光与声驱动的波前整形及散射组织成像

Fei Xia[1,2,3,†], Ivo Leite[2,†], Shuquan Xiao[1,2], Nikita Kaydanov[2], Frederik Goerlitz[2], Sylvain Gigan[1,*], Robert Prevedel [2,*]

[1] 卡斯特勒-布罗塞尔实验室、巴黎高等师范学院-PSL大学、法国国家科学研究中心、索邦大学、法兰西公学院，法国巴黎 Lhomond 街 [illegible] 实验室，德国海德堡 Meyerhofstraße 1 号，邮编 69117[illegible] Nhu 加州大学尔湾分校电气工程与计算机科学系，美国尔湾，邮编 [illegible] 这些作者贡献相同。通讯作者：[illegible] in@lkb.ens.fr，R.P.：prevedel@embl.de

摘要

深层高分辨率成像对于揭示生物复杂性和推进医学诊断至关重要，但散射从根本上限制了光学方法。在最有前景的方法中，光声成像能够穿透至深层组织，但分辨率较粗；荧光则可呈现亚细胞细节，但成像深度有限。这种深度-分辨率权衡仍是生物医学成像面临的核心障碍。为弥合这一根本差距，我们提出一种混合双模态策略，将光声与荧光成像模态的优势结合起来。我们的方法利用混合光声反馈，在散射介质中实现波前整形和计算成像。通过将这些互补信号整合为非线性反馈度量，即使信号退化，我们也能实现稳健的光学聚焦。尤其是，我们展示了光声引导波前整形能够内在地产生荧光，即使在高度散射的生物组织中，也可利用这种荧光进行计算式高分辨率成像，从而在同一框架中发挥两种成像模态的互补优势。概念验证实验展示了这一协同方法，为光学成像技术开辟了道路，使其能够充分发挥此类双模态在复杂生物组织中实现大深度穿透和高分辨率成像的潜力。

引言

深层光学成像对于理解从亚细胞结构到完整组织和生物体等多个空间尺度上的生物组织结构与功能至关重要[1,2]。然而，生物组织中的光散射从根本上限制了穿透深度和空间分辨率[1,3]。随着光子经历多重散射事件，光学焦点和对比度逐渐退化，形成深度-分辨率权衡，长期以来限制了光学方法在原位观察复杂生物系统的能力[1,4]。

在成熟的技术中，光声（PA）成像[5–9] 和荧光显微镜[10–13]是应用最广泛且互为补充的两种成像模态。PA 成像将吸收的光能转化为超声波；得益于声波在组织中的弱散射，它能够实现毫米至厘米尺度的穿透深度，并具有较强的光吸收对比度[5–9]。然而，其空间分辨率受声波波长限制，通常远低于数十微米，甚至可达毫米级[9]。相比之下，荧光显微镜具有分子特异性和衍射极限（<1 μm）亚细胞分辨率，但由于散射和吸收，信号在浅表层以下会迅速衰减[1]。尽管这两个领域都取得了重大进展，例如多光谱光声断层成像[14,15]，自适应光学[3, 16–19]和多光子激发[20–22]，成像深度与分辨率之间固有的权衡仍未解决，迄今仍无法在深层生物组织内部获取高分辨率图像[1,2,4]。

波前整形已成为一种有前景的方法，可通过主动控制入射光场的光学相位来减轻散射影响[3,23,24]。由于光在散射介质中的传播具有确定性[24–26]，经过适当调控的输入波前原则上能够在目标位置产生相长干涉，从而有效地重构光学焦点[1,3,23]。基于反馈的波前整形通过测量反馈信号（通常为荧光信号[27] 或光声信号[28–32]），迭代优化输入相位，以增强光传递[33]。这一策略已在散射介质中展现出卓越的聚焦性能[3,26,33–35]。然而，在生物组织中的实际应用受到多种因素的阻碍：反馈信号往往较弱[1], 、与局部强度呈线性关系[36], ，且对噪声高度敏感[3]。因此，传统的单模态反馈方法难以在强散射或深层组织条件下维持稳定聚焦[4]。

与这些基于硬件的努力并行，近年来人们开发了计算荧光成像方法。这些方法通常旨在通过算法从散射光子中恢复荧光结构

。[27, 37–39]这些方法不通过物理方式重新聚焦光，而是利用矩阵求逆[27] 和散斑相关[38–40]来重建荧光分布。近期策略还结合了结构光照明[41], 、稳健主成分分析[39], 或基于机器学习的重建[42] ，以改善散射层后方的图像质量。尽管取得了这些进展，计算荧光成像仍受到根本限制：深层中的激发场会迅速衰减，而且缺乏可靠的高信噪比反馈机制[1,27,43]。随着散射增强，激发光会变得空间弥散，从而降低荧光生成的局限性和求逆过程的稳定性[1,2]。因此，当前的计算荧光方法主要局限于较薄或散射较弱的样品，无法在真实的组织环境中实现深层或高保真成像。

这些挑战凸显了一个根本性缺口：缺乏一种稳健的深度分辨反馈机制，能够在高度散射介质中运行，同时保持对精细光学特征的敏感性。在这里，光声信号能够提供定位，并在散射条件下保持稳定，但缺乏亚细胞精度。相比之下，荧光信号具有分子灵敏度和高光学分辨率，但会随深度增加而迅速衰减。因此，整合这两种成像模态的方法有望发挥它们的互补优势，通过波前整形和计算成像实现深层成像，从而引起相关领域的关注。

为应对这一问题，我们在此提出一种双模态光声-荧光（PA-FL）成像框架，将两种成像模态整合到非线性反馈方案中，以结合波前整形与计算成像，透过散射介质进行成像。在这一方法中，光声信号提供深度特异性引导和粗略定位，而荧光信号则通过计算重建实现高分辨率图像形成，并使光声定义区域内的高分辨率图像形成成为可能。两项概念验证实验验证了这一设想。第一项实验展示了采用非线性混合反馈指标的PA-FL协同引导波前整形，可提升散射条件下的聚焦稳定性和精度。第二项实验建立了光声增强计算荧光成像，其中迭代式光声引导聚焦的增强荧光生成，并在目标区域内实现高分辨率图像重建。总之，这些实验表明，整合光声与荧光反馈能够在单一框架内实现散射介质中的粗略定位和光学分辨率成像。

通过在单一混合成像系统中融合光声和荧光成像模态，本研究提出了一种多模态光学成像的潜在通用策略，克服了光学方法在深度与分辨率方面的

根本性限制。该方法结合了光声学的大深度穿透能力与荧光的高空间分辨率和特异性，为复杂生物组织的深层高分辨率成像提供了路径。

结果

1. 双模态波前整形与成像的概念

所提出方法的工作原理总结如图1所示。传统荧光显微镜（FLM）能够提供分子特异性对比，但成像深度较浅，因为散射会扭曲激发光和发射光的传播路径（图1a，左）。相比之下，光声显微镜（PAM）检测由吸收的光能产生的超声波，因此即使在更深处也能保持信号完整性，但其分辨率受声学分辨率限制（图1a，右）。

