·技术进展·

光片荧光显微镜技术与应用

陈思旭[1,2] 何益[1,2] 吴元卓[1,2] 杨建文[1,2] 胡津源[1,2] 吴苏健[1,2] 张欣[1,2*]

［1.中国科学技术大学生物医学工程学院（苏州），生命科学与医学部，合肥 230026；
2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所，江苏省医用光学重点实验室，苏州 215163］

【摘要】 作为一种广泛应用于生物在体成像的实用工具，光片荧光显微镜（light sheet fluorescence microscopy, LSFM）因其成像速度快、分辨率高、光毒性及光漂白小的特点而深受生物学家青睐。本文介绍了LSFM的工作原理，计算了LSFM的成像分辨率，为物镜、相机选型提供参考；回顾了LSFM的发展历史，对目前已有的LSFM进行分类，介绍了基于高斯光束、无衍射光束的LSFM与视场扩展方法，并介绍了针对生物样品特性改进的扫描共焦平面激发（swept confocally-aligned planar excitation, SCAPE）显微镜与开顶式光片（open-top light-sheet, OTLS）显微镜；对使用LSFM在病理分析、神经科学、胚胎发育等生物研究方面取得的进展进行简单总结，展示了LSFM在肿瘤病理评估、人脑可视化分析、模式生物的神经系统与胚胎发育研究等方面的优势；最后对LSFM的发展方向与应用潜力进行了展望，其与人工智能、图像处理、光遗传等技术结合可能带来更叹为观止的科学发现。

【关键词】 光片荧光显微镜；工作原理；发展历史；病理分析；生物研究

【中图分类号】 TH74 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.11876/mimt202504001

Technology and applications of light sheet fluorescence microscopy

Chen Sixu[1,2], *He Yi*[1,2], *Wu Yuanzhuo*[1,2], *Yang Jianwen*[1,2], *Hu Jinyuan*[1,2], *Wu Sujian*[1,2], *Zhang Xin*[1,2*]

［*1. Division of Life Sciences and Medicine, School of Biomedical Engineering (Suzhou), University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 2. Jiangsu Province Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Science, Suzhou 215163, China*］

【Abstract】 As a widely utilized tool in the field of biological in vivo imaging, light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) has become a mainstream tool among biologists due to its rapid imaging speed, high resolution, low phototoxicity, and reduced photobleaching effects. This paper introduces the operational principles of LSFM while calculating its imaging resolution to guide the selection of objective lenses and cameras. It reviews the developmental history of LSFM and classifies existing LSFM systems, particularly detailing implementations based on Gaussian beams and diffraction-free beams, along with field-of-view expansion methodologies. Specialized variants optimized for biological specimens including swept confocally aligned planar excitation (SCAPE) microscopy and open-top light-sheet (OTLS) microscopy are systematically introduced. The review further summarizes recent advancements enabled by LSFM in biological research domains such as pathological analysis, neuroscience, and embryonic development, demonstrating its exceptional capabilities in tumor pathology assessment, human brain visualization, and developmental studies of model organisms' nervous systems and embryogenesis. Finally, potential future directions for LSFM development are envisioned, highlighting that integration with artificial intelligence, advanced image processing, and optogenetic

基金项目：江苏省自然科学基金杰出青年基金项目（BK20240024）；中国科学院青年创新促进会优秀会员（Y2023087）；国家自然科学基金面上项目（62075235）；国家重点研发计划项目（2021YFF0700700）；中国科学院战略性先导科技专项（XDB1020000）

第一作者：陈思旭，男，在读博士研究生，研究方向：光学仪器

通信作者：张欣，女，博士研究生，副研究员，研究方向：光学显微成像

techniques may yield groundbreaking scientific discoveries.

【Key words】 Light sheet fluorescence microscopy; Operational principle; Development history; Pathological analysis; Biological research

在生命科学领域，对生物进行不同尺度或层次的研究，都离不开对其结构基础与变化过程进行观测，常见的方法包括光学显微成像、光声成像、核磁共振成像、电镜成像与电生理测量等。其中，光学显微成像具有高通量、亚细胞水平分辨率和非侵入式等特点，十分适合对活体生物进行微观研究。

相较于传统明场显微镜，荧光显微镜通过荧光染料或荧光蛋白标记特定的细胞或分子，使用照明光激发标志物，由探测系统收集荧光后实现成像，具有更高的成像分辨率及更优异的成像特异性。荧光显微镜的发展主要历经了以下 3 个阶段：①宽场荧光显微镜[1]使用特定光源通过临界照明或柯勒照明的方式对样本区域进行均匀激发，通过二向色镜与滤光片的组合实现对非样品发射荧光的滤除，由面阵探测器收集后实现高通量快速成像，但全视场连续照明的方式增加了光毒性与光漂白风险，照明区域覆盖整个样本也导致非焦面区域产生大量的背景荧光，极大地影响了成像对比度与对亚细胞结构的解析[2-4]；②共聚焦荧光显微镜[5]通过激光扫描点照明与共轭针孔滤波等技术[6-8]，利用点光源扫描样本激发荧光，并通过在探测器前放置共轭焦点针孔滤除非焦平面杂散光[9]，实现高分辨率光学层析成像[10]，但持续的高功率激光扫描增加了光损伤与光漂白，点扫描也导致成像速度较慢[11-13]；③光片荧光显微镜（light sheet fluorescence microscopy, LSFM）[14]通过薄层片状光选择性激发样本焦平面的荧光，有效减少了非观察层面样本的光损伤与光漂白，抑制了非焦面样本荧光的产生，同时使用与照明光路垂直的面探测器收集焦平面荧光信号，控制光片与探测端焦平面沿探测轴遍历样品，可以实现样品三维成像，是一种低光毒性、低光漂白、大视场、高分辨率、适用于活体样本的长时间三维成像技术[15-17]。本文综述 LSFM 的技术进展，并介绍其在病理分析、神经科学、胚胎发育等方面的应用现状，旨在为研究人员提供较为全面的参考信息，促进 LSFM 在生命科学领域的推广与发展。

1 工作原理

1.1 荧光产生原理

光片荧光成像技术的物理学基础是荧光发光，当荧光物质被特定外界能量如激光等高能射线激发，引起其电子轨道向高能轨道跃迁，并在释放能量回归基态的过程中产生可被检测的荧光信号。

在 LSFM 中，通常有单光子激发（单光子吸收）和双光子激发（多光子吸收）两种照明方式，如图 1 所示。单光子荧光激发是荧光分子通过吸收单个高能量光子，使电子从基态跃迁到激发态，随后电子通过振动弛豫损失部分能量，最终发射出较长波长的荧光光子。发射荧光强度与激发光强度呈线性关系，因此仅需较低的能量就可以激发荧光。但由于激发波长通常为短波长，因此在生物体样本内穿透深度较浅。双光子荧光激发是荧光分子同时吸收两个低能量光子，其能量总和等于激发能级差。这两个光子需在飞秒量级时间内被吸收，才能叠加能量完成跃迁。由于吸收概率与激发光强度的平方成正比，通常使用飞秒脉冲激光实现极高的瞬时功率。由于激发光波长较长，通常为近红外光，因此在生物样本内可以实现更好的穿透效果，但高光强可能导致局部光损伤。

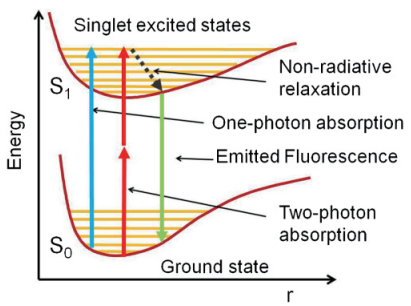


图 1 单光子激发（单光子吸收）和双光子激发（多光子吸收）[18]

总而言之，单光子激发依赖单个高能光子，技术成熟且成本较低，适用于常规荧光成像；而双光子激发利用两个低能光子的非线性吸收，在穿透性、光损伤控制和三维成像方面优势显著，是高分辨厚样本分析的首选技术。根据实验需求和样本特性可以按需选择合适的激发方式。

1.2 光片产生原理

LSFM的核心结构包含照明光路和探测光路两个部分，照明光路通常使用柱面镜或扫描光束生成薄层光片，对样品焦平面进行选择性激发，实现光学切片的功能；探测光路与照明光路正交，收集样品焦平面的荧光信号，使用高灵敏度相机如科研级互补金属氧化物半导体（scientific complementary metal oxide semiconductor, sCMOS）进行成像。由于仅激发焦平面内的荧光分子，因此减少了光毒性和光漂白，降低了背景荧光干扰，适合活体样本长时间成像。LSFM基本原理如图2所示。

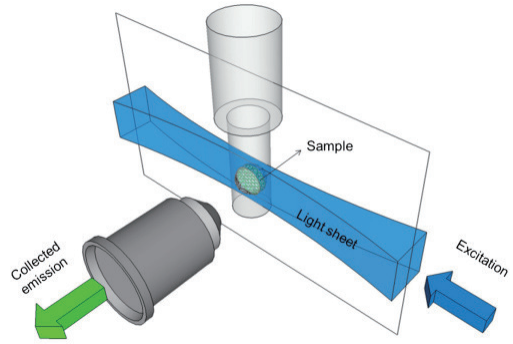


图2 光片荧光显微镜基本原理[18]

