨率和大跨度的成像范围。为克服这一局限,研究人员着力探索通过各种光学元件和新颖的光路设计,实现对广阔区域内多点同步成像的可行方案。多视场多光子成像技术通过实现跨毫米级脑区(如间距7 mm的皮层区域的细胞级空间分辨率同步记录,突破了传统单光子显微镜视场受限(<1 mm^2)和双光子显微镜跨区域观测困难的技术瓶颈[25][30][31]。典型应用如图3(a)所示,利用双视场双光子成像技术,研究人员在清醒固定的小鼠中,对两个相隔7毫米的远距离脑区实现了同步的钙成像。通过软件分析,分别提取了34个和33个活跃神经元,结果显示两区域神经元的钙信号存在显著的功能相关性[25]。这一结果证明,该系统可在长工作距离物镜的配合下,实现相距7 mm的双区域同步成像,这种空间跨度甚至能够达到物镜标称视场的四倍,大大拓展了双光子技术的应用前景。在神经科学研究中,借助该成像方案,可以同时采集皮层多个区域的神经活动数据,在多脑区神经活动同步监测中的技术优势,更通过跨区域神经信号耦合的量化表征,为解析复杂神经环路的跨区域功能耦合机制提供了重要的方法学突破。多视场多光子成像系统在神经环路功能解析和全脑尺度神经编码研究领域展现出重要应用价值。

在皮层脑区与深度脑区的协作研究方面,多视场多光子显微镜通过结合双光子和三光子成像技术,能够实现皮层脑区与深度脑区之间的协作研究[19][32]。如图3(b)所示,研究人员通过双光子与三光子协同激发,结合时空复用架构,实现了小鼠全皮层至海马体1.2 mm深度范围内超12,000个神经元的同步钙活动记录[19]。在听觉皮层—海马联合观测中,监测到了以θ振荡(4–12 Hz)为主导的跨脑区相位同步现象,所测得的相位锁定指数约为0.42±0.07;此结果为验证脑区间信息交互和网络层级通信理论提供了新证据。与此同时,结合对皮层全层的跨尺度成像,还能对空间记忆编码与跨模态信息整合等复杂进程展开多维度分析,为预测编码模型、记忆网络理论等计算神经学假设的验证带来全新的思路。结合双光子和三光子的多视场多光子显微技术为皮层和皮下脑区之前的功能耦合机制及行为相关神经编码研究提供了高时空分辨率、大跨层覆盖的新型观测范式,显著提升了全脑多尺度神经活动同步解析能力。

在神经活动传播路径的动态追踪方面,多视场多光子成像高速多视场成像能力显著提升了神经元动态追踪能力[33][34][35]。如图3(c)所示,研究人员

通过模块化高分辨双光子成像架构，解决了介观尺度研究中视场范围与扫描帧率之间的矛盾。在约5毫米的宽阔视场下，该系统可同时对四个相距数毫米的目标脑区进行视频速率的同步成像，并在保持单细胞分辨率的基础上，实现较高的成像通量[35]。通过高速摄像技术与希尔伯特变换分析，将触须节律性运动分解为相位、振幅及周期中点特征参数，以30 Hz钙成像速率追踪了位于初级躯体感觉皮层和运动皮层的四个成像区的神经元，每个区域追踪了150-200个神经元，验证了初级躯体感觉皮层神经元对运动相位的特异性锁定机制，以及运动皮层神经元对振幅与周期中点的动态编码特性[35]。研究结果表明，多视场多光子成像技术能在清醒行为范式、虚拟现实导航及多主体交互等实验模型中发挥巨大作用，也为计算神经科学、认知神经科学以及神经环路动力学等领域开辟了新的研究途径。随着超快基因编码探针的不断发展以及光纤激光技术成本的持续下降，其有望在未来广泛应用于多种跨脑区同步观测场景，为我们阐明大脑活动的宏观-微观关联机理提供更为强力的技术支持。

3 总结与展望

多视场多光子成像技术作为神经科学研究领域的重要技术革新，通过突破传统单视场成像的时空局限，极大地推动了神经科学研究的深入发展。这项技术能够同时观测多个脑区的神经活动，实现跨脑区神经环路的高效监测动态成像，克服了传统多光子成像方法在空间覆盖和时间分辨率上的限制。目前，多视场多光子成像技术已经在多个领域展示了巨大的应用价值。它不仅能够突破传统成像技术在空间覆盖范围和时间分辨率上的瓶颈，还能够通过并行成像技术有效地提高数据获取效率，推动了全脑功能网络的研究、神经活动传播路径的追踪研究。随着研究深入，该技术将成为研究跨脑区功能耦合、解析大脑复杂神经环路结构及动态过程的重要工具。

