

二次谐波显微术研究

郝淑娟 何巍巍 张思源 徐 栩 曹丰慧 谭淑梅 王玉玲
大庆师范学院机电工程学院 黑龙江大庆 163000

摘要: 二次谐波显微成像技术是一种新型的非线性光学成像方法, 在生物科学、医学、新型材料科学等领域都有十分广泛的应用。本文介绍了光学二次谐波显微术的理论建模基础和其技术发展应用。

关键词: 二次谐波; 显微成像; 应用

二次谐波信号在不具有反演对称中心且具有较大二阶极化率的非线性介质中产生。同时, 二次谐波产生是一个相干的过程, 受到位相匹配条件的制约。介质中不同分子辐射之间的位相关系不仅受到激发光场的空间分布、偏振特性等因素的影响, 还与样品的分子的位置、排列方式以及取向等有密切关系, 这些使得受激产生的二次谐波信号的强度、角度分布以及偏振等特性呈现出高度结构化的特征。可以通过仔细分析二次谐波信号的特性获得样品的局部微观结构等很多有用信息, 因此, 二次谐波显微术成为人们研究的热点, 在生物科学、医学、材料科学等不同领域有着巨大的研究价值和广泛的应用。通过对二次谐波显微术的机理进行研究, 建立起合适的理论分析模型, 揭示不同条件下二次谐波信号强度、角度分布以及偏振等特性的变化规律, 可为二次谐波显微术的信号解释和分析提供有力的理论依据, 并对实际应用进行正确地指导。

一、二次谐波显微术理论基础

1. 辐射场的平面波角谱法表示

平面波角谱法是描述均匀介质中光场分布的一种数学方法, 该方法得到的光场的平面波角谱表达式实际上是平面波和瞬逝波的叠加。但如果观测位置满足远场条件, 则通常可以忽略瞬逝波贡献。每一个偶极子向外产生辐射场, 在各向同性均匀的介质中, 位于 r_0 的电偶极子在 r 处产生的辐射场 $E(r)$ 可以表示为^[1]:

$$E(r) = -\frac{ik}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{\hat{E}(s_x, s_y)}{s_z} \exp[-ik(s_x x + s_y y + s_z z)] ds_x ds_y \quad (1)$$

基金项目: 大庆市指导性科技计划项目(项目编号: zd-2021-11)

作者简介: 郝淑娟(1984—), 女, 汉族, 黑龙江大庆人, 大庆师范学院讲师, 硕士, 研究方向主要为非线性光学等。

其中 p 是电偶极子极化强度, s 是沿 k 方向的单位矢量, s_x, s_y, s_z 为其直角坐标系下的各分量。当满足远场辐射条件时, 有

$$\hat{E} = -\frac{1}{4\pi} \exp(-iks \cdot r_0) s \times s \times p \quad (2)$$

利用矩阵对矢量进行运算后, 则公式(2)变为:

$$\begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} = \frac{1}{4\pi} \exp(-iks \cdot r_0) \times \begin{bmatrix} 1 - \sin^2 \theta \cos^2 \varphi & -\sin^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi & -\sin \theta \cos \theta \cos \varphi \\ -\sin^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi & 1 - \sin^2 \theta \sin^2 \varphi & -\sin \theta \cos \theta \sin \varphi \\ -\sin \theta \cos \theta \cos \varphi & -\sin \theta \cos \theta \sin \varphi & \sin^2 \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} \quad (3)$$

受激产生的非线性极化场可以看成是偶极子阵列, 通过每个偶极子的辐射场的相干叠加可以得到总的二次谐波信号场, 即需要对源所在体积进行积分, 则为:

$$\hat{E} = -\frac{1}{4\pi} \int_V \exp(-iks \cdot r_0) s \times s \times p(r_0) d^3 r_0 \quad (4)$$

将公式(4)代入公式(1)就可得到偶极子阵列产生的辐射场的平面波角谱法表达式。

2. 基于Wolf衍射理论的焦点区域聚焦光场分布

假设一束偏振方向沿 x 轴的线偏振光入射到一无像差物镜上, 在像空间的光场分布可表示为Wolf衍射积分^[2]:

$$e(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi} \iint_{\Omega} \frac{a(s_x, s_y)}{s_z} \exp[ik(\Phi(s_x, s_y) + s_x x + s_y y + s_z z)] ds_x ds_y \quad (5)$$