光片显微镜的探测方式仍属于宽场探测，成像的横向分辨率主要由探测物镜决定，轴向分辨率受到照明光片厚度与探测物镜轴向分辨率共同作用：

$$R_{\mathrm{det}}=\frac{0.61\lambda_{\mathrm{em}}}{N.A._{\mathrm{det}}} \tag{1}$$

$$D_{\mathrm{ill}}=\frac{1.22\lambda_{\mathrm{ill}}}{N.A._{\mathrm{ill}}} \tag{2}$$

$$R_{\mathrm{det-axial}}=\frac{1.78n\lambda_{\mathrm{em}}}{N.A._{\mathrm{det}}^{2}} \tag{3}$$

其中，R_{det}表示系统成像分辨率，D_{ill}表示照明光片厚度，$R_{\mathrm{det-axial}}$表示探测物镜轴向分辨率，λ_{em}表示发射荧光波长，$N.A._{\mathrm{det}}$表示探测物镜的数值孔径，λ_{ill}表示照明光波长，$N.A._{\mathrm{ill}}$表示照明物镜的数值孔径，n为介质折射率。

选择物镜组时通常使二者相等：

$$D_{\mathrm{ill}}=R_{\mathrm{det-axial}} \tag{4}$$

得到探测物镜与照明物镜间的关系：

$$N.A._{\mathrm{det}}=\sqrt{1.459\varepsilon nN.A._{\mathrm{ill}}} \tag{5}$$

其中，$\varepsilon=\frac{\lambda_{\mathrm{em}}}{\lambda_{\mathrm{ill}}}$。

由于商业物镜设计考虑因素较多，很难选出完全满足上述公式的物镜组合，因此上述公式仅为设计起点提供参考。

当照明物镜和探测物镜的组合选择完成后，系统横向分辨率也随之确定，选择放大倍率合适的套筒透镜确保探测相机像素条件满足奈奎斯特采样定理；同时相机靶面大小应覆盖感兴趣视场范围：

$$M\cdot R_{\mathrm{det}}\geqslant 2\cdot L_{\mathrm{pixel}} \tag{6}$$

$$M\cdot FOV_{\mathrm{ill}}\leqslant L_{\mathrm{sCOMS}} \tag{7}$$

其中，M表示探测系统的放大倍率，L_{pixel}表示相机像元尺寸大小，FOV_{ill}表示照明光片的瑞利长度，L_{sCOMS}表示相机靶面大小。

2 系统发展

2.1 历史起源

LSFM的基础结构为照明光路与探测光路相互垂直的解耦结构，这种光路配置方式最早起源于1903年，Siedentopf等[19]使用该结构对待观测溶液不同层进行选择性照明，获得了高对比度的溶液颗粒信号。该成像方式再次受到青睐，得益于生物荧光特异性标记技术的发展，彼时，生物三维成像仍依赖机械切片，同时宽场或共聚焦成像方式的光漂白问题无法缓解。1993年，Voie等[20]

提出正交平面荧光光学切片（orthogonal–plane fluorescence optical sectioning, OPFOS）显微镜，对豚鼠耳蜗进行了三维重建，但该方法样品制备过程繁琐，同时会破坏部分微观结构，成像质量极其依赖样品制备。

伴随着荧光蛋白标记技术的进一步发展，2004年，Stelzer团队[14]提出了现代意义上的第一台LSFM——选择性平面照明显微镜（selective plane illumination microscopy, SPIM）。该团队使用柱面镜将高斯光束压缩为静态平面光片，使用垂直于照明端的探测端进行信号接收。该团队利用SPIM实现了对果蝇胚胎发育过程的长时间连续在体成像，充分展示了SPIM低光毒性、低光漂白、高分辨率、高速三维成像的特点。这些优点使更多的研究者注意到LSFM在生命科学领域的巨大潜力，自此该项技术也进入了高速发展阶段。2008年，Keller等[21]使用扫描振镜配合f–theta透镜，开发了数字扫描光片显微镜（digital scanned light–sheet microscopy, DSLM）。扫描振镜对入射激光进行角度偏折时，照明物镜焦平面上的汇聚光线同时平行移动，形成虚拟光片，动态的虚拟光片提高了观察焦平面的照明均匀度与成像对比度，消除了静态光片照明导致的伪影。2010年，Keller团队[22]将DSLM系统与非相干结构光照明技术结合，更进一步地提高了成像质量。

2010年，第一届LSFM研讨会于德国举办，大会正式将该项技术命名为光片荧光显微镜（LSFM）[23]。此后，LSFM越来越多地被应用于神经科学、发育生物学等领域，技术的不断创新也带来了更优异的成像效果，基于LSFM的生物发现也不胜枚举。2014年，LSFM被《Nature Methods》评为“年度技术”[24]。LSFM的发展历史如图3所示。

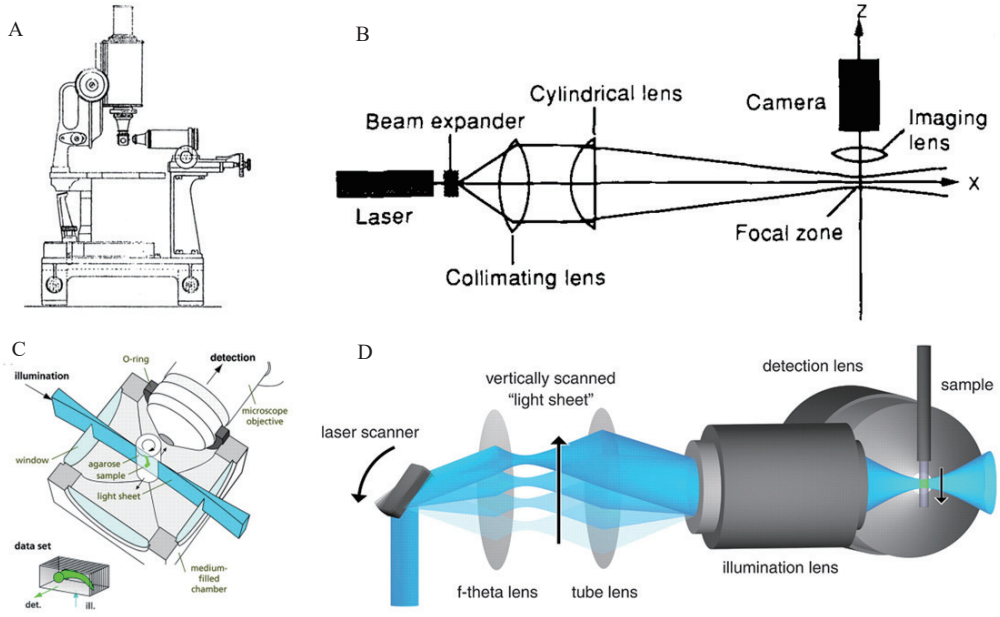


图3 光片荧光显微镜发展历史 A为垂直解耦结构显微镜[19]；B为正交平面荧光光学切片（OPFOS）显微镜[20]；C为选择性平面照明显微镜（SPIM）[14]；D为数字扫描光片显微镜（DSLM）[21]

生命科学研究中常见的如脑神经网络信息传递刻画、胚胎发育过程监测、蛋白质表达时空解析等，都要求光片显微镜向着更低的光毒性、光漂白和更高的分辨率、三维成像速度发展。基于不同的实现原理，研究人员开发了不同种类的光片显微镜。

2.2 高斯光片显微镜

传统的光片显微镜不对照明光进行分布上的处理，常为高斯分布，通过照明物镜后形成薄片状的高斯光片[25–26]。高斯光片的束腰半径与照明物镜

的数值孔径成反比，一般情况下近似表征了光片系统的轴向分辨率；而高斯光束的视场定义为瑞利长度的两倍，视场大小与束腰半径的平方成正比。如果追求中心更高的轴向分辨率，则会导致更小的视场，远离视场中心的过程中轴向分辨率迅速恶化；如果追求更大的视场，则会导致视场内轴向分辨率均偏差的结果[27]。视场与束腰的制约关系如图4所示。

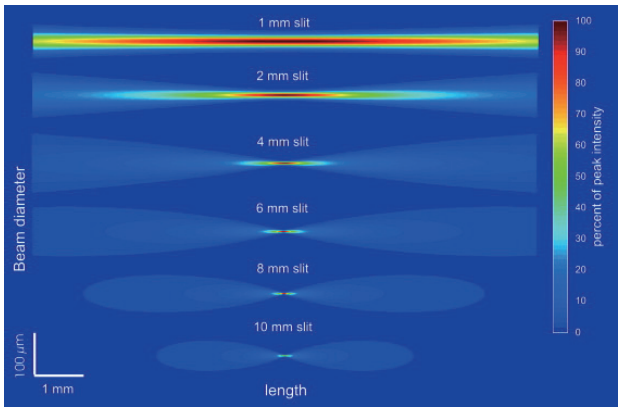


图4 高斯光束视场与束腰相互制约[26]

