



上皮组织的深度分辨非线性光谱成像技术

陈建新* 卓双木 罗天舒 罗 腾 陈煌林 严旭辉

(医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建师范大学, 福州 350007; 福建师范大学物理与
光电信息科技学院, 福州 350007)

摘要 基于多光子激发自体荧光和谐波信号的非线性光谱分辨成像技术, 将多光子显微镜和光谱测量技术的优点集于一身, 它可以同时获得组织内在成分的微结构和光谱特性. 利用 LSM 510 META 激光扫描显微镜系统和深度分辨非线性光谱成像技术, 对活体小鼠皮肤的微结构和光谱特性进行了研究. 实验结果表明, 深度非线性光谱分辨成像技术能够识别活体小鼠上皮组织的细胞层和基质层结构, 能够监测上皮细胞的 NADH、细胞内间质黄素蛋白、基质层的胶原蛋白、毛干中的角蛋白和黑色素等不同组织成分的发射光谱. 实验观察部位的小鼠皮肤的 HE 染色、胶原纤维和弹力纤维特殊染色的结果也证明了利用深度分辨非线性光谱成像技术获得结果的准确性. 随着微型、便捷的多光子显微镜系统的出现, 深度分辨非线性光谱成像技术能够对上皮肿瘤组织的早期直接、实时、客观、无损地探测、诊断和监测提供可能, 将在临床医学应用中具有重大意义和实用价值.

关键词 深度分辨光谱成像技术 二次谐波和双光子激发荧光 活体小鼠

据美国癌症协会报道, 上皮肿瘤的发病率占所有人类肿瘤疾病的 80% 以上, 每年还有近 100 万患有分层鳞状上皮细胞良性肿瘤病例发生^[1,2]. 虽然人类在肿瘤的诊断和治疗方面做了很多努力, 但是病人的存活率仍然很低. 最重要的原因是缺乏准确识别可能发展成为恶性肿瘤区域的早期无损诊断^[2]. 以谐波和多光子激发荧光作为信号源的多光子显微镜, 因其具有对组织微结构的高灵敏度和高空间分辨成像、对生物组织的低杀伤性和成像深度深等特点, 而在恶性肿瘤区域的早期无损诊断方面存在潜在的应用背景^[3~5]. 此外, 以飞秒激光与生物组织相互作用产生的谐波和多光子激发荧光等非线性光学效应为基础的光谱测量技术引起人们的关注, 因为在上皮肿瘤整个形成过程中, 除了组织形态不断发生相应的变化, 正常和肿瘤组织的发射光谱也存在明显的差别^[6~8]. 最近, 基于多光子激发自体荧光和谐波信号的非线性光谱分辨成像技术被发展起来, 它的优势在于可以同时获得组织内在成分的微结构和光谱特性,

收稿日期: 2007-05-20; 接受日期: 2007-08-29

国家自然科学基金(批准号: 60508017)、福建省自然科学基金计划项目(编号: 2007J0007, C0720001)和教育部新世纪优秀人才支持计划(编号: 2007)资助项目

* E-mail: chenjianxin@fjnu.edu.cn

将多光子显微镜和光谱测量技术的优点集于一身, 能够更全面地为生物组织生理和病理的临床早期无损诊断提供可行方法^[9,10]. 本文利用深度分辨非线性光谱成像技术对活体小鼠皮肤的微结构和光谱特性进行了研究, 证明了深度非线性光谱分辨成像技术可以用于识别活体上皮组织的层结构, 并监测不同组织成分的光谱强度, 此方法能够对上皮肿瘤组织的早期直接、实时、客观、无损地探测、诊断和监测提供可能.

1 材料和方法

实验用雄性昆明小白鼠 6 只(福建医科大学实验动物中心提供), 体重在 (30 ± 2) g. 2%戊巴比妥钠溶液 0.1 mL 腹腔注射麻醉, 用手术剪将小鼠腹背部毛剪净, 注意不能损伤皮肤. 棉球擦洗 3 次, 放置多光子激光共聚焦显微镜上进行观察, 每隔 1~2 h 对小鼠重复麻醉一次, 整个实验的持续时间大约为 4 h. 实验结束后, 切取观察部位小鼠皮肤, 4%甲醛溶液固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 行常规 HE 染色、胶原纤维和弹力纤维特殊染色, 并进行传统组织学的观察与分析.