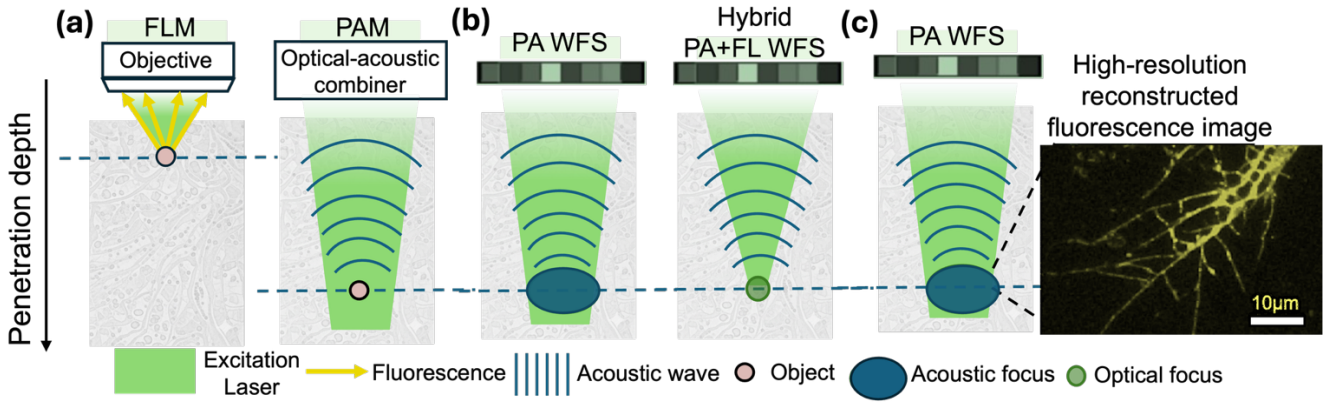


图1。光声-荧光混合波前整形用于透过散射介质实现深层高分辨率成像的概念。(a) 传统荧光显微镜（FLM）与光声显微镜（PAM）的比较，说明深度-分辨率权衡：FLM可提供亚细胞分辨率，但仅限于浅层穿透，而PAM可实现更深的成像，但其较粗的分辨率由声学衍射决定。(b) 左：光声（PA）引导波前整形（WFS）示意图，其将光能集中到由声学焦点确定的深度，但空间精度仍然有限。右：所提出的光声+ 荧光混合波前整形，其中荧光反馈在光声限定区域内精细化光学焦点，从而同时实现深度靶向与光学尺度分辨率。(c) 所提出的光声增强计算荧光成像。在光声引导聚焦过程中产生的增强荧光发射可用于计算高分辨率图像重建，结合两种成像模态的互补优势。

我们的方法旨在通过结合光声与荧光反馈，实现散射介质中的光控制，从而打通这两种成像模式（图1b）。第一阶段，光声波前整形确定吸收体的大致位置，并为光能递送提供粗略定位指引。光声信号提供一种空间分辨率较粗但稳健的反馈通道，即使荧光光信号较弱也能保持稳定。在此基础上，光学-声学混合反馈指标将两种信号整合到非线性优化方案中。光声响应将焦点限制在正确的深度和区域，而荧光分量则提高了对细微空间变化的敏感度，使所选光声区域内的精细化达到亚衍射极限。双重反馈使得即使一种模态提供的信号不足以进行波前优化，也能实现稳定聚焦；与单模态控制相比，这提高了精度并加快了收敛。优化完成后，定制波前将激发光集中到目标区域，增强荧光发射，同时可收集这些荧光以形成图像（图1c）。在光声引导下产生的荧光包含高分辨率空间信息，可通过计算重建生成散射介质内部结构的详细图像，并最大限度地减少重建中会引入噪声的“外部”荧光贡献。这一概念在单一框架中统一了深处的粗略定位与精细光学分辨率。通过将光声粗略定位与荧光精确成像相结合，该方法为两项不同的概念验证演示奠定了基础：（1）用于稳健聚焦的混合指标波前整形；（2）通过散射介质进行光声引导与增强的计算荧光成像。

2. 多模态系统设计与信号采集

基于图1所示的概念，我们开发了一种混合光声-荧光（PA-FL）波前整形系统，将两种成像模态集成在同一光学平台中（图2a-c；详细装置示意图见补充图1）。该双模态系统能够在相同光学激发下采集配准的光声和荧光信号，为后续章节所述的非线性混合反馈及成像演示奠定了基础。