视场与轴向分辨率相互制约是高斯光片的根本问题，目前的解决思路有两种，即使用无衍射光片或将高斯光片进行轴向扩展，在高分辨率下增加视场。

2.3 无衍射光片显微镜

2010年，Fahrbach等[28]将无衍射贝塞尔光束与光片技术相结合，将高斯光束垂直入射到空间光调制器（spatial light modulator, SLM），加载锥透镜或者同心圆环相位图，利用干涉现象产生贝塞尔光束，再通过扫描系统形成贝塞尔光片，如图5A所示。贝塞尔光束具有衍射不变性，主瓣在长距离传输中不发生明显的展宽，而且贝塞尔光束部分被遮挡时，在传输一定距离后会恢复波前形状，因此在散射介质中能够传播较长的距离。在相同光片厚度下，贝塞尔光片的瑞利长度远大于高斯光片。然而，贝塞尔光束的分布是同心圆，数量较多且能量较高的次级旁瓣圆环同样会激发荧光，导致背景荧光增强，降低图像对比度，带来更多的光漂白与光毒性问题。

2014年，Vettenburg等[29]利用SLM对入射光进行三次方相位调制，在物镜焦点空间形成无衍射艾里光束，制成了艾里光片显微镜，如图5B所示。该系统在扫描后会形成弯曲的艾里光片，导致获得的图像发生扭曲变形。后续使用反卷积处理可以解决图形形变，并避免旁瓣引起的图像质量下降[30–31]，但需要后期图像处理的方式不利于对生物样本活体的实时观察，也无法进行需要对生物样本施加刺激观测反应的即时性实验。

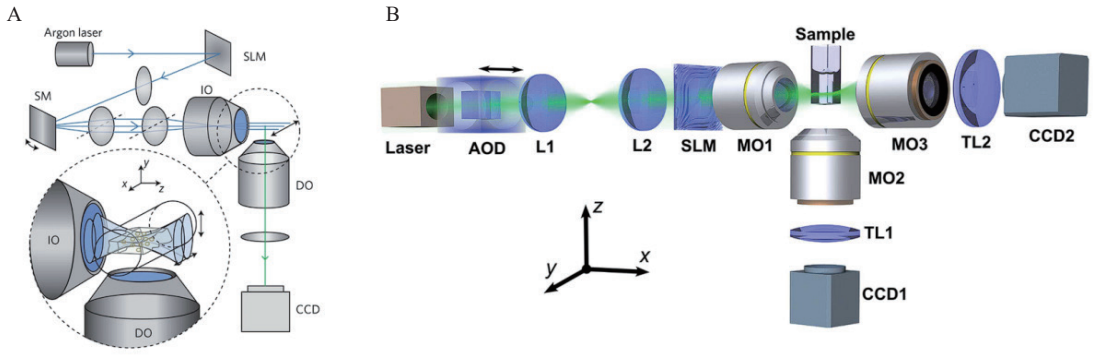


图5 2种无衍射光片显微镜 A为贝塞尔光片显微镜[28]；B为艾里光片显微镜[29]

为了抑制无衍射光束的旁瓣，提升图像质量，减轻对样品的光毒性与光漂白，研究人员提出了不同的思路。

（1）通过物理结构提升探测端效果。2012年，Fahrbach等[32]将共聚焦探测的方式与贝塞尔光片显微镜相结合，共焦狭缝掩模的添加显著减小了旁瓣引起的散射；同年，Baumgart等[33]利用sCMOS相机行像素与扫描光束同步的依次曝光，充当虚拟狭缝，大幅提升了成像速度。然而该方法对信号同步控制要求严格，对光路对准精度要求高，难以推广应用。

（2）通过算法提升探测端效果。2014年，Gao等[34–35]利用由光漂白引起的非线性荧光衰减中提取的高阶信号来获取非线性信息，通过拍摄序列图

像，获取荧光随光漂白减弱的时间曲线，分析高阶荧光信息。由于高阶信息主要由贝塞尔光片零级中心提供，因此可以消除旁瓣影响，提升图像质量。然而该方法同样不适合对活体样本成像实时性要求高的研究。

（3）通过非线性激发提升照明端效果。由于多光子激发荧光概率与激发功率成次方关系，利用该特性可以抑制旁瓣激发，提升图像质量，如双光子、三光子贝塞尔光片显微镜[36–37]等。然而多光子成像使用的飞秒脉冲激光器具有极高的照射功率，会导致样本生物的不可逆损伤甚至死亡。

（4）通过光场调控提升照明端效果。2014年，Chen等[38]利用SLM将多束贝塞尔光束在样品焦平面干涉，产生晶格状光片，称为晶格光片显微镜，如图6所示。这种结构化的光片具有更高的照明均匀性和空间频率分布，在显著减少光片旁瓣的同时不改变光片厚度，该方法能够对生物样本进行高分辨率、大视场的成像，同时光毒性较低。但该方法能量传输效率极低，同时系统结构复杂，限制了晶格光片显微镜的广泛应用。2018年，Di Domenico等[39]利用SLM形成双环狭缝，进行振幅调制，对两束贝塞尔光束进行干涉，得到旁瓣受压制的高对比度照明光片，消除率达到50%以上。通过优化参数设计[40]或结合深度学习图像处理算法[41]，几乎可以消除剩余旁瓣的影响，但照明光较低的功率传输仍是系统的最大限制。

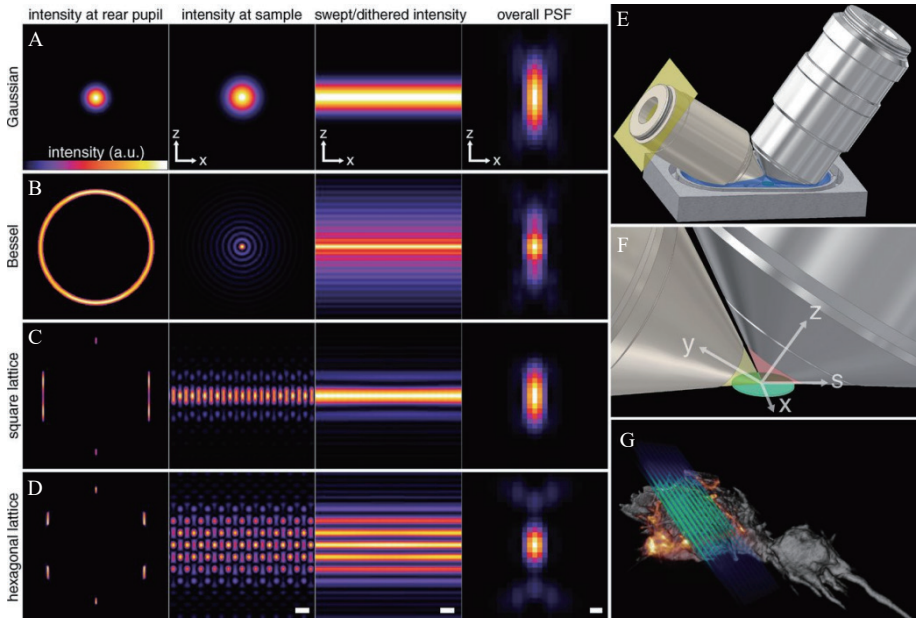


图6 晶格光片显微镜[38] A为高斯光片；B为贝塞尔光片；C为方形晶格光片；D为六边形晶格光片；E为照明与探测物镜放置方式；F为照明与探测物镜工作间距；G为晶格光片成像效果

2.4 高斯光片轴向扩展光片显微镜

除了直接改变照明光束的分布，还可以通过在照明物镜轴向对高斯光束进行扩展来得到更大的成像视场。

2.4.1 轴向扫描光片显微镜（axially swept light-sheet microscopy, ASLM）

2015年，Dean等[42]为光片照明系统添加远程聚焦系统，得到ASLM，如图7A所示。该系统使用压电扫描镜沿光传播方向进行轴向扫描，得到了样品端可以沿照明光传播方向轴向移动的焦点，控制相机行像素开关时序，可以实现总以光片最优段进行成像的效果，提高了成像质量。然而，压电扫描镜移动速度慢（小于100 Hz），限制了成像速度。2019年，Voigt等[43]使用电可调透镜（electrically tunable lens, ETL）取代基于压电扫描的轴向扫描系统，实现了20 mm级别的大样本扫描成像，但ETL约30 ms的响应速度及受重力影响的内部液体分布使其并不适用于实时成像。2020年，Chakraborty等[44]基于之前的工作，改进了ASLM的扫描方式，通过将压电扫描系统更换为阶梯状反射镜或倾斜反射镜，配合扫描振镜，实现了高速轴向无相差扫描，但系统实现的轴向扫描范围较小，同时系统