实验装置与我们小组以前发表的文章中介绍的相同^[10], 简单的示意图(图 1).

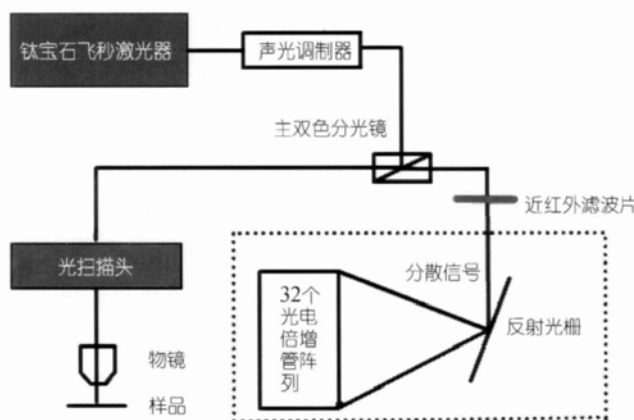


图 1 实验装置的示意图

美国相干公司的钛宝石飞秒激光器(110 fs, 76 Hz)作为激光共聚焦显微镜的激发光源. 此激光器的输出波长是可调谐的, 范围为 700~980 nm. 在本实验中使用的激光波长是 810 和 850 nm. 上皮组织的深度分辨非线性光谱成像的获得由德国蔡司公司生产的 LSM 510 META 激光扫描显微镜系统完成. 此系统的最大特点是配置了 META 探测器, 它是由高质量的反射光栅和 32 个通道的光电倍增管排列组成的. 每个光电倍增管覆盖的波长范围是 10.7 nm, 32 个光电倍增管覆盖了从 377~716 nm 大约 340 nm 波长范围的光谱. 飞秒激光与生物组织相互作用产生的二次谐波和双光子激发荧光信号经过光栅分光分别进入 32 个通道, 通过光电倍增管将光信号转变成电信号, 在一系列发射波长谱带处得到 x-y 成像, 所有成像的叠加构成了非线性光谱分辨成像图. 实验中使用的是放大倍率为 63 倍、数值孔径为 1.4 的油浸物镜, 获得的图像素都是由 512×512 像素组成, 每个像素获取的时间为 2.56 μ s. 飞秒激光入射到上皮组织表面的功率为 10 mW, 随着深度的增加, 由于生物组织的散射和折射效应的影响, 背向的二次谐波和双光子激发荧光信号变弱, 为了获得清晰的非线性光谱分辨成像, 激发光的功率随深度增加

而逐渐增大, 最高的功率大约为 25 mW. 在整个实验过程中, 没有光漂泊的现象发生.

2 实验结果与分析

图 2(a)给出了活体小鼠皮肤表面(0 μm)的非线性光谱成像图. 从图 2 中很容易分辨出小鼠的上皮细胞和毛干成分(图 2 中位置 1 和 2), 利用成像诱导的光谱分析方法, 图 2(b)给出了这两种结构的 377~716 nm 范围的光谱特性.

从图 2(b)中可以看到, 小鼠的毛干和呈多边形结构的上皮细胞的发射光谱的峰值分别在 511 和 490 nm. 毛干是由排列规则的角化上皮细胞组成, 细胞内充满角蛋白并含黑色素, 实验中观察到的光谱成像主要来自于角蛋白和黑色素的双光子激发自体荧光^[11,12]. 而呈多边形的上皮细胞中能够产生双光子激发自体荧光的成分主要是 NADH, 细胞核内没有可以产生双光子自体荧光的成分, 因此, 从非线性光谱分辨成像图中看到的每个细胞的细胞核呈现黑色(即无荧光产生)^[13]. 利用实验装置系统中的图像分析工具, 可以得到上皮细胞的面积为 $(864.22 \pm 75.44) \mu\text{m}^2$.