随着多视场多光子成像技术的完善，其在神经科学领域的应用会覆盖更广的研究尺度与更深的组织层次。针对神经环路跨脑区、多层级的复杂性，和对高时空分辨率操控与观测以及神经疾病检测的需求，多光子成像技术与内窥成像、自适应光学、光刺激以及深度学习算法等技术深度融合，在神经退行性疾病诊疗和脑机接口等领域展现出独特的应用前景与技术优势。

当前，多视场多光子成像技术可实现约1.5 mm的有效成像深度，但针对海马、丘脑、基底神经节等深层脑区的精细研究仍面临较大挑战。将多视场多光子成像与内窥成像相结合，可显著提升对深层脑区的观测与解析能力，为跨脑区、多层级的神经环路研究提供了更强大的技术支撑[36]。使用

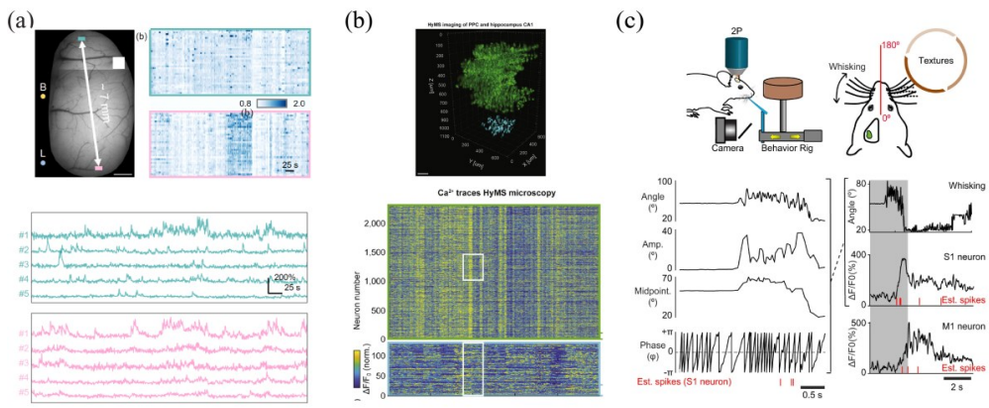

图3 多视场成像在神经科学中的应用：(a) 上左子图颅骨开窗下小鼠大脑皮层的广角图像，上右子图为神经元活动ΔF/F信号提取结果；下子图分别为为区域B和区域L选定神经元的钙信号轨迹[25]。(b) 上子图后顶叶皮层及下方海马CA1区10分钟成像的三维渲染图；下子图为活跃神经元的钙离子轨迹[19]。(c) 上子图为触须纹理辨别任务中四视场成像系统原理示意图；下子图展示示例S1和M1神经元的原始钙信号和去卷积钙信号与触须摆动周期相位的对齐情况[35]。

Fig. 3 Applications of multi-FOV imaging in neuroscience: (a) Top-left panel: Wide-field image of the mouse cerebral cortex under a cranial window. Top-right panel: Extracted neuronal activity (ΔF/F). Bottom panels: Calcium traces of selected neurons in Region B and Region L[25]. (b) Top panel: 3D-rendered view of 10-minute imaging in the posterior parietal cortex and hippocampal CA1 region. Bottom panel: Calcium traces of active neurons[19]. (c) Top panel: Schematic of four-field-of-view imaging system during a whisker-based texture discrimination task. Bottom panel: Raw and deconvolved calcium signals of example S1 and M1 neurons aligned to phases of the whisking cycle[35].