对准难度大，也限制了系统的推广应用。2024年，Prince等[45]使用聚焦驱动器（linear focus actuator, LFA）代替压电扫描镜结构，并通过分光的方式在轴向产生两个光片，提升了系统成像速度，但LFA与控制电压响应为非线性关系，增加了系统控制的复杂度。

2.4.2 平铺光片显微镜（tiling light sheet flourescence microscopy, TLSFM）

2015年，Gao等[46]通过将短、薄的光片沿轴向平铺，在每个位置采集图像并组合重建视场，实现了与轴向扫描不同的视场扩展策略，被称作平铺光片显微镜（TLSFM），如图7B所示。2016年，该团队提出具有平铺光片选择性的平面照明显微镜（tiling light sheet selective plane illumination microscopy, TLS-SPIM），为系统添加两个SLM，分别负责产生晶格光阵列或阵列光束和调节平铺光片位置，实现了对施加光片形态、位置、平铺次数的实时调节，以得到最佳的成像效果[47]。2019年，该团队继续提出不连续平铺光片显微镜，通过将物镜入瞳均匀划分为交替分布的扇形区域实现空间复用，对两区域分别应用不同的相位图达到四段光束沿轴向分布的效果[48]。然而，光束间的串扰加重了背景荧光的产生，影响成像质量的同时带来光毒性与光漂白，较高的系统复杂性带来了更高的控制要求。平铺光片显微镜利用切片能力更好、分辨率更优的短光片进行视场拼接的成像，然而平铺带来的是更差的时间分辨率，长时间的曝光不可避免地造成光毒性和光漂白，SLM的组合使用也降低了光能利用效率。

2.4.3 多光片显微镜

Yao课题组[49-50]在2019年使用掩模生成一束不包含主极大的贝塞尔光束的互补光束，又于2021年使用SLM生成高斯光束阵列的互补光束阵列，分别使用原光束条件和互补光束进行成像，并通过两图像做差的方式消除背景光影响。2021年，Xi课题组[51]使用多层反射结构器件配合远程聚焦技术，实现了轴向重叠的多光片照明，如图7C所示。

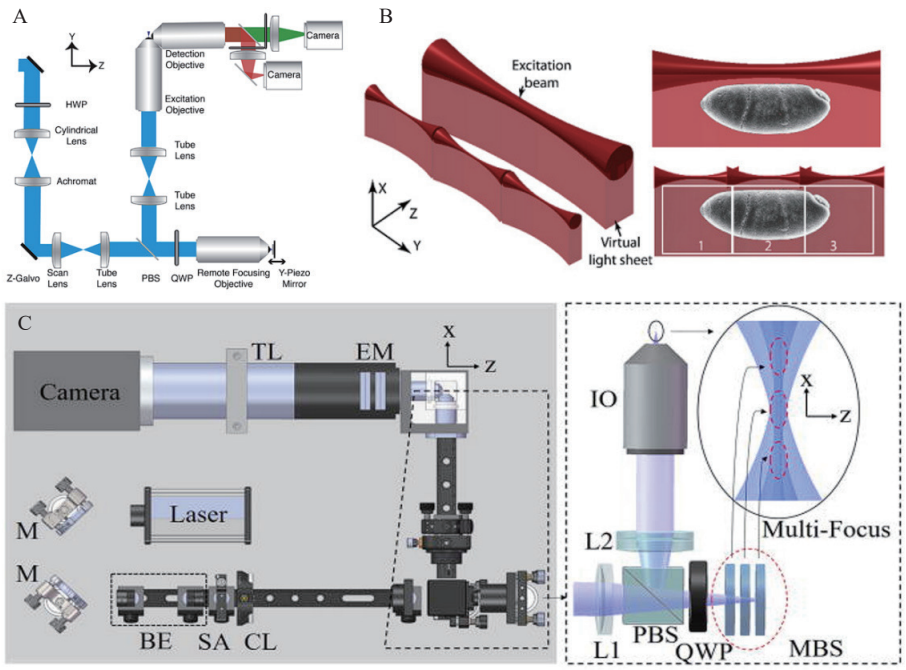


图7 3种高斯光片轴向扩展光片显微镜 A为轴向扫描光片显微镜[42]；B为平铺光片显微镜[46]； C为轴向重叠多光片显微镜[51]

2.5 基于需求改进结构的光片显微镜

2.5.1 扫描共焦平面激发（swept confocally-aligned planar excitation, SCAPE）显微镜

在面临高倍率生物成像需求时，高数值孔径（N.A.）物镜通常工作距离极短，传统照明物镜与探测物镜分离的方式导致样品端设计极难实现，因

此，单物镜光片显微镜应运而生。该方法的灵感来源于2008年Dunsby等[52]提出的倾斜平面显微镜（oblique plane microscopy, OPM），该技术将远程聚焦技术与光片技术相结合，实现了在单个物镜下的非同轴照明激发与信号收集。2015年，Bouchard等[53]提出SCAPE显微镜，通过单一物镜生成倾斜扫描的共聚焦对准平面光片激发样本，利用独特的共聚焦去扫描和图像旋转光学系统将移动的照明平面实时映射到静止相机，无需样本或物镜移动即可实现超过20体/s的超高速三维成像，如图8所示。2019年，Yang等[54]使用单个高数值孔径水浸物镜进行斜射照明和荧光收集，通过折射率优化设计突破远程成像模块的数值孔径限制，实现了更高分辨率下的高速三维成像。2022年，该团队提出DaXi显微技术，通过定制高数值孔径远程聚焦物镜实现全数值孔径探测，结合光片稳定扫描同步移动样品和光片消除运动模糊，并利用双光路翻转模块实现正交多视角成像，在倒置显微镜构型下支持大视场、高分辨率的三维体成像，为发育生物学提供跨尺度动态观测能力[55]。

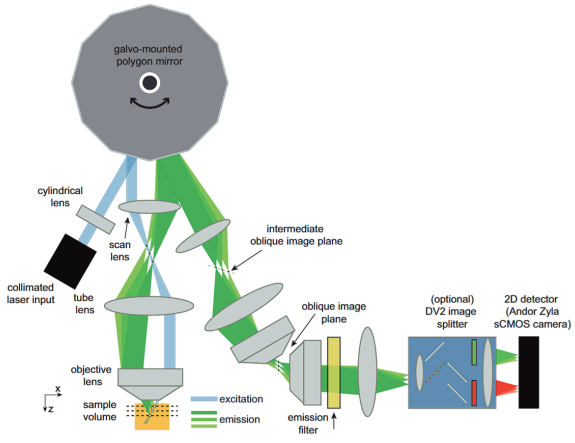


图8 扫描共焦平面激发显微镜[53]

2.5.2 开顶式光片（open-top light-sheet, OTLS）显微镜

在特定生物研究中，存在对样本有特殊固定方式或生物本身有遮挡的情况，导致无法使用传统光片结构进行照明成像，如对微流控芯片、玻片以及96孔板中样本进行大规模高通量的三维成像。OTLS显微镜的提出解决了相关问题。2015年，Huang课题组[56]设计了OTLS显微镜，利用水棱镜补偿45°斜射盖玻片引入的像差，结合检测光路柱面镜校正像散，通过下方双物镜生成光片并收集荧光，实现微流控芯片、多孔板、玻片等常规载体的高速三维体成像，如图9所示。2017年，Liu课题组[57]为OTLS显微镜添加半球形固体浸没透镜（solid immersion lens, SIL）和油层折射率匹配，校正斜射盖玻片引入的像差，实现了前列腺切除术标本、乳腺肿瘤等大尺寸临床样本表面及深层的高分辨率三维成像。2019年，该课题组将SIL改进为固体浸入弯月透镜（solid immersion meniscus lens, SIMlens），突破传统SIL的折射率限制，实现系统改进[58]。2020年，该课题组提出了一款紧凑型多分辨率OTLS显微镜，能够在低分辨率（5倍）和高分辨率（20倍）三维成像的空气物镜之间快速转换，诊断病理学应用中高效的3D分析工作流程展示了该系统的实用性[59]。

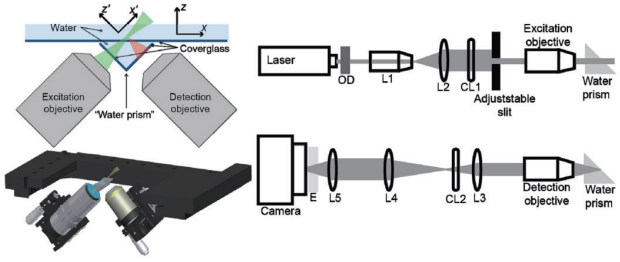


图9 开顶式光片显微镜[56]