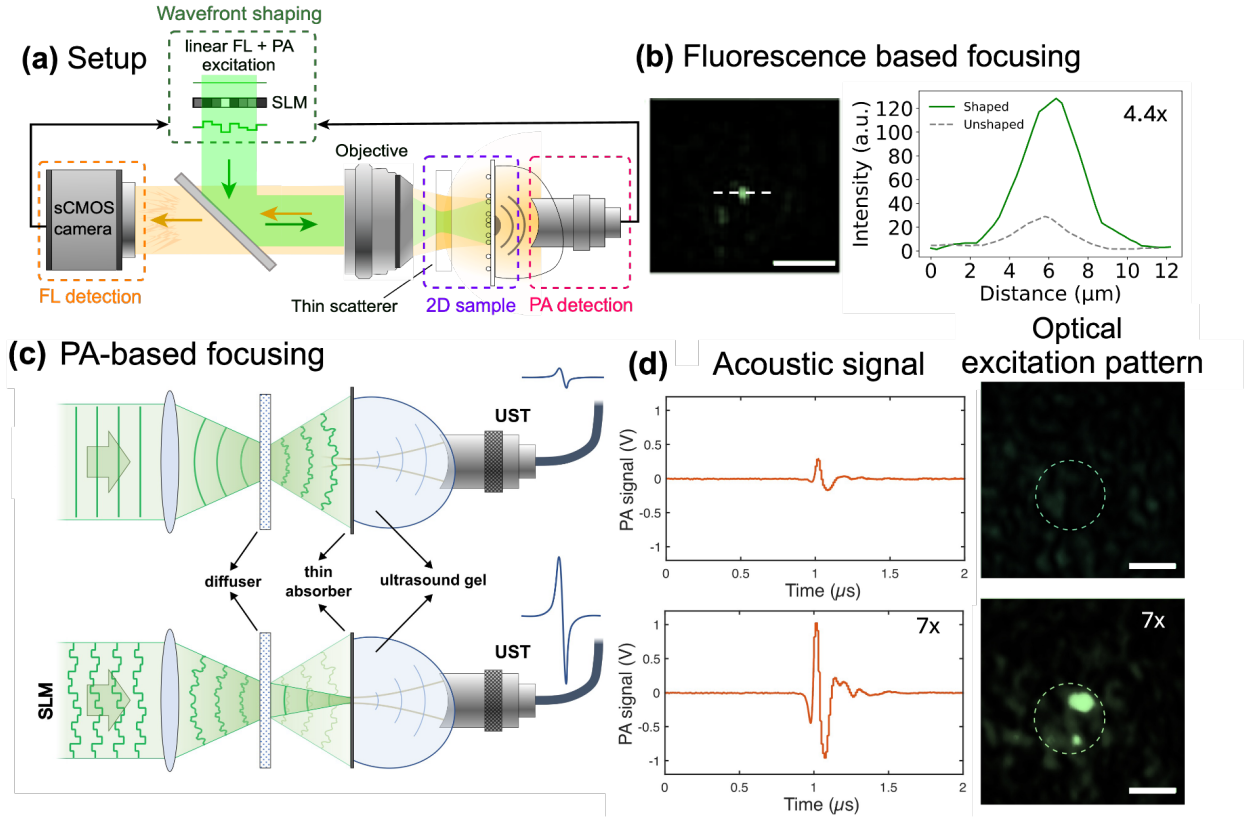


图 2. 多模态实验系统及散射介质中的单模态波前整形。 (a) 光声-荧光（PA-FL）混合系统示意图。单束脉冲激光束（532 nm）经空间光调制器（SLM）调制以进行波前整形，随后穿过薄散射层照射到含有吸收体和荧光团的二维样品上。荧光发射通过 sCMOS 相机以落射方式采集，而光声（PA）信号则由置于样品后的超声换能器（UST）记录。(b) 基于荧光的聚焦。左：基于荧光的波前整形后，经散射层获取的激发图样显示光收敛至明亮的衍射极限焦点。比例尺： 20 μm。右：整形前后的信号线剖面。(c) 基于光声的聚焦。上：示意图展示薄光学吸收体经扩散片产生的光声反馈。下：未进行（上）和进行（下）波前整形时获得的声波波形与光学激发图样对比。(d) 光声信号与光学激发图样的代表性混合读出。优化后，光声波形振幅增加约 7×，相应的激发强度局限于换能器焦区（虚线圆圈）内。比例尺：200 μm。

空间光调制器（SLM）生成相位全息图以调制激发波前。透镜傅里叶平面上的空间滤波器（孔径）选出一级衍射级，随后将其重新准直并成像至10× 显微物镜的后焦平面。物镜将调制后的光束聚焦至一个二维样品上；该样品由单层分布的吸收微珠和/或荧光微珠组成。物镜与样品之间插入不同的散射介质，以模拟不同程度的光散射。

样品在脉冲式 532 nm 光束照射下，同时产生荧光发射和光声波。通过同一物镜以反射式探测几何采集荧光信号，并成像到相机上。荧光发射与

激发光束通过长通二向色镜和带通滤光片进行光谱分离。样品后方的水浸耦合介质中放置了20 MHz聚焦超声换能器，用于探测光声信号。声信号经放大并数字化（详见方法部分）。

该配置可通过单束激发光同步采集光声与荧光反馈，确保两种信号之间精确的空间和时间配准。该装置可在三种模式下运行：第一，荧光反馈模式：相机记录的荧光强度用于引导迭代式 SLM 相位优化；第二，光声反馈模式：换能器的声学振幅提供基于光学吸收的粗略定位反馈；最后，混合反馈模式：同时记录两种信号，并将其组合为非线性双信号指标以进行自适应优化。这使我们能够对混合模式与单一模式开展公平的比较研究。

通过散射介质采集的原始信号示例如图 2d 和 2d 所示。未整形照明产生的荧光微弱且弥散，光声响应则宽而振幅较低。使用光声反馈进行波前整形后，光声振幅增加约 7 倍（图 2d），其时间波形呈现出清晰的单峰特征，对应于目标平面上的聚焦吸收。同样，荧光优化在背景之上形成了强度增强 4.4 倍的局部激发光斑（图 2b）。这些测量定量证实，两种成像模态均能为通过散射层实现光聚焦提供强大且独立的反馈。

总体而言，这表明我们的单平台系统利用共享激发光束，能够同时采集穿过散射介质的共配准光声信号和荧光信号。这为评估非线性混合反馈如何增强聚焦稳定性（第 3 节），以及展示光声引导聚焦如何支持高分辨率荧光成像（第 4 节），奠定了坚实的实验基础。

3. 非线性双信号反馈实现稳健聚焦

数值模拟首先比较了纯荧光反馈策略与混合反馈策略的性能（图 3a 和 3b）。基于强度方差进行纯荧光优化时，聚焦对初始条件高度敏感，且常常会在视野中的任意微球上形成焦点，

这些焦点往往偏离换能器的位置（图 3b）。仅使用光声反馈会将焦点限制在声学衍射极限所限定的区域内。相比之下，结合荧光强度方差与光声峰峰值信号的非线性混合指标，通过将基于光声的粗略定位与基于荧光的精细调节相结合，克服了这些限制（图 3a）。

在建立了用于同步配准采集光声（PA）和荧光（FL）信号的实验平台后，我们进一步评估了非线性混合反馈如何增强散射介质中的光学聚焦。我们的目标是确定将 PA 和 FL 信号结合为单一优化指标，能否提升聚焦效率和稳健性，尤其是在散射或噪声水平较高、单独使用一种模态无法实现聚焦的情况下。

补充图2总结了混合反馈所采用的优化流程。简而言之，我们采用哈达玛基调制方案，高效探索空间光调制器相位空间。依次将每个哈达玛模式投射到空间光调制器上，并施加离散相位步进以测量系统响应。对于每种模式，我们同时记录光声波形和荧光图像：在 100 ms 采集窗口内采集三条光声信号，并在相同曝光时段内采集荧光帧。光声反馈以其峰峰值声学振幅量化，而荧光反馈则以强度方差表征，该方差对明亮焦斑的形成十分敏感。通过非线性加权函数组合两种归一化信号，平衡光声粗略定位能力与荧光灵敏度（混合指标）。将使综合指标达到最大的相位应用于累积空间光调制器映射，并重复此过程直至收敛，通常在 70-80 次迭代内完成。

实验结果证实了这些发现（图 3c）。基于混合指标的聚焦有效地界定了用于荧光精细优化的感兴趣区域。在这个由光声信号界定的区域内，荧光优化将激发场集中到一个边界清晰的光学焦点。图 3c 展示了优化随时间的变化过程，整体混合指标在连续迭代中单调增长。指标稳步上升表明系统实现了协同收敛：光声信号稳定焦点位置，而荧光响应则进一步提高其空间精度。模拟和实验均表明，结合光声与荧光反馈，能够显著提升散射介质中光学聚焦的精度和稳定性。