微型 GRIN 透镜可将成像光学通道直接导入深部脑区,通过缩短光在上层脑组织中的传播距离,从而有效降低散射与衰减对成像质量的影响。在多视场多光子技术高分辨率与高灵敏度的加持下,原本埋藏于深部的关键核团也能被纳入统一实验范式的观测范围。借助同时监测皮层与深层亚核结构的神经元放电与网络活动,研究者可进一步探索此前难以触及的跨脑区联结机制,从而为深入理解高级认知功能与运动控制等复杂生理过程提供更为完整的图景。

随着成像深度的增加,生物组织的异质性和深部散射对多光子成像的分辨率和信噪比构成了重大挑战。自适应光学技术通过在激发光路和信号检测路径中实时采集和补偿像差,显著提升了深部脑区成像的清晰度及准确度[37]。当多视场多光子成像技术用于皮层到海马等深层脑核团时,自适应光学能有效减少散射与畸变对图像质量的损害,使跨脑区同步成像在更深的层面上获得高保真的信号。对于研究皮层-皮层与皮层-深层核团的双向功能联系而言,该组合技术尤为关键:既能保障跨区域观测的视野与分辨率,又能在深层保持相对稳定的成像信噪比,为研究各种跨层级神经环路的生理或病理机制提供了强大支持。

多视场多光子成像能够在多个区域实现高时空分辨率的同步成像,与光刺激对神经元群的精准调控能力结合后,对解析特定脑区活动如何精确诱导下游区域响应有重要意义[38]。在神经科学研究中,通过使用特定光敏感蛋白来激活或抑制神经元,可在毫秒级时间尺度上解析神经环路的因果连接关系。将多视场多光子成像的跨脑区同步观测功能融入光遗传学,可在自由或受控行为情境下,对多个功能模块的神经元活动进行实时干预与检测,从而揭示跨脑区信息流动的时序特征。尤其在研究高级认知功能与复杂行为的神经机制时,这种光刺激与成像结合的方式能够更直观地展示神经模块间的动态联系,为后续制定干预或治疗策略提供更精准的依据。

在后续的数据处理方面,多视场多光子成像可产生海量、高维度的神经数据,传统的手动或半自动处理方式往往在精度与效率方面难以兼顾。深度学习技术在图像分割、配准、运动校正及特征提取等方面均展现出强大的效率与准确度[39][40]。将深度学习与多视场成像的同步记录能力相结合,可在更大空间范围内实现神经元活动的自动化检测、追踪和统计分析。一方面,深度学习算法可依据多模态信息相互印证并动态校正,提高跨脑区数据配准的稳定性;另一方面,神经网络模型可直接从高维数据中挖掘潜在的功能网络结构及动力学过程,为解析复杂脑功能或病理状态下的跨区耦合机制提供快速、准确的分析手段。伴随算力与算法的不断升级,这种与成像技术的深度融合模式将在精准研究大规模神经环路的时空演化上发挥更大的潜能。

在技术手段日益成熟的当下,多视场多光子成像正加速迈向神经退行性疾病诊断与脑机接口等实际应用的更广阔舞台。阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病往往伴随跨脑区功能连通性与神经环路结构的异常[41][42][43]。多视场多光子成像同时覆盖大范围脑区的优势,使其能够在疾病模型的早期阶段识别并追踪异常信号传递或蛋白沉积等病理特征的出现与扩散过程。通过结合实时功能连接分析,可发现潜在的病理通路或关键环节,从而为早期诊断、分期干预及靶向治疗提供依据。此外,利用深度成像的高分辨特点,可比较精细地观测胶质细胞、血管网络与神经元之间的交互,为理解神经退行性疾病的复杂微环境机制开辟了新思路。脑机接口(BCI)需要快速、准确地获取并解码大规模神经元群体的动态活动,以实现对运动意图或认知过程的实时识别与反馈[44][45][46]。相比于传统的单视场成像,多视场多光子成像在更大范围内同步采集不同脑区的神经信号,可输出更加丰富而完整的脑区间信息流。这不仅提升了BCI解码算法的速度与准确度,也为开展闭环神经调控提供了更多的可能性。通过识别跨脑区协同激活模式,可为复杂行为的实时调节或高级认知功能的在线解读提供数据支持,进而推动基于BCI的医疗康复手段和人机交互系统向更高水平演进。

多视场多光子成像以其大范围同步观测、深层高分辨穿透和高时空精度的优势,在神经科学领域与多种先进技术深度融合,已逐渐形成了高效且多功能化的整体研究范式。随着与内窥成像、自适应光学、光刺激和深度学习等领域的交互发展,多光子成像技术将为全面解析神经环路和理解脑功能网络提供更广阔的平台与突破口,为神经退行性疾病诊疗和脑机接口的进一步革新奠定坚实的科研基础。

多视场多光子成像技术作为神经科学领域的创新性技术，通过其独特的高时空分辨率（亚细胞级空间分辨率与毫秒级时间分辨率）和并行多视场成像能力，正在深刻改变我们对神经环路功能架构和神经疾病病理机制的认识。未来，随着技术进步和多学科融合，多视场成像技术将在神经科学领域发挥越来越重要的作用，为未来神经科学研究提供不可替代的研究工具。

参考文献

[1] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. Nature biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.