3 生物医学应用

3.1 病理分析

在病理分析的常用方法中，磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）、计算机断层扫描（computed tomography, CT）、光学相干断层成像（optical coherence tomography, OCT）和LSFM各具特色。MRI通过无辐射的软组织高对比成像，可实现全身肿瘤、脑病变等大体评估，但分辨率较低；CT凭借快速扫描和骨骼高清晰度，多用于骨折、肺部结节诊断，但存在辐射风险；OCT以微米级分辨率实时检测浅表组织如视网膜、皮肤等，适合术中监测或微结构观察，但穿透深度有限；LSFM则以亚微米级三维分辨率解析透明化样本的细胞、血管网络，主要用于科研领域的精细结构研究，较依赖复杂样本预处理。四者在分辨率、深度、适用场景上互补，但LSFM在科研维度的病理可视化方面，相较于MRI、CT、OCT[60]等常规切片成像方法，展示出较大优势。4种成像方式特点对比如表1所示。

表1 MRI、CT、OCT与LSFM特点对比

成像方法	分辨率	成像目标	样品处理	主要应用	优势	局限性
MRI	毫米级（0.5 ~ 3.0 mm）	深层组织	无	软组织病变，肿瘤分期	软组织对比度高	低分辨率，耗时
CT	亚毫米级（0.3 ~ 0.6 mm）	骨骼、肺部	无	骨损伤，肺结节	快速，骨骼清晰	软组织对比度低
OCT	微米级（1 ~ 15 μm）	浅层组织	无	眼科，皮肤浅层	高分辨率，实时成像	穿透浅
LSFM	亚微米级（0.2 ~ 5.0 μm）	透明化样本	透明化+荧光标记	三维细胞结构，组织/器官成像	超高分辨率，三维重建	样品预处理复杂

注：MRI为磁共振成像；CT为计算机断层扫描；OCT为光学相干断层成像；LSFM为光片荧光显微镜。

由上可见，在常见的病理学检测方法中，通常使用二维切片进行成像分析，但二维切片无法再现组织复杂的结构。光片显微镜可以对透明化的离体组织或活检样本进行高分辨率三维成像，更准确地还原组织中复杂的细胞分布，获取二维切片中无法量化观察到的现象，在病理组织研究中已有广泛应用。

在肿瘤病理学研究中，光片显微镜可以实现亚细胞分辨率的三维无损成像，便于进行组织结构分析或给药后细胞变化的动态评估。Liu、Uhlén、Fei的研究团队，使用光片显微镜对前列腺组织样本（如图10A所示）[57]、乳腺癌的淋巴结转移组织[61]、巴雷特病变食管[62]、膀胱肿瘤的淋巴微血管[63]、淋巴瘤组织[64]进行了三维体积成像，展示了该技术在肿瘤病理分析中的重要价值。Susaki团队[65]在对人类乳腺癌组织进行体积成像的同时，记录了抗癌药物在肿瘤组织中的传输过程，提供了药物评估的可视化工具，如图10B所示。

在人脑组织的可视化研究与神经细胞的特征分析中，利用光片显微镜可以实现对透明化处理的脑组织进行神经细胞追踪[66]、血管结构可视化[67]、大规模组织成像与细胞分割计数[68]、病变组织成像（如图10C所示）[69]，提供对神经系统疾病如阿尔茨海默症、帕金森病、癫痫等进行研究的技术基础。部分研究者也对其他病理组织进行了成像分析，如深层皮肤结构和异常皮肤组织的三维可视化[70]、人眼眼底[71-73]结构的精细化成像[74]、口腔组织体积成像[75]等。

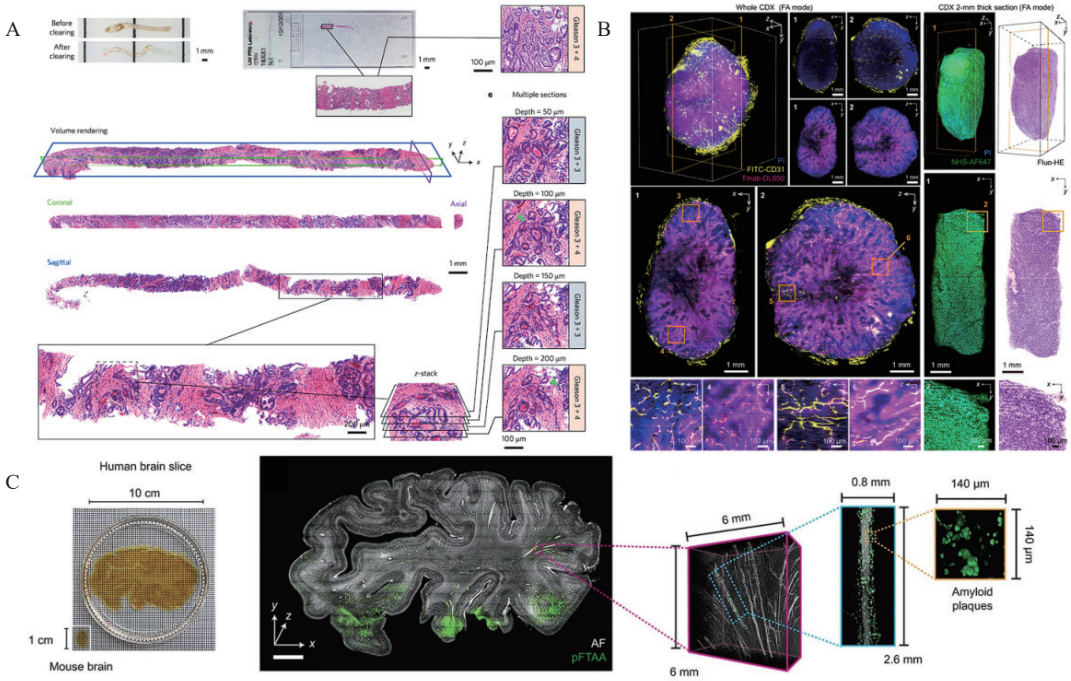


图10 基于LSFM的病理组织三维成像 A为人类前列腺芯针活检样本成像[61]；B为人类乳腺癌肿瘤块药物输送可视化[65]；C为人脑组织切片成像与富含淀粉样蛋白区域[69]

对光片显微镜采集的三维数据进行分析处理，可以获得更多的组织信息。Liu课题组[76]开发了TriPath弱监督三维病理数据分析平台，该平台基于OTLS显微镜和显微CT，仅需患者级标签（如复发状态）即可自动识别预后相关形态特征，验证了三维成像在癌症预后中的独特优势，推动病理学从二维到三维的范式转变，为精准医疗提供了新工具。针对前列腺癌，Serafin等[77]开发了深度学习流程——Cellpose模型，分割腺上皮和间质区域的三维核结构，处理结果优于传统二维核特征方法，通过全面量化核与腺体的形态，提供了非破坏性、高信息量的前列腺癌风险评估方法。次年，该团队提出了一种深度学习辅助的免标注分割框架——ITAS3D，该方法通过生成合成免疫标记图，结合基础计算机视觉技术，生成腺体分割掩模，实现了前列腺癌的自动检测，克服了之前研究中依赖人工标注的局限性[78]。Chow等[79]基于三维病理学和深度学习辅助的神经与血管分析，提出一种前列腺癌风险分层方法，实现了前列腺癌神经与血管的自动化分割与空间关系量化，为预后评估提供了新维度。基于光片显微镜获得的三维图像数据，开发数据处理工具，可以帮助医生更准确、高效地诊断疾病，有望在进行临床验证与多特征融合后，推动精准病理诊断的发展。

3.2 神经科学

神经细胞活动过程的功能性或高速体积成像，旨在捕获毫秒尺度发生的单个神经细胞放电，测量它们对刺激的反应活动并发现模式集合或特定行为的起源，光片显微镜与基因编码的钙离子指示剂技术相结合，可以通过记录群体细胞中钙离子浓度的变化，间接获得神经细胞的电信号传递情况。

在斑马鱼全脑研究中，Keller团队[16]对斑马鱼幼体全脑进行钙成像实验，实验结果揭示了前脑与中后脑的慢速振荡分离，并发现位于后脑的左右对称神经元群以约20 s为一周期的反相位振荡模式动态协调，且与脊髓神经毡活动同步，提示这些功能网络可能参与运动控制的跨脑区动态协调，如图11A所示；之后该团队对斑马鱼进行全脑单细胞水平的实时成像实验，实现了发育过程中神经前体细胞的追踪及行为状态下全脑神经活动的记录，为全面解析神经系统的动态发育轨迹及跨脑区的大规模神经活动模式提供了理论支持，如图11B[80]、图11C[81]所示。de Vito等[82]在无可见光干扰的条件下对4日龄斑马鱼幼体全脑神经元钙活动进行昼夜成像，发现夜间阶段前菱形脑转向区（ARTR）活动减弱与睡眠期运动减少行为相关。Zhang等[83]对斑马鱼侧线系统发育过程中毛细胞、支持细胞及胆碱能传出末梢的自发钙活动进行活体成像，揭示了在发育中的侧线毛细胞中，自主产生的自发活动源于自发的机械感觉事件。