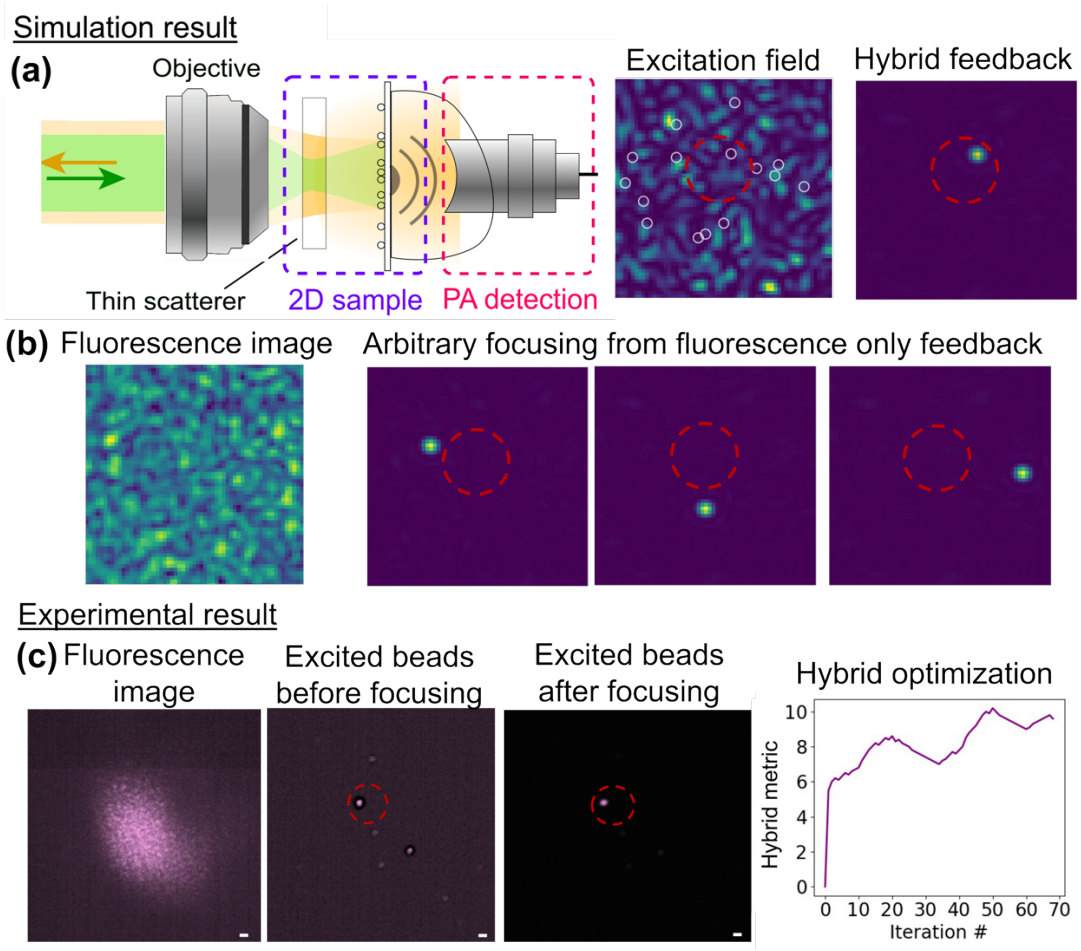


图 3. 混合式荧光-光声引导波前整形实现空间定向聚焦。(a) 混合系统的概念示意图：光穿过薄散射介质后照射二维样品（激发场图像中的白色圆圈表示荧光微珠）。荧光提供全局反馈信号，而由换能器灵敏区域（红色虚线圆圈）界定的光声检测则为空间定向优化提供引导。(b) 使用纯荧光指标（例如强度方差）进行优化虽能增强信号，但无法保证信号定位于预定义目标区域（红色虚线圆圈），因此会在任意位置产生随机聚焦。(c) 实验结果：光声引导优化能够持续在换能器检测区域（红色虚线圆圈）内，通过散射介质（5°漫射片）形成局部光学焦点。优化曲线（右）显示混合指标随迭代逐渐收敛。（比例尺：20 μm）。

混合指标既能通过光声通道提供局域引导，又能借助荧光实现光学尺度精细优化，从而在严苛条件下实现更紧密的局域聚焦。这一能力为下一阶段实验奠定了基础：实验将利用相同的光声引导聚焦策略来产生荧光信号，以用于下文所述的散射介质中计算式高分辨率成像。

4. 光声引导通过散射介质进行荧光成像的引导式波前整形

基于混合反馈所展现出的稳健聚焦性能，我们接下来研究了光声引导波前整形如何增强散射介质中的荧光成像。其核心概念是，光声反馈能够提供粗略定位和能量限制，而由迭代优化过程中同一激发所产生的增强激发，进而形成的增强局域荧光信号

则可用于在光声定义的区域内进行计算高分辨率重建。

该光声引导荧光成像方案的工作流程总结于补充图3。优化过程再次采用哈达玛基相位调制序列，但此处仅以光声信号作为反馈指标。对于每种哈达玛模式，均将相应的相位图案显示在空间光调制器上，并在 100 ms 内记录光声响应，以计算其峰峰值振幅。选取产生最大光声振幅的相位，并将其累加到累积空间光调制器相位图中。优化收敛后，在采集荧光图像序列期间保持优化后的相位图案，该图案代表光声定义的焦点。随后，通过稳健的计算重建算法[39] 处理荧光数据，该算法基于主成分分析（PCA）、非负矩阵分解（NMF）、互相关和反卷积，从而恢复感兴趣区域内的空间荧光分布。

光声引导波前整形前后采集的荧光图像显示，空间分辨率和定位能力均得到显著提升。在模拟中，我们可以探索多种条件，比较未整形照明和整形照明下的图像重建质量。与光声增强照明相比，未采用光声增强照明时，图像质量较差且不确定性更高（图4a）。相反，迭代式光声引导整形逐步实现激发定位，从而能够准确重建单个荧光吸收体。在实验中，光声引导波前整形将荧光限制在定位良好的焦斑内，该焦斑与声学检测区域重合（图4b-d）。以荧光吸收性微珠靶标为对象，利用迭代光声聚焦过程中采集的相位调制荧光信号进行荧光重建。结果表明，即使散射复杂度不断增加，仍可实现稳健的定位与重建；测试介质包括扩散片、封口膜和离体脑组织。这凸显了光声引导技术从强散射介质深处提取空间分辨荧光信息的能力。值得注意的是，我们通过厚度为 300 μm 的离体脑切片实现了高分辨率荧光图像重建；在 532 nm 波长下，这相当于约 5–6 个光学散射长度，远超传统宽场荧光显微镜能够保持空间保真度的 ~1-2 个散射长度。