[2] Luu P, Fraser S E, Schneider F. More than double the fun with two-photon excitation microscopy [J]. Communications biology, 2024, 7(1): 364.

[3] Zhao C, Chen S, Zhang L, et al. Miniature three-photon microscopy maximized for scattered fluorescence collection [J]. Nature Methods, 2023, 20(4): 617-622.

[4] Mo C, McKinnon C, Murray Sherman S. A transthalamic pathway crucial for perception[J]. Nature communications, 2024, 15(1): 6300.

[5] Xu C, Nedergaard M, Fowell D J, et al. Multiphoton fluorescence microscopy for in vivo imaging[J]. Cell, 2024, 187(17): 4458-4487.

[6] Cornejo V H, Ofer N, Yuste R. Voltage compartmentalization in dendritic spines in vivo [J]. Science, 2022, 375 (6576): 82-86.

[7] Streich L, Boffi J C, Wang L, et al. High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy[J]. Nature methods, 2021, 18(10): 1253-1258.

[8] Han X, Bonin V. Higher-order cortical and thalamic pathways shape visual processing streams in the mouse cortex [J]. Current Biology, 2024, 34(24): 5671-5684. e6.

[9] Sato M, Nakai N, Fujima S, et al. Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder[J]. Molecular Psychiatry, 2023, 28(8): 3194-3206.

[10] Ruikes T R, Fiorilli J, Lim J, et al. Theta Phase Entrainment of Single-Cell Spiking in Rat Somatosensory Barrel Cortex and Secondary Visual Cortex Is Enhanced during Multisensory Discrimination Behavior [J]. eneuro, 2024, 11(4).

[11] Guan L, Yu H, Chen Y, et al. Subthalamic γ oscillation underlying rapid eye movement sleep abnormality in parkinsonian patients [J]. Movement Disorders, 2025, 40 (3): 456-467.

[12] Lee C H, Juan C H, Chen H H, et al. Long-Range Temporal Correlations in Electroencephalography for Parkinson's Disease Progression [J]. Movement Disorders, 2025, 40(2): 266-275.

[13] Steinmetz N A, Aydin C, Lebedeva A, et al. Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings [J]. Science, 2021, 372 (6539): eabf4588.

[14] Nietz A K, Popa L S, Streng M L, et al. Wide-field calcium imaging of neuronal network dynamics in vivo[J]. Biology, 2022, 11(11): 1601.

[15] Logothetis N K. What we can do and what we cannot do with fMRI[J]. Nature, 2008, 453(7197): 869-878.

[16] Akbari N, Tatarsky R L, Kolkman K E, et al. Whole-brain optical access in a small adult vertebrate with two- and three-photon microscopy [J]. Iscience, 2022, 25(10).

[17] Luu P, Fraser S E, Schneider F. More than double the fun with two-photon excitation microscopy [J]. Communications biology, 2024, 7(1): 364.

[18] Telliez C, Sims R, Faini G, et al. Multiphoton Neurophotonics: Recent Advances in Imaging and Manipulating Neuronal Circuits[J]. ACS Photonics, 2025.

[19] Weisenburger S, Tejera F, Demas J, et al. Volumetric Ca2+ imaging in the mouse brain using hybrid multiplexed sculpted light microscopy[J]. Cell, 2019, 177(4): 1050-1066. e14.

[20] Takasaki K T, Tsyboulski D, Waters J. Dual-plane 3-photon microscopy with remote focusing [J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(11): 5585-5599.

[21] Wu J, Liang Y, Chen S, et al. Kilohertz two-photon fluorescence microscopy imaging of neural activity in vivo[J]. Nature methods, 2020, 17(3): 287-290.

[22] Beaulieu D R, Davison I G, Kılıç K, et al. Simultaneous multiplane imaging with reverberation two-photon microscopy[J]. Nature methods, 2020, 17(3): 283-286.

[23] Yang W, Miller J K, Carrillo-Reid L, et al. Simultaneous multi-plane imaging of neural circuits[J]. Neuron, 2016, 89(2): 269-284.

[24] Yang M, Zhou Z, Zhang J, et al. MATRIEX imaging: multiarea two-photon real-time in vivo explorer [J]. Light: Science & Applications, 2019, 8(1): 109.