在斑马鱼神经疾病研究中，Burgstaller等[84]通过对野生型与抑郁型斑马鱼在施加抗抑郁药物前后分别进行全脑成像，分析药物对脑功能连接的动态影响，实现高效捕捉全脑功能连接的结构性变化，为斑马鱼精神疾病模型及药物筛选提供了高通量研究框架。de Vito等[85]对诱导癫痫斑马鱼进行双光子全脑成像，首次揭示了癫痫发作时尾–喙痫样波（CRIWs），证实该技术可无创捕捉高时空分辨率脑网络异常活动模式。

在对斑马鱼运动神经元的研究中，Wan等[86]通过光片显微镜，对斑马鱼胚胎脊髓中所有神经元的发育、谱系及钙动态进行长期追踪，结合细胞类型标记和激光消融实验，揭示运动神经元作为先驱细胞率先激活并形成局部同步化集群，解释建立左右交替运动节律的成因，表明神经元功能成熟遵循基于出生时间与解剖起源的固定模式，为神经回路发育提供了单细胞水平的动态图谱。Petrucco等[87]通过光片显微成像结合电镜重建，首次在脊椎动物中揭示了由相互抑制连接支撑的环状吸引子网络，阐明了斑马鱼头部方向编码的神经机制，并证明其与昆虫的进化保守性。

3.3 胚胎发育

光片显微镜可以在不损伤胚胎组织的情况下，对胚胎发育过程进行长时间的动态观察，脊椎动物与无脊椎动物均有适合本系统的模式生物。

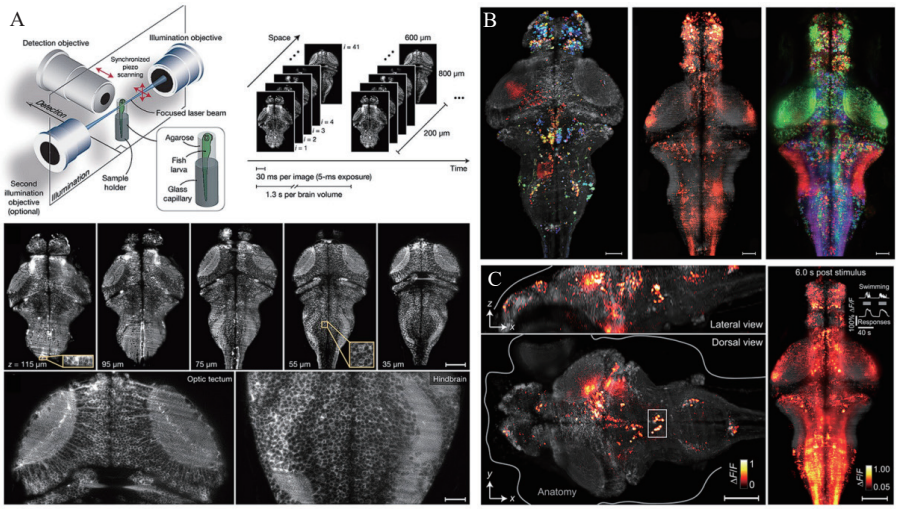


图 11 基于LSFM的斑马鱼全脑三维成像 A为斑马鱼全脑成像[16]；B为不同时间的神经活动[80]；C为神经活动成像与运动过程全脑成像[81]

斑马鱼是现用最适配光片显微镜的模式生物，具有体型小、繁殖发育快、胚胎透明的特点。Keller等[21]使用DSLM，在发育最初24 h内对野生型和突变型斑马鱼整个胚胎的细胞核定位和运动进行了记录，构建起数字胚胎数据库，并确定了胚胎体轴且推导了胚层形成的模型，如图12A—图12D所示。Attardi等[88]分析了斑马鱼胚胎中神经中胚层祖细胞（NMps）的发育动态，揭示了与小鼠不同的非干细胞式快速分离模式及物种间生长动力学的显著差异。Wan等[86]追踪了斑马鱼胚胎脊髓中所有神经元的发育过程，揭示了神经元功能成熟遵循基于出生时间和解剖起源的刻板模式。Daetwyler等[89]对活体斑马鱼胚胎进行连续数日成像，实现了对血管网络生长发育的高精度三维追踪。

对于小鼠的胚胎发育过程，研究人员通过LSFM追踪了小鼠胚胎从植入前发育阶段[90]到原肠胚形成和早期器官发生的动态过程[91–92]，同时对妊娠中期的胚胎发育（如图12E所示）[93]进行了全程成像分析。部分鸟类模式生物，如鸡、鹌鹑等也被用于胚胎成像研究[94–95]。无脊椎动物中，秀丽隐杆线虫[96–97]、果蝇（如图12F所示）[98–100]、赤拟谷盗[101–103]均有基于LSFM的生物发现。

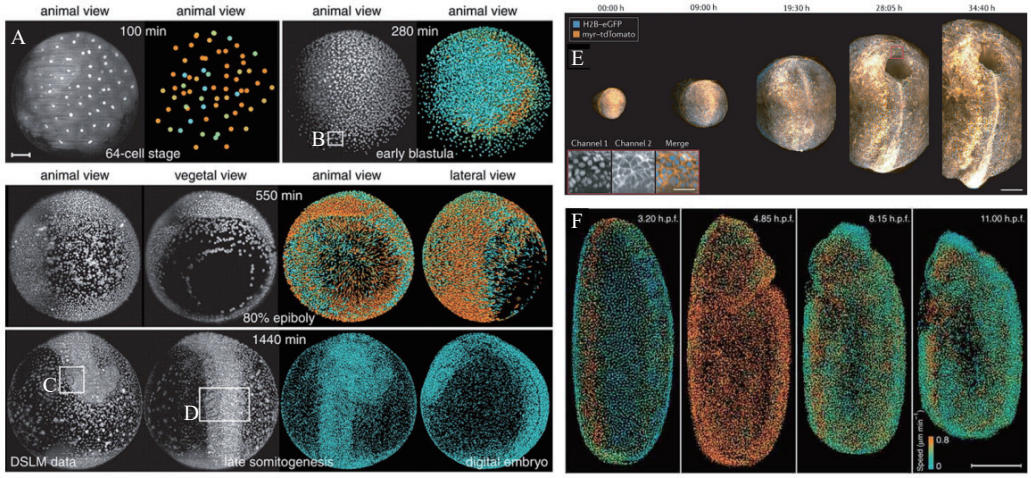


图 12 基于LSFM的胚胎发育三维成像 A—D为斑马鱼胚胎发育的成像与重建[21]；E为小鼠胚胎发育成像[93]；F为果蝇胚胎发育成像[22]

4 结语

LSFM作为一种高分辨率、快速三维成像技术，具有低光毒性、低光漂白的优点，近年来在病理分析、神经科学、胚胎发育等生物医学领域获得了广泛的应用。针对LSFM本身的局限性，研究人员在提升成像质量、降低背景荧光干扰、扩大成像视场范围等方面提出了如无衍射光束照明和高斯光束轴向扩展等研究方法；针对不同的生物研究需

求，研究人员也提出了OTLS显微镜、SCAPE显微镜等解决方式来应对种类丰富的生物样本。通过与图像处理、深度学习等工具相结合，极大地提升了光片显微镜的时空性能，促使LSFM向着更大的成像视场、更高的成像分辨率、更快的三维成像速度、更低的光毒性与光漂白迈进。通过自适应成像方案可提升成像质量与通量；基于深度学习的数据处理方法能够对三维图像进行全面、动态、准确、高效的分析，在肿瘤病理学、神经系统的研究中以及其他病理组织的检测中，为医生提供更加高效精准的诊疗参照，在脑科学与胚胎发育等方面，也能辅助研究人员发现更多新颖有趣的生物现象。当前，LSFM的智能化仍面临许多挑战，例如，在医疗应用中，常需要对离体样品进行复杂处理，LSFM与其他成像模式的兼容性尚有待提高，如何为手术机器人添加LSFM导航尚不明确；在生物研究中，应对多样化的生物状态进行成像策略的自动调整尚有待实现。未来，研究人员将继续推动LSFM向着智能、高效的方向发展，解决当前的问题与挑战，进一步扩展其在病理分析与生物研究中的应用。

[参 考 文 献]

[1] Lichtman J W, Conchello J A. Fluorescence microscopy [J]. Nature Methods, 2005, 2: 910–919.

[2] Kim B, Naemura T. Blind depth–variant deconvolution of 3D data in wide–field fluorescence microscopy [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9894.

[3] Wayne R O. Light and video microscopy [M]. 3rd ed. New York: Academic Press, 2019.

[4] Zhou Q, Chen Z, Liu Y H, et al. Three–dimensional wide–field fluorescence microscopy for transcranial mapping of cortical microcirculation [J]. Nature Communications, 2022, 13: 7969.

[5] Lichtman J W. Confocal microscopy [J]. Scientific American, 1994, 271(2): 40–45.

[6] Brakenhoff G J. Imaging modes in confocal scanning light microscopy (CSLM) [J]. Journal of Microscopy, 1979, 117(2): 233–242.

[7] Shotton D M. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens [J]. Journal of Cell Science, 1989, 94(2): 175–206.