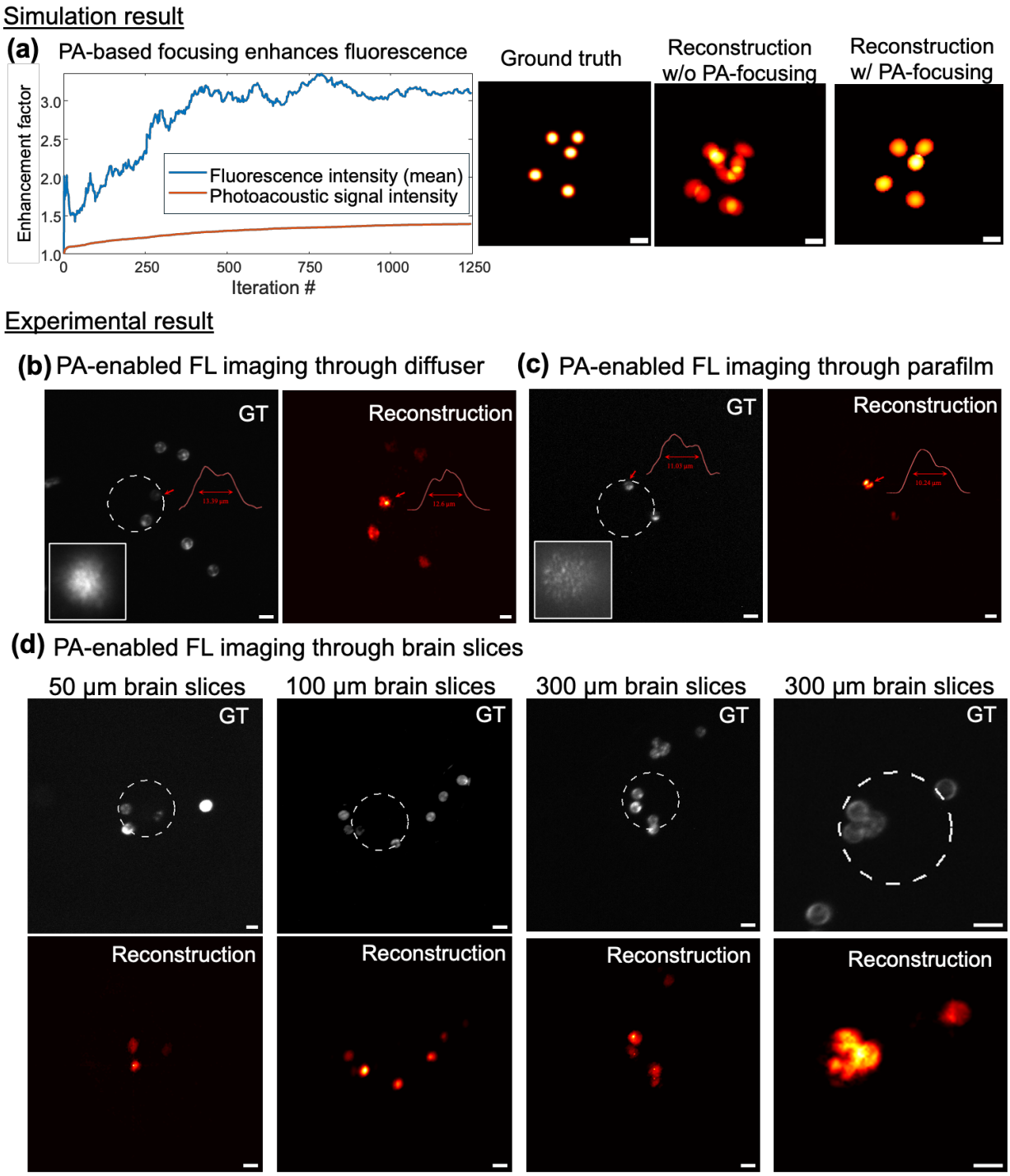


图 4. 光声引导下穿过散射介质的荧光重建。 (a) 在迭代光声 (PA) 聚焦过程中采集相位调制荧光信号，并据此重建荧光靶标的模拟结果。光声引导优化逐步增强激发的空间约束，从而实现比无引导照明更准确的重建。(b-c) 光声辅助荧光（FL）成像穿过散射层的实验结果，其中 (b) 使用 5°漫射片，(c) 使用单层封口膜。图中展示了真实值 (GT) 图像及相应的光声引导重建结果，表明成功恢复了光声检测区域（虚线圆圈）内的荧光靶标。(d) 实验结果。光声辅助 FL 成像穿过不同厚度（50 μm、100 μm 和 300 μm）的生物组织（离体脑切片）。尽管光散射强烈，光声引导聚焦仍能重建嵌入式靶标，但成像效果随组织厚度增加而逐渐下降。荧光靶标由 ~10 μm 的吸收微珠构成，这些微珠也会发出荧光。所有比例尺均表示 20 μm。

这些结果证实了该方法的优势：光声反馈充当引导信号，确定粗略的激发区域，而荧光信号则编码该区域内的精细空间细节。这种组合有效融合了两种成像模态的互补优势：声波在散射组织中的定位能力与荧光的高空间精度。此外，由于在光声引导优化过程中被动采集荧光信号，因此无需额外的对准或激发路径，同一光学配置即可同时支持聚焦和成像。重要的是，该方法不仅限于直接增强荧光，还能够实现通过散射组织的计算荧光成像。

讨论

生物组织中的光学成像仍受到光散射所造成的深度-分辨率权衡的根本限制。尽管光声（PA）成像和荧光（FL）成像分别解决了这一问题的一方面——深度穿透或空间分辨率——但单独使用任何一种成像模态都无法克服这两项限制。弥合这一差距对于推动完整生物组织中的高分辨率成像至关重要，因为在散射组织深处可视化细胞和分子过程仍然是生物医学领域面临的关键挑战。

在此，我们展示了一种双模态光声-荧光（PA-FL）成像策略，在双模态引导波前整形和增强计算成像框架中融合了两种成像模态的优势。我们的结果确立了两项关键进展。首先，我们证明，PA-FL协同引导波前整形能够在存在扩散片的多重散射环境中实现可靠聚焦。非线性双信号反馈指标能够补偿信号退化，并且与单模态反馈方法相比，可提升可控高分辨率定位能力。其次，我们展示了光声增强荧光成像：其中，光声引导波前整形在深处确定一个粗略的感兴趣区域，同时利用过程中产生的荧光信号进行稳健的计算重建，其成像深度可超过 5–6 个散射长度，而传统宽场荧光显微镜的成像深度仅为 1–2 个散射长度。这种配置将深度靶向与光学尺度成像自然结合起来，为在以往荧光方法无法触及的场景中实现高分辨率光学成像提供了一种新方法。

与先前的单模态反馈系统相比，我们的方法在稳定性和设计灵活性方面均实现了显著飞跃。仅光声反馈可提供深层但粗略的控制，受限于声学分辨率和信号灵敏度。仅荧光反馈可实现精细