其中 s_x, s_y, s_z 为空间光线传播方向的单位矢量 s 的各个分量, $\Phi(s_x, s_y)$ 为像差函数, a 为在出瞳处无扰动光场的强度矢量。当像差函数为零时, 以几何焦点为原点建立直角坐标系, 利用光线追迹和矢量分解等方法, 根据公式(5)可以得到焦点附近光场为:

$$\begin{aligned}
 e_x &= -\frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{1/2} \theta \sin \theta [\cos \theta + (1 - \cos \theta) \sin^2 \varphi] e^{ikr_p \cos \zeta} d\theta d\varphi \\
 e_y &= \frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{1/2} \theta \sin \theta (1 - \cos \theta) \cos \varphi \sin \varphi e^{ikr_p \cos \zeta} d\theta d\varphi \\
 e_z &= \frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{1/2} \theta \sin^2 \theta \cos \varphi e^{ikr_p \cos \zeta} d\theta d\varphi
 \end{aligned} \tag{6}$$

其中 $r_p \cos \zeta = s_x x + s_y y + s_z z$ ，聚焦物镜的半孔径角表示为 α ，相对于 x 轴的方位角表示为 Φ ，相对于 z 轴的极角表示为 θ 。将公式 (6) 转换为一重积分，可得焦点区域聚焦光场分布为：

$$\begin{aligned}
 e_x &= -iA[I_0 + I_2 \cos(2\varphi_p)] \\
 e_y &= -iA I_2 \sin(2\varphi_p) \\
 e_z &= -2A I_1 \cos(\varphi_p)
 \end{aligned} \tag{7}$$

其中 I_n 的表达式为：

$$\begin{aligned}
 I_0 &= \int_0^\alpha \cos^{1/2} \theta \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0 \left[\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha} \right] \exp \left[\frac{i u \cos \theta}{\sin^2 \alpha} \right] d\theta \\
 I_1 &= \int_0^\alpha \cos^{1/2} \theta \sin^2 \theta J_1 \left[\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha} \right] \exp \left[\frac{i u \cos \theta}{\sin^2 \alpha} \right] d\theta \\
 I_2 &= \int_0^\alpha \cos^{1/2} \theta \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2 \left[\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha} \right] \exp \left[\frac{i u \cos \theta}{\sin^2 \alpha} \right] d\theta
 \end{aligned} \tag{8}$$

平面波角谱法和 Wolf 衍射积分是二次谐波显微术的理论基础，为其理论推导和模型建立提供了理论依据。

二、二次谐波显微术的应用

二次谐波显微术具有独特的成像优势：具有较高的三维空间分辨率，可以对具有一定厚度的样品进行层析成像；对生物样品的光损伤和光漂白作用较小；不需要进行荧光标记，没有光化学毒性及染色过程中的物理损伤；可以通过分析信号的角度分布或偏振特性得到反映样品的分子取向、排列方式等局部微观结构。这些不同于其他显微成像技术的优点，使二次谐波显微术在不同领域得到广泛应用。

1. 生物科学领域

生物结构蛋白可以组装成大面积有序的且非中心对称的结构，这些结构高度极化，可以产生二次谐波信号。同等激发条件下，胶原蛋白、微管蛋白、肌动球蛋白复合等不同类型的结构蛋白，具有不同的二次谐波信号强度。Shi-Wei Chu 等人曾用此技术观察到了斑马鱼体内细胞分芽繁殖、原肠胚的形成、组织的形成等晶胚发育过程^[3]。因此，二次谐波显微成像技术可以用于生物组织的结构蛋白成像，除此之外，还可以用于细胞的成像示踪。Sugiyama N 等人利用钛酸钡探针追踪了小鼠造血干细胞的遗传谱系^[4]。Ramos-Gomes F 等人用 $BaFeO_3$ 探

针进行了支气管炎小鼠体内免疫细胞-巨噬细胞的追踪^[5]。二次谐波成像可以用于膜电压电测量，实现膜之间分离距离的测量。Andrew 等人用苯乙基染料产生二次谐波信号，研究发现其对膜电压的敏感度达到 40/100mV。由于分子分布的对称性影响二次谐波信号，因此可以实时观察膜上分子的动力学变化规律，研究生命个体对小分子吸收、渗透和积累的动力学过程。因此二次谐波显微技术在膜成像和动态测量中有重要的应用^[6]。另外，二次谐波显微成像可以对基因组 DNA 溶液、细胞核提取物、培养细胞的细胞核等不同 DNA 样品进行检测，获取 DNA 样品的二次谐波信号并进行高解析度成像^[7]。