[8] Wilson T. The scanning optical microscope [J]. Scanning, 1985, 7(2): 79–87.

[9] He Y, Bao M, Chen Y, et al. Accuracy characterization of Shack–Hartmann sensor with residual error removal in spherical wavefront calibration [J]. Light: Advanced Manufacturing, 2023, 4(4): 393–403.

[10] Chen Y, He Y, Wang J, et al. Automated cone photoreceptor cell identification in confocal adaptive optics scanning laser ophthalmoscope images based on object detection [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2022, 15(1): 2250001.

[11] Elliott A D. Confocal microscopy: principles and modern practices [J]. Current Protocols in Cytometry, 2020, 92(1): e68.

[12] Laurent M, Johannin G, Gilbert N, et al. Power and limits of laser scanning confocal microscopy [J]. Biology of the Cell, 1994, 80(2–3): 229–240.

[13] Klonis N, Rug M, Harper I, et al. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics [J]. European Biophysics Journal, 2002, 31: 36–51.

[14] Huisken J, Swoger J, Del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy [J]. Science, 2004, 305(5686): 1007–1009.

[15] Ritter J G, Veith R, Veenendaal A, et al. Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue [J]. PloS One, 2010, 5(7): e11639.

[16] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole–brain functional imaging at cellular resolution using light–sheet microscopy [J]. Nature Methods, 2013, 10: 413–420.

[17] Amat F, Lemon W, Mossing D P, et al. Fast, accurate reconstruction of cell lineages from large–scale fluorescence microscopy data [J]. Nature Methods, 2014, 11: 951–958.

[18] Olarte O E, Andilla J, Gualda E J, et al. Light–sheet microscopy: a tutorial [J]. Advances in Optics and Photonics, 2018, 10(1): 111–179.

[19] Siedentopf H, Zsigmondy R. Uber sichtbarmachung und größenbestimmung ultramikoskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldrubingläser [J]. Annalen der Physik, 1902, 315(1): 1–39.

[20] Voie A H, Burns D H, Spelman F A. Orthogonal - plane fluorescence optical sectioning: three - dimensional imaging of macroscopic biological specimens [J]. Journal of Microscopy, 1993, 170(3): 229–236.

[21] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy [J]. Science, 2008, 322(5904): 1065–1069.

[22] Keller P J, Schmidt A D, Santella A, et al. Fast, high–contrast imaging of animal development with scanned light sheet–based structured–illumination microscopy [J]. Nature Methods, 2010, 7: 637–642.

[23] Reynaud E G, Tomancak P. Meeting report: first light sheet based fluorescence microscopy workshop [J]. Biotechnol J, 2010, 5(8): 798–804.

[24] Method of the year 2014 [J]. Nature Methods, 2015, 12: 1.

[25] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three–dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain [J]. Nature Methods, 2007, 4: 331–336.

[26] Jährling N, Becker K, Kramer E R, et al. 3D–visualization of nerve fiber bundles by ultramicroscopy [J]. Medical Laser Application, 2008, 23(4): 209–215.

[27] Chang B J, Dean K M, Fiolka R. Systematic and quantitative comparison of lattice and Gaussian light–sheets [J]. Optics Express, 2020, 28(18): 27052–27077.

[28] Fahrbach F O, Simon P, Rohrbach A. Microscopy with self–reconstructing beams [J]. Nature Photonics, 2010, 4: 780–785.

[29] Vettenburg T, Dalgarno H I C, Nylk J, et al. Light–sheet microscopy using an Airy beam [J]. Nature Methods, 2014, 11: 541–544.

[30] Yang Z, Prokopas M, Nylk J, et al. A compact Airy beam light sheet microscope with a tilted cylindrical lens [J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(10): 3434–3442.

[31] Nylk J, McCluskey K, Aggarwal S, et al. Enhancement of image quality and imaging depth with Airy light–sheet microscopy in cleared and non–cleared neural tissue [J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(10): 4021–4033.

[32] Fahrbach F O, Rohrbach A. Propagation stability of self–

reconstructing Bessel beams enables contrast–enhanced imaging in thick media [J]. Nature Communications, 2012, 3: 632.
[33] Baumgart E, Kubitscheck U. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection [J]. Optics Express, 2012, 20(19): 21805–21814.
[34] Gao L, Zhu L, Li C, et al. Nonlinear light–sheet fluorescence microscopy by photobleaching imprinting [J]. Journal of the Royal Society Interface, 2014, 11(93): 20130851.
[35] Gao L, Garcia–Uribe A, Liu Y, et al. Photobleaching imprinting microscopy: seeing clearer and deeper [J]. Journal of Cell Science, 2014, 127(2): 288–294.
[36] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, et al. Rapid three–dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination [J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 417–423.
[37] Escobet–Montalbán A, Gasparoli F M, Nylk J, et al. Three–photon light–sheet fluorescence microscopy [J]. Optics Letters, 2018, 43(21): 5484–5487.
[38] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light–sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution [J]. Science, 2014, 346(6208): 1257998.
[39] Di Domenico G, Ruocco G, Colosi C, et al. Cancellation of Bessel beam side lobes for high–contrast light sheet microscopy [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17178.
[40] Han Q, Shi J, Shi F. Sidelobe suppression in structured light sheet fluorescence microscopy by the superposition of two light sheets [J]. Biomedical Optics Express, 2023, 14(3): 1178–1191.
[41] Guo X, Zhao F, Zhu J, et al. Rapid 3D isotropic imaging of whole organ with double–ring light–sheet microscopy and self–learning side–lobe elimination [J]. Biomedical Optics Express, 2023, 14(12): 6206–6221.
[42] Dean K M, Roudot P, Welf E S, et al. Deconvolution–free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy [J]. Biophysical Journal, 2015, 108(12): 2807–2815.
[43] Voigt F F, Kirschenbaum D, Platonova E, et al. The mesoSPIM initiative: open–source light–sheet microscopes for imaging cleared tissue [J]. Nature Methods, 2019, 16(11): 1105–1108.
[44] Chakraborty T, Chen B, Daetwyler S, et al. Converting lateral scanning into axial focusing to speed up three–dimensional microscopy [J]. Light: Science & Applications, 2020, 9: 165.
[45] Prince M N H, Garcia B, Henn C, et al. Signal improved ultra–fast light–sheet microscope for large tissue imaging [J]. Communications Engineering, 2024, 3: 59.
[46] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet [J]. Optics Express, 2015, 23(5): 6102–6111.
[47] Fu Q, Martin B L, Matus D Q, et al. Imaging multicellular specimens with real–time optimized tiling light–sheet selective plane illumination microscopy [J]. Nature Communications, 2016, 7: 11088.
[48] Wang D, Jin Y, Feng R, et al. Tiling light sheet selective plane illumination microscopy using discontinuous light sheets [J]. Optics Express, 2019, 27(23): 34472–34483.
[49] Jia H, Yu X, Yang Y, et al. Axial resolution enhancement of light–sheet microscopy by double scanning of Bessel beam and its complementary beam [J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(1): e201800094.
[50] Liu C, Bai C, Yu X, et al. Extended field of view of light–sheet fluorescence microscopy by scanning multiple focus–shifted Gaussian beam arrays [J]. Optics Express, 2021, 29(4): 6158–6168.
[51] Li H, Wu Z, Yang Z, et al. Axially overlapped multi–focus light sheet with enlarged field of view [J]. Applied Physics Letters, 2021, 118(22): 223701.
[52] Dunsby C. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy [J]. Optics Express, 2008, 16(25): 20306–20316.
[53] Bouchard M B, Voleti V, Mendes C S, et al. Swept confocally–aligned planar excitation(SCAPE) microscopy for high–speed volumetric imaging of behaving organisms [J]. Nature Photonics, 2015, 9: 113–119.
[54] Yang B, Chen X, Wang Y, et al. Epi–illumination SPIM for volumetric imaging with high spatial–temporal resolution [J]. Nature Methods, 2019, 16: 501–504.
[55] Yang B, Lange M, Millett–Sikking A, et al. DaXi—high–resolution, large imaging volume and multi–view single–objective light–sheet microscopy [J]. Nature Methods, 2022, 19: 461–469.
[56] McGorty R, Liu H, Kamiyama D, et al. Open–top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens [J]. Optics Express, 2015, 23(12): 16142–16153.
[57] Glaser A K, Reder N P, Chen Y, et al. Light–sheet microscopy for slide–free non–destructive pathology of large clinical specimens [J]. Nature Biomedical Engineering, 2017, 1: 0084.
[58] Barner L A, Glaser A K, True L D, et al. Solid immersion meniscus lens (SIMlens) for open–top light–sheet microscopy [J]. Optics Letters, 2019, 44(18): 4451–4454.
[59] Barner L A, Glaser A K, Huang H, et al. Multi–resolution open–top light–sheet microscopy to enable efficient 3D pathology workflows [J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(11): 6605–6619.
[60] Huang J, Fan J, He Y, et al. Physical compensation method for dispersion of multiple materials in swept source optical coherence tomography [J]. Journal of Biophotonics, 2023, 16(10): e202300167.
[61] Barner L A, Glaser A K, Mao C, et al. Multiresolution nondestructive 3D pathology of whole lymph nodes for breast cancer staging [J]. Journal of Biomedical Optics, 2022, 27(3): 036501.
[62] Reddi D M, Barner L A, Burke W, et al. Nondestructive 3D pathology image atlas of Barrett esophagus with open–top light–sheet microscopy [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2023, 147(10): 1164–1171.
[63] Tanaka N, Kaczynska D, Kanatani S, et al. Mapping of the three–dimensional lymphatic microvasculature in bladder tumours using light–sheet microscopy [J]. British Journal of Cancer, 2018, 118: 995–999.
[64] Chen L, Meng J, Zhou Y, et al. Efficient 3D imaging and pathological analysis of the human lymphoma tumor microenvironment using light–sheet immunofluorescence microscopy [J]. Theranostics, 2024, 14(1): 406–419.
[65] Otomo K, Omura T, Nozawa Y, et al. descSPIM: an affordable and easy–to–build light–sheet microscope optimized for tissue clearing techniques [J]. Nature Communications, 2024, 15: 4941.
[66] Costantini I, Ghobril J P, Di Giovanna A P, et al. A versatile clearing agent for multi–modal brain imaging [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9808.
[67] Harrison C H, Buckland G R, Brooks S E, et al. A novel method to visualise the three–dimensional organisation of the human cerebral cortical vasculature [J]. Journal of Anatomy, 2018, 232(6): 1025–1030.
[68] Schueth A, Hildebrand S, Samarska I, et al. Efficient 3D light–sheet imaging of very large–scale optically cleared human brain and prostate tissue samples [J]. Communications Biology, 2023, 6: 170.
[69] Glaser A K, Bishop K W, Barner L A, et al. A hybrid open–