聚焦，但在浑浊介质中信号强度会迅速下降。通过非线性地整合这些反馈通道，我们的双模态方案利用了它们互补的信息内容：光声确定粗略定位，荧光细化焦点，从而提升聚焦保真度、对噪声的稳健性以及成像对比度。除其直接的技术影响外，这一概念建立了多模态反馈整合的通用框架，为未来结合光学、声学或非线性对比度机制以透过复杂介质进行成像的系统奠定了基础。

尽管取得了这些进展，仍存在若干局限。目前的演示是在受控的实验室环境中进行的，使用的是散射仿体或离体组织，而非体内环境。要将其应用于活体生物系统，还需要提高信噪比和时间稳定性，并且很可能需要转向更长的红外波长。波前整形目前需要迭代进行，这限制了成像速度（每次迭代需数秒），仍不足以捕捉动态生物过程或活体组织运动。此外，更深层或异质性更强的组织可能会加剧散射和声衰减，因此需要更灵敏的探测器和自适应算法。在保持聚焦所需反馈的同时管理光功率沉积，对于将该技术应用于更复杂的生物医学应用也至关重要。最后，目前的实现仅限于二维聚焦；将这一方法扩展至体积成像和时间分辨成像，是迈向实用生物医学应用的重要一步。

展望未来，若干途径有望显著提升这一双模态范式的影响力。通过硬件改进（例如高速空间光调制器[44]，声光偏转器[45]）和算法创新（例如基于深度学习的相位预测[1,2]）加速波前优化，或可实现实时运行。将该方法与光开关荧光团[46]，非线性光学探针或基因编码传感器相结合，有望提高分子特异性和功能成像能力。此外，拓展至三维多模态成像，并有可能整合拉曼散射或光学相干等其他对比机制，可在考虑其他化学或物理信息的基础上，全面表征深层组织的结构与功能。最终，将这一双模态框架与体内模型及临床成像系统相结合，有望为观察完整组织中的细胞动力学和疾病进展开辟新的前沿。

总之，本研究建立了一类新型多模态光学成像，通过在单一的

非线性反馈架构中融合光声与荧光成像模态，跨越了深度-分辨率屏障。该方法利用两者互补的物理对比度，实现了兼具光学精度的深度靶向，并在散射条件下保持稳健性能。随着硬件和计算方法不断进步，这一框架有望改变深层组织光学成像，使人们能够跨尺度详细、高分辨率地观察复杂的生物结构和过程。

方法

实验装置。 波长为 532 nm 的纳秒脉冲激光器（CryLas eMOPA-532；脉冲能量为 0.5 mJ，重复频率为 400 Hz）为两种成像模态提供共同的激发源。其高脉冲能量和较长的相干长度（~300 mm）适用于非聚焦光声生成和全息相位调制。该激光光源还可用于荧光激发。激光输出经望远镜扩束，并通过半波片和偏振分束器调节功率。光束由二向色镜合束，再经望远镜扩束，使光束覆盖液晶硅基空间光调制器（SLM；Meadowlark HSP1920-500-1200-HSP8，见补充信息图1）的整个显示面。

数值模拟。 我们通过数值模拟，在受控散射条件下评估所提出的光声引导波前整形方法。相干平面波经纯相位空间光调制器调制后，穿过模拟散射介质，在目标平面生成散斑照明图案。散斑场同时激发光声信号（用作波前优化的反馈）和荧光发射，后者由虚拟相机记录。光声检测通过空间局域的声学响应进行建模，该响应对应于超声换能器的焦区。波前优化通过依次调制正交输入模式的相位来完成，并为每种模式选取使光声信号最大的最佳相位。荧光图像形成的模拟假设荧光发射与激发强度成正比，并采用基于卷积的方法对散射诱导的模糊进行建模。更多实现流程见补充信息图4。

计算荧光图像重建算法。在 SLM 优化过程中，通过迭代散斑照明采集的图像序列，基于经过少量定制的鲁棒非负主矩阵分解（RNP）[39]进行重建。首先对每帧原始图像进行滤波，再通过主成分分析将其分解为低秩背景分量和稀疏特征分量，从而有效抑制静态背景

荧光并增强随时间波动的散斑特征。将所有帧中提取的稀疏特征图像组成数据矩阵，并使用非负矩阵分解（NMF）处理，以将空间发射体相关分量与其时间调制分离。分解后，对恢复的发射体分量应用成对反卷积，以估算其相对空间间距。最终根据这些相对距离估计，将所有发射体组合起来重建图像。该框架能够为低对比度样本提供稳健、稳定的重建效果，并且非常适用于深层散射环境中由扩散片旋转或 SLM 优化产生的固有强度波动。

波前整形算法。波前整形采用空间光调制器（SLM）的方形有效区域实现，该区域被划分为大小均匀的宏像素。每个宏像素由 16 × 16 或 8 × 8 个 SLM 原生像素组成，决定了波前控制的空间分辨率。采用正交哈达玛基高效调制宏像素的相位。每个哈达玛模式依次在傅里叶域中寻址，并通过相位步进过程进行调制，包含 4 至 8 个离散相位步进，覆盖完整的 0 至 2π 相位周期。在每个相位步进处记录相应的反馈信号。评估了两种优化指标。在光声（PA）指标中，反馈定义为相位步进周期内光声信号的峰谷振幅。在混合指标中，反馈定义为光声峰谷振幅与相应荧光信号方差的乘积，从而同时考虑声学聚焦效率和荧光调制。对于每个哈达玛模式，保留使所选反馈指标达到最大值的相位值。对所有模式重复这一过程，以构建优化波前。