[25] Liu C, Jin C, Deng J, et al. Simultaneous dual-region two-photon imaging of biological dynamics spanning over 9 mm in vivo [J]. Photonics Research, 2024, 12 (3): 456-464.

[26] Yu C H, Yu Y, Adsit L M, et al. The Cousa objective: a long-working distance air objective for multiphoton imaging in vivo[J]. Nature Methods, 2024, 21(1): 132-141.

[27] Wu W, Brandt C, Zhou X, et al. Label-free multimodal imaging with simultaneous two-photon and three-photon microscopy and kernel-based nonlinear scaling denoising [J]. Biomedical Optics Express, 2023, 15(1): 114-130.

[28] Hu Q, Li P, Xiong Y, et al. Simultaneous two-plane, two-photon imaging based on spatial multiplexing[J]. Optics letters, 2018, 43(19): 4598-4601.

[29] 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 [J]. Nature biotechnology, 2016, 34(8): 857-862.

[30] Lecoq J, Savall J, Vučinić D, et al. Visualizing mammalian brain area interactions by dual-axis two-photon calcium imaging [J]. Nature neuroscience, 2014, 17 (12): 1825-1829.

[31] Yu C H, Stirman J N, Yu Y, et al. Diesel2p mesoscope with dual independent scan engines for flexible capture of dynamics in distributed neural circuitry [J]. Nature communications, 2021, 12(1): 6639.

[32] Mok A T, Wang T, Zhao S, et al. A large field-of-view, single-cell-resolution two-and three-photon microscope for deep and wide imaging[J]. eLight, 2024, 4(1): 20.
[33] Onda M, Takeuchi R F, Isobe K, et al. Temporally multiplexed dual-plane imaging of neural activity with four-dimensional precision [J]. Neuroscience Research, 2021, 171: 9-18.
[34] Wagner M J, Kim T H, Kadmon J, et al. Shared cortex-cerebellum dynamics in the execution and learning of a motor task[J]. Cell, 2019, 177(3): 669-682. e24.
[35] Clough M, Chen I A, Park S W, et al. Flexible simultaneous mesoscale two-photon imaging of neural activity at high speeds[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6638.
[36] Xue F, Li F, Zhang K, et al. Multi-region calcium imaging in freely behaving mice with ultra-compact head-mounted fluorescence microscopes [J]. National Science Review, 2024, 11(1): nwad294.
[37] Rodríguez C, Chen A, Rivera J A, et al. An adaptive optics module for deep tissue multiphoton imaging in vivo [J]. Nature methods, 2021, 18(10): 1259-1264.
[38] Adesnik H, Abdeladim L. Probing neural codes with two-photon holographic optogenetics[J]. Nature neuroscience, 2021, 24(10): 1356-1366.
[39] Guo M, Li Y, Su Y, et al. Rapid image deconvolution and multiview fusion for optical microscopy [J]. Nature biotechnology, 2020, 38(11): 1337-1346.
[40] Pnevmatikakis E A, Soudry D, Gao Y, et al. Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data[J]. Neuron, 2016, 89(2): 285-299.
[41] Korte N, Barkaway A, Wells J, et al. Inhibiting Ca2+ channels in Alzheimer's disease model mice relaxes pericytes, improves cerebral blood flow and reduces immune cell stalling and hypoxia[J]. Nature Neuroscience, 2024, 27(11): 2086-2100.
[42] Stamenkovic S, Li Y, Waters J, et al. Deep imaging to dissect microvascular contributions to white matter degeneration in rodent models of dementia[J]. Stroke, 2023, 54(5): 1403-1415.
[43] Zhu W M, Neuhaus A, Beard D J, et al. Neurovascular coupling mechanisms in health and neurovascular uncoupling in Alzheimer's disease[J]. Brain, 2022, 145(7): 2276-2292.
[44] Saito Y, Osako Y, Murayama M. Unraveling the Neural Code: Analysis of Large-Scale Two-Photon Microscopy Data[J]. Microscopy, 2025: dfaf010.
[45] Hira R. Closed-loop experiments and brain machine interfaces with multiphoton microscopy [J]. Neurophotonics, 2024, 11(3): 033405-033405.
[46] Park S, Lipton M, Dadarlat M C. Decoding multi-limb movements from two-photon calcium imaging of neuronal activity using deep learning[J]. Journal of neural engineering, 2024, 21(6): 066006.