top light–sheet microscope for versatile multi–scale imaging of cleared tissues [J]. Nature Methods, 2022, 19: 613–619.
[70] Abadie S, Jardet C, Colombelli J, et al. 3D imaging of cleared human skin biopsies using light–sheet microscopy: a new way to visualize in - depth skin structure [J]. Skin Research and Technology, 2018, 24(2): 294–303.
[71] Chen Y, He Y, Ye H, et al. Unified deep learning model for predicting fundus fluorescein angiography image from fundus structure image [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2024, 17(3): 2450003.
[72] Li W, Fang W, Wang J, et al. A weakly supervised deep learning approach for leakage detection in fluorescein angiography images [J]. Translational Vision Science & Technology, 2022, 11(3): 9.
[73] Wang J, He Y, Fang W, et al. Unsupervised domain adaptation model for lesion detection in retinal OCT images [J]. Physics in Medicine & Biology, 2021, 66(21): 215006.
[74] Darche M, Borella Y, Verschueren A, et al. Light sheet fluorescence microscopy of cleared human eyes [J]. Communications Biology, 2023, 6: 1025.
[75] Patel K B, Liang W, Casper M J, et al. High–speed light–sheet microscopy for the in–situ acquisition of volumetric histological images of living tissue [J]. Nature Biomedical Engineering, 2022, 6: 569–583.
[76] Song A H, Williams M, Williamson D F K, et al. Analysis of 3D pathology samples using weakly supervised AI [J]. Cell, 2024, 187(10): 2502–2520.
[77] Serafin R, Koyuncu C, Xie W, et al. Nondestructive 3D pathology with analysis of nuclear features for prostate cancer risk assessment [J]. The Journal of Pathology, 2023, 260(4): 390–401.
[78] Serafin R B, Wang R, Chow S, et al. Automatic detection of prostate cancer via 3D microscopy and deep learning [C]// Optica Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2024 (Translational, Microscopy, OCT, OTS, BRAIN), April 7–10, 2024, Fort Lauderdale, Florida, United States. Washington: Optica Publishing Group, 2024: MM3A. 2.
[79] Chow S S L, Serafin R B, Wang R, et al. Prostate cancer risk stratification via 3D pathology with deep learning–assisted nerve and vessel analysis [C]//Optica Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2024 (Translational, Microscopy, OCT, OTS, BRAIN), April 7–10, 2024, Fort Lauderdale, Florida, United States. Washington: Optica Publishing Group, 2024: JM4A. 11.
[80] Keller P J, Ahrens M B, Freeman J. Light–sheet imaging for systems neuroscience [J]. Nature Methods, 2015, 12: 27–29.
[81] Keller P J, Ahrens M B. Visualizing whole–brain activity and development at the single–cell level using light–sheet microscopy [J]. Neuron, 2015, 85(3): 462–483.
[82] de Vito G, Fornetto C, Ricci P, et al. Two–photon high–speed light–sheet volumetric imaging of brain activity during sleep in zebrafish larvae [C]//Proceedings Volume 11226, Neural Imaging and Sensing 2020. San Francisco: SPIE, 2020: 1122604.
[83] Zhang Q, Kindt K S. Using light–sheet microscopy to study spontaneous activity in the developing lateral–line system [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 819612.
[84] Burgstaller J, Hindinger E, Donovan J, et al. Light–sheet imaging and graph analysis of antidepressant action in the larval zebrafish brain network [EB/OL]. (2019–07–03) [2025–06–08]. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/618843v2.
[85] de Vito G, Turrini L, Müllenbroich C, et al. Fast whole–brain imaging of seizures in zebrafish larvae by two–photon light–sheet microscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2022, 13(3): 1516–1536.
[86] Wan Y, Wei Z, Looger L L, et al. Single–cell reconstruction of emerging population activity in an entire developing circuit [J]. Cell, 2019, 179(2): 355–372.
[87] Petrucco L, Lavian H, Wu Y K, et al. Neural dynamics and architecture of the heading direction circuit in zebrafish [J]. Nature Neuroscience, 2023, 26: 765–773.
[88] Attardi A, Fulton T, Florescu M, et al. Neuromesodermal progenitors are a conserved source of spinal cord with divergent growth dynamics [J]. Development, 2018, 145(21): dev166728.
[89] Daetwyler S, Günther U, Modes C D, et al. Multi–sample SPIM image acquisition, processing and analysis of vascular growth in zebrafish [J]. Development, 2019, 146(6): dev173757.
[90] Strnad P, Gunther S, Reichmann J, et al. Inverted light–sheet microscope for imaging mouse pre–implantation development [J]. Nature Methods, 2016, 13: 139–142.
[91] Ichikawa T, Nakazato K, Keller P J, et al. Live imaging of whole mouse embryos during gastrulation: migration analyses of epiblast and mesodermal cells [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e64506.
[92] McDole K, Guignard L, Amat F, et al. In toto imaging and reconstruction of post–implantation mouse development at the single–cell level [J]. Cell, 2018, 175(3): 859–876.
[93] Wu C, Le H, Ran S, et al. Comparison and combination of rotational imaging optical coherence tomography and selective plane illumination microscopy for embryonic study [J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(10): 4629–4639.
[94] Rozbicki E, Chuai M, Karjalainen A I, et al. Myosin–II–mediated cell shape changes and cell intercalation contribute to primitive streak formation [J]. Nature Cell Biology, 2015, 17(4): 397–408.
[95] Gómez–Gaviro M V, Balaban E, Bocancea D, et al. Optimized CUBIC protocol for three–dimensional imaging of chicken embryos at single–cell resolution [J]. Development, 2017, 144(11): 2092–2097.
[96] Duncan L H, Moyle M W, Shao L, et al. Isotropic light–sheet microscopy and automated cell lineage analyses to catalogue Caenorhabditis elegans embryogenesis with subcellular resolution [J]. J. Vis. Exp., 2019(148): e59533.
[97] Fu Q, Martin B L, Matus D Q, et al. Imaging multicellular specimens with real–time optimized tiling light–sheet selective plane illumination microscopy [J]. Nature Communications, 2016, 7: 11088.
[98] Truong T V, Supatto W, Koos D S, et al. Deep and fast live imaging with two–photon scanned light–sheet microscopy [J]. Nature Methods, 2011, 8: 757–760.
[99] Preibisch S, Amat F, Stamataki E, et al. Efficient Bayesian–based multiview deconvolution [J]. Nature Methods, 2014, 11: 645–648.
[100] Streichan S J, Lefebvre M F, Noll N, et al. Global morphogenetic flow is accurately predicted by the spatial distribution of myosin motors [J]. eLife, 2018, 7: e27454.
[101] Strobl F, Stelzer E H K. Non–invasive long–term fluorescence live imaging of Tribolium castaneum embryos [J]. Development, 2014, 141(11): 2331–2338.
[102] Münster S, Jain A, Mietke A, et al. Attachment of the blastoderm to the vitelline envelope affects gastrulation of insects [J]. Nature, 2019, 568: 395–399.
[103] Hilbrant M, Horn T, Koelzer S, et al. The beetle amnion and serosa functionally interact as apposed epithelia [J]. eLife, 2016, 5: e13834.