致谢

我们谨此感谢　　陈·扎克伯格倡议（深层组织成像资助编号：2020-225346 和 2024-337799）

参考文献

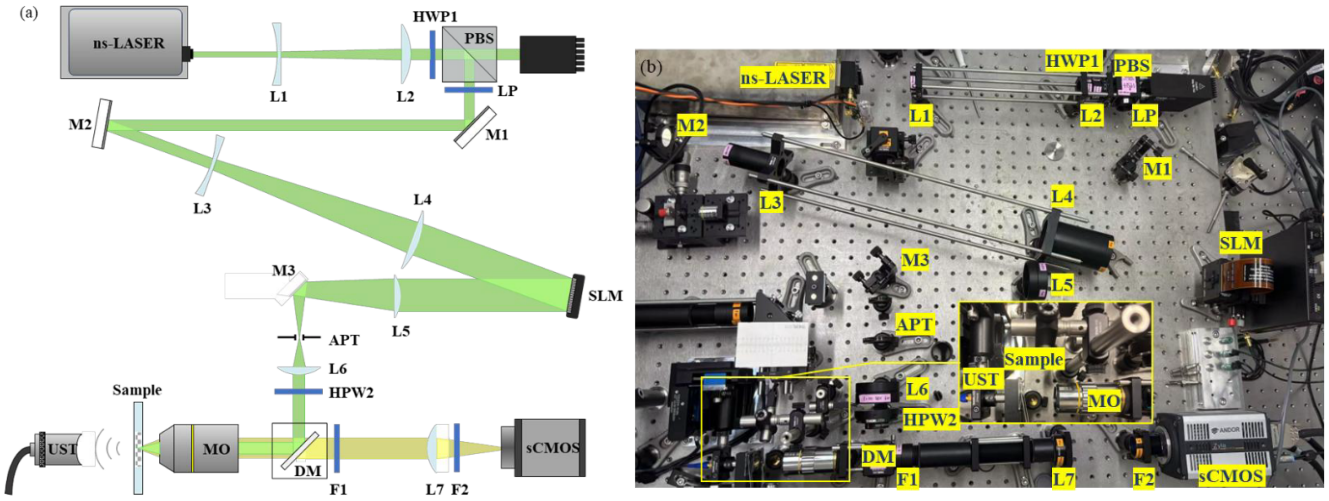
1. Gigan, S. 等 复杂介质中波前整形与深层成像路线图。《物理学杂志：光子学》**4**, 042501 (2022). 2. Xia, F. 等 超越表层的神经光子学：利用光散射揭示脑的复杂性。神经光子学**11**, S11510–S11510 (2024). 3. Horstmeyer, R., Ruan, H. & Yang, C. 导星辅助波前整形方法：将光聚焦到生物组织中。《自然·光子学》**9**, 563–571 (2015). 4. Gigan, S. 光学显微镜瞄准深层成像。《自然·光子学》**11**, 14–16 (2017). 5. Wang, X. 等 用于脑结构和功能体内成像的无创激光诱导光声断层成像。*Nat. Biotechnol.* **21**, 803–806 (2003). 6. Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G. & Wang, L. V. 用于高分辨率、无创体内成像的功能性光声显微成像。*Nat. Biotechnol.* **24**, 848–851 (2006). 7. Wang, L. V. & Hu, S. 光声断层成像：从细胞器到器官的体内成像。《科学》**335**, 1458–1462 (2012). 8. Yao, J. & Wang, L. V. 光声显微镜。*Laser Photonics Rev.* **7**, 758–778 (2013). 9. Wang, L. V. & Yao, J. 生命科学领域光声断层成像实用指南。*Nat. Methods* **13**, 627–638 (2016). 10. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. 双光子激光扫描荧光显微术。《科学》**248**, 73–76 (1990). 11. Nie, S., Chiu, D. T. & Zare, R. N. 用共聚焦荧光显微镜探测单个分子。《科学》**266**, 1018–1021 (1994). 12. Lichtman, J. W. & Conchello, J.-A. 荧光显微镜。*Nat. Methods* **2**, 910–919 (2005). 13. Horton, N. G. 等 完整小鼠脑皮层下结构的体内三光子显微成像。《自然·光子学》**7**, 205–209 (2013). 14. Ntziachristos, V. & Razansky, D. 多光谱光声断层成像（MSOT）分子成像。*Chem. Rev.* **110**, 2783–2794 (2010). 15. Taruttis, A. & Ntziachristos, V. 实时多光谱光声成像的进展及其应用。《自然·光子学》**9**, 219–227 (2015). 16. Booth, M. J. & Patton, B. R. 荧光显微镜的自适应光学。荧光显微镜：超分辨率及其他新技术 33 (2014). doi:10.1016/B978-0-12- 409513-7.00002-6. 17. Antonello, J. 显微成像中的基于优化的无波前传感器自适应光学。18. Booth, M. J. 显微镜中的自适应光学。*Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **365**, 2829 2843 2007– ( )。

19. Gould, T. J., Burke, D., Bewersdorf, J. & Booth, M. J. 自适应光学使像差样本中的三维受激发射损耗显微术成为可能。*Opt. Express* **20**, 20998–21009 (2012). 20. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. 双光子激光扫描荧光显微术。*Science* **248**, 73–76 (1990). 21. Kobat, D. *et al.* 使用长波长激发的深层组织多光子显微术。*Opt. Express* **17**, 13354–13354 (2009). 22. Horton, N. G. *et al.* 完整小鼠脑皮层下结构的体内三光子显微术。*Nat. Photonics* **7**, 205–205 (2013). 23. Thendiyammal, A., Osnabrugge, G., Knop, T. & Vellekoop, I. M. 基于模型的波前整形显微术。*Opt. Lett.* **45**, 5101 (2020). 24. Popoff, S. M. *et al.* 光学中的传输矩阵测量：研究和控制无序介质中光传播的方法。*Phys. Rev. Lett.* **104**, (2010). 25. Andreoli, D. *et al.* 通过多光谱传输矩阵确定性地控制宽带光穿过多重散射介质。*Sci. Rep.* **5**, (2015). 26. Mounaix, M., Defienne, H. & Gigan, S. 采用时间分辨传输矩阵方法，在多重散射介质中实现时空确定性光聚焦。*Phys. Rev. A* **94**, (2016). 27. Boniface, A., Dong, J. & Gigan, S. 利用基于荧光的传输矩阵，在散射介质中实现非侵入式聚焦与成像。*Nat. Commun.* **11**, (2020). 28. Chaigne, T., Gateau, J., Katz, O., Gigan, S. & Bossy, E. 浑浊介质中的光声辅助波前整形，以及利用光相干特性改进光声成像。载于*Optics InfoBase*会议论文 1–1 (2016). doi:10.1364/OTS.2016.OTu2A.2. 29. Inzunza-Ibarra, M. A., Premillieu, E., Grünsteidl, C., Piestun, R. & Murray, T. W. 利用光声涨落引导波前整形，实现散射介质中的亚声学分辨率光学聚焦。*Opt. Express* **28**, 9823 (2020). 30. Sun, J. *et al.* 高信噪比光声波前整形：实现光穿过散射介质的聚焦。*Sci. Rep.* **9**, 4328 (2019). 31. Xia, F., Leite, I., Prevedel, R. & Chaigne, T. 利用光声反馈在深层组织中进行光学波前整形。*J. Phys. Photonics* **6**, 043005 (2024). 32. Chaigne, T., Gateau, J., Katz, O., Bossy, E. & Gigan, S. 利用超声阵列和光声传输矩阵，实现光穿过散射介质的聚焦与二维成像。*Opt. Lett.* **39**, 2664 (2014). 33. Vellekoop, I. M. & Mosk, A. P. 使相干光聚焦穿过不透明强散射介质。*Opt. Lett.* **32**, 2309–2311 (2007). 34. Akbulut, D., Huisman, T. J., Putten, E. G. van, Vos, W. L. & Mosk, A. P. 通过二进制振幅调制，使光聚焦穿过随机光子介质。*Opt. Express* **19**, 4017–4029 (2011).