2. 医学研究领域

二次谐波显微术可以实现活体组织成像，既可以实现正常组织成像，也可以区分异常组织的疾病状态，因此在肿瘤、皮肤科、眼科等研究方向都有广泛的应用。二次谐波显微术可用于癌症的早期诊断，通过探测子宫颈、口腔、食道、耳朵、鼻子等处的粘膜组织的病变，为肿瘤的诊断和分析提供了新方法手段。人体皮肤受伤后会形成瘢痕，而正常瘢痕和异常瘢痕的胶原形态结构差异巨大，可以通过二次谐波显微成像来区分判断异常瘢痕，为皮肤科的诊断和分析了提供一份很好的参考。二次谐波显微术可以用于眼部形态研究，为眼科疾病诊断提供有效方法。胶原蛋白是角膜的主要成分，因此角膜可产生较好的二次谐波信号。圆锥角膜与健康角膜在形态上存在差异，通过二次谐波显微术可以测量角膜基质前部的胶原蛋白薄片的倾斜度，从倾斜度的不同而区分圆锥角膜与健康角膜^[8]。因此，二次谐波显微术有利于对圆锥角膜疾病进行病情诊断及术后监测。另外，二次谐波显微术可以直观评估角膜基质、眼部的小梁网、巩膜、视乳头、神经节细胞轴突中的微管等结构，可以进行角膜屈光手术的术后监测，可以评估角膜微生物感染，可以用于体内诊断网格状角膜营养不良等角膜疾病，可以更好的了解角膜的生理病理学，可以监测高度近视眼的治疗效果，可以发现青光眼早期病变等^[9]。另外，通过二次谐波显微成像可以实现药物通透性的活体监控。

3. 材料科学领域

二次谐波显微术对偏振方向非常敏感，可以探测单个纳米晶体的取向，从而判断纳米晶体的类型。Yin X. B. 等人通过二次谐波显微成像技术清晰的显示单层 MoS_2 的晶界，并通过进一步分析偏振特性得到晶体取向^[10]。另外，二次谐波显微术还可以分析材料的极化特性，通过偏振分析和离焦成像的方法获得单个 KTP 纳米粒子的三维取向信息和晶轴的欧拉角^[11]。非中心对称材料的二

次谐波效应相对明显,因此,二次谐波显微术还可以研究材料的对称性,揭示晶格的旋转对称性,在二维材料中成为研究热点。郭雅文等人对生长在 SrTiO_3 衬底上的 BaTiO_3 薄膜样品进行了二次谐波产生测试,通过实验验证了 BaTiO_3 薄膜的对称性破缺,并研究了不同入射光功率下样品的二次谐波信号,表明 BaTiO_3 具有面内二重旋转对称性,最后提出了一种简单有效的方法分析二次谐波信号来源的单一性以及进行二次谐波实验时衬底对二次谐波信号强度的影响^[12]。通过探测二维过渡金属硫化物的二次谐波信号,可以区分其层数。偶数层晶体结构具有反演对称中心,无法探测到二次谐波信号,而奇数层晶体结构则可以产生二次谐波信号,并且不同层数对应不同的二次谐波信号。除此之外,二次谐波显微术还可以研究材料的铁电性和铁磁性,测试晶体的相变温度,进行材料诊断等。

参考文献:

- [1] Enderlein J. Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture. *Opt. Lett.*, 2000, 25(9): 634–637.
- [2] Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A*, 1959, 253(1274): 349–357.
- [3] Chu Shi wei, Chen Szu Yu, Tsung Han Tsai, 等. 非侵入性的多次谐波显微法用于活体发育生物学研究. *光学快报*, 2003(英文版).
- [4] Sugiyama N, So nay A Y, T ussiwand R, et al.

Effective labeling of primary somatic stem cells with BaTiO_3 nanocrystals for second harmonic generation imaging [J]. *Small*, 2018, 14(8): 1870036.

[5] Ramos-Gomes F, Mobius W, Bonacina L, et al. Bismuth ferrite second harmonic nanoparticles for pulmonary macrophage tracking[J]. *Small*, 2019, 15(4): 1803776.

[6] 庄正飞. 二次谐波显微成像及其在前列腺组织中的应用[D]. 华南师范大学, 2007.

[7] 罗冬梅, 邓小元, 卓双木, 谭淑雯, 庄正飞, 金鹰. 肿瘤细胞DNA样品基于二次谐波发生的非线性光谱学成像[J]. *光谱学与光谱分析*, 2012.

[8] Mercatelli R, Ratto F, Rossi F, et al. Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(1):75–83.

[9] 何欢欢, 高蓉蓉, 王勤美, 黄锦海. 二次谐波成像原理及在眼科中的研究进展[J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2021, 23(6): 471–475.

[10] Yin X. B., Ye Z. L., Chenet D. A., et al. Edge Nonlinear Optics on a MoS_2 Atomic Monolayer. *Science*, 2014, 344(6183): 488–490.

[11] 王琳瑞. 二次谐波显微术的尺寸特性和取向探测研究[D]. 南开大学, 2010.

[12] 郭雅文, 李源, 马宗伟. 基于二次谐波产生技术的 BaTiO_3 薄膜对称性研究[J]. *光学学报*, 2021, 41(6) 0619001.