35. Blochet, B., Bourdieu, L. & Gigan, S. 利用快速连续波前优化，使光聚焦穿过动态样品。*Opt. Lett.* **42**, 4994 (2017). 36. Boniface, A., Blochet, B., Dong, J. & Gigan, S. 利用散斑方差优化，在散射介质中实现无创光聚焦。*Optica* **6**, 1381–1385 (2019). 37. Moretti, C. & Gigan, S. 通过强散射组织读取荧光功能信号。*Nat. Photonics* **14**, 361–364 (2020). 38. Zhu, L. *et al.* 利用涨落随机照明，通过散射层进行大视场无创成像。*Nat. Commun.* **13**, 1447 (2022). 39. Gao, Z. *et al.* 利用稳健矩阵分解实现穿过散射介质的荧光显微成像。*Cell Rep. Methods* **5**, 101031 (2025). 40. Katz, O., Heidmann, P., Fink, M. & Gigan, S. 利用散斑相关，通过散射层及绕过拐角实现无创单次成像。*Nat. Photonics* **8**, 784–790 (2014). 41. Wu, T., Baek, Y., Xia, F., Gigan, S. & De Aguiar, H. B. 散射介质中的副本辅助超分辨荧光成像。*ACS Photonics* **12**, 1308–1315 (2025). 42. d'Arco, A., Xia, F., Boniface, A., Dong, J. & Gigan, S. 用于无创控制相干光在散射介质中传播的基于物理的神经网络。*Opt. Express* **30**, 30845 (2022). 43. Beaurepaire, E. & Mertz, J. 双光子显微术中的落射荧光采集。*Appl. Opt.* **41**, 5376–5382 (2002). 44. Rocha, J. C. A. *et al.* 使用微机电系统纯相位光调制器实现快速且高光效的波前整形。*Opt. Express* **32**, 43300 (2024). 45. Blochet, B., Akemann, W., Gigan, S. & Bourdieu, L. 利用多区块校正进行快速波前整形，实现双光子脑成像。*Proc. Natl. Acad. Sci.* **120**, e2305593120 (2023). 46. Deo, C. 光与声的桥梁：一种在荧光与光声信号之间实现高对比度光致开关的螺萘并吡喃-罗丹明二元体。

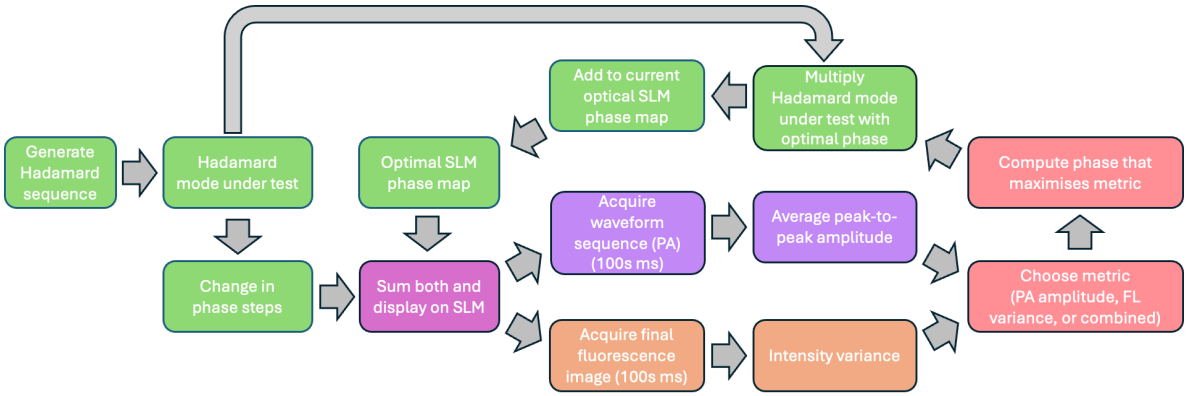
补充信息

补充图1



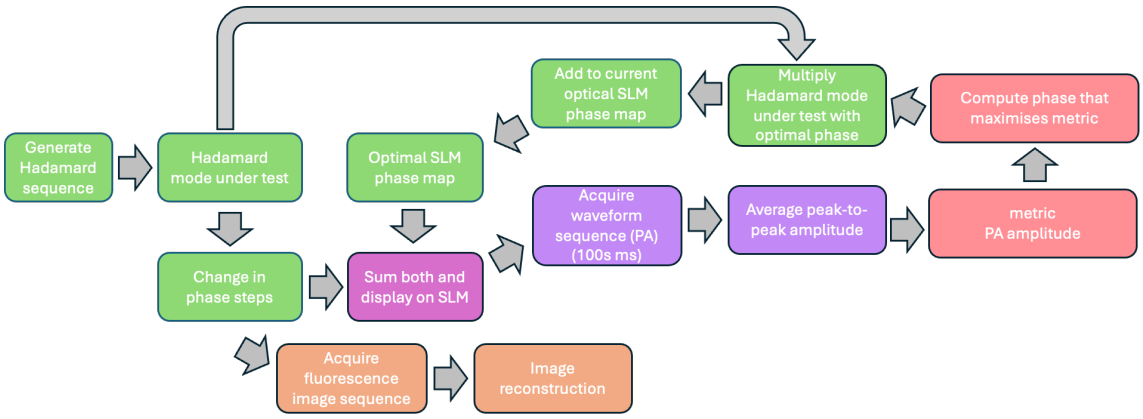
补充图*1*。**结合光声学与荧光模态的混合成像系统。a,** 完整光学系统示意图。**b、c,** 组装完成后的装置照片。激

补充图2



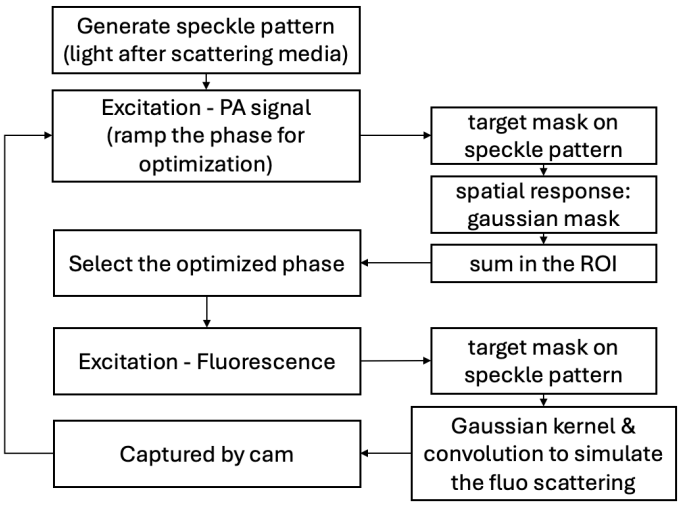
补充图*2*。结合光声学与荧光成像模态的混合波前整形流程图

补充图3



补充　图*3*。通过散射组织进行光声增强荧光成像的流程图

补充图4



补充图*4*。模拟流程图