随着成像深度的增加, 获得的小鼠皮肤的结构也发生了变化. 图 3(a)给出了在 30 μm 深度处, 小鼠皮肤结构发生明显变化的非线性光谱成像图. 从图 3 中可以看到, 除了发射蓝色荧光的上皮细胞和毛干结构(图 2 中位置 1 和 2)外, 还有两种不同颜色和不同结构的成分. 图 3(b)给出了图 3(a)中呈现黄色和紫色结构(图 3 中位置 3 和 4)的光谱特性(因图 2 中位置 1 和 2 的发射光谱图与图 3(b)中的相同, 因此, 在图 3(b)中没有给出). 从光谱特性可以得出, 紫色结构是真皮中呈网状结构的胶原纤维, 它来自于胶原纤维的二次谐波信号, 对应的发射光谱是峰值在 405 nm 处的窄谱带(因实验中使用的激光激发波长为 810 nm), 而呈黄色荧光结构的发射光谱峰值为 555 nm, 对应着细胞内间质黄素蛋白成分. 从 30 μm 深度处小鼠皮肤结构的非线性光谱成像图的分析可以得到, 这一层是皮肤上皮细胞层和基质层的连接区域. 经过对 6 只雄性昆明小白鼠的大量实验与统计分析, 得到小鼠皮肤上皮细胞层的厚度大约为 $(31.23 \pm 1.90) \mu\text{m}$.

为了证明实验观察到的紫色结构确实来自于胶原纤维的二次谐波信号, 当成像深度进一步增加时, 实验中选择了 850 nm 的激发光波长. 图 4(a)给出了当成像深度增加到 40 μm 时, 活体小鼠皮肤的非线性光谱成像图, 从图 4(a)中可以看到出现了大面积的呈紫色的胶原纤维结构, 说明已经到了皮肤的基质层, 图 4(b)对应的发射光谱是峰值在 425 nm 处的窄谱带, 这也进一步说明了实验观察到的紫色结构的确来自于胶原纤维的二次谐波信号. 同时, 在图 4(a)也看到了深入到基质层的发射蓝色荧光的毛干, 图 4(b)对应的发射光谱与图 2(b)中毛干的相同, 即它们均来自于毛干内的角蛋白和黑色素的双光子激发自体荧光.

为了进一步验证非线性光谱分辨成像技术给出的活体小鼠皮肤层结构的准确性, 实验结束后, 切取观察部位小鼠皮肤、4%甲醛溶液固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片、行常规 HE 染色及胶原纤维、弹力纤维特殊染色. 图 5(a)~(c)分别给出了传统组织学的切片染色图.

从 HE 染色的切片和图 5(a)左下角上皮细胞层的局部放大可以看到, 小鼠皮肤的上皮由单层的呈多边形结构的上皮细胞组成, 通过对胶原纤维特殊染色切片分析可以得到, 小鼠皮肤的基质层主要由大量的胶原纤维构成, 这些与非线性光谱分辨成像技术给出的结果是一致的. 虽然在 HE 染色切片的基质层中也观察到了少量的、分布分散的纤维原细胞和在弹力纤维特殊染色切片中观察到极少量的弹力纤维, 由于这些成分含量少而且分布分散, 导致其双光子激发荧光信号较弱, 无法观察到其非线性光谱分辨成像.

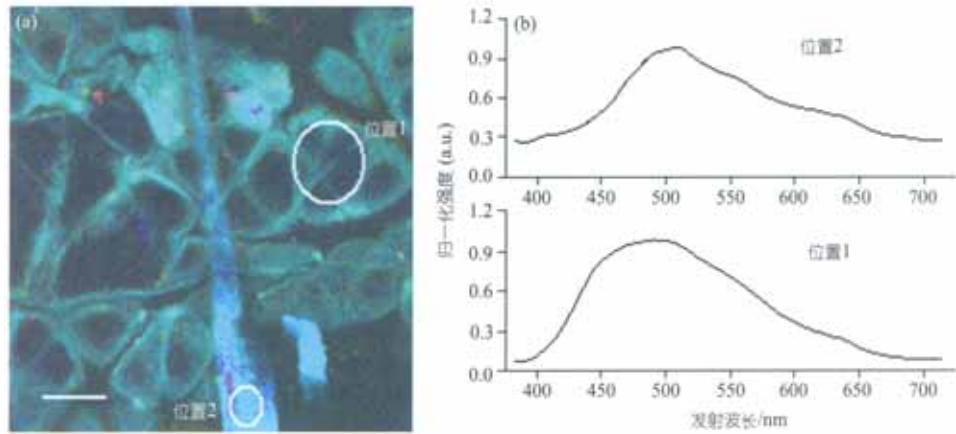


图2 活体小鼠皮肤表面(0 μm)的非线性光谱成像

(a) 非线性光谱成像图; (b) 图1(a)中位置1和2对应的小鼠上皮细胞和毛干成分的发射光谱. 标尺的长度为20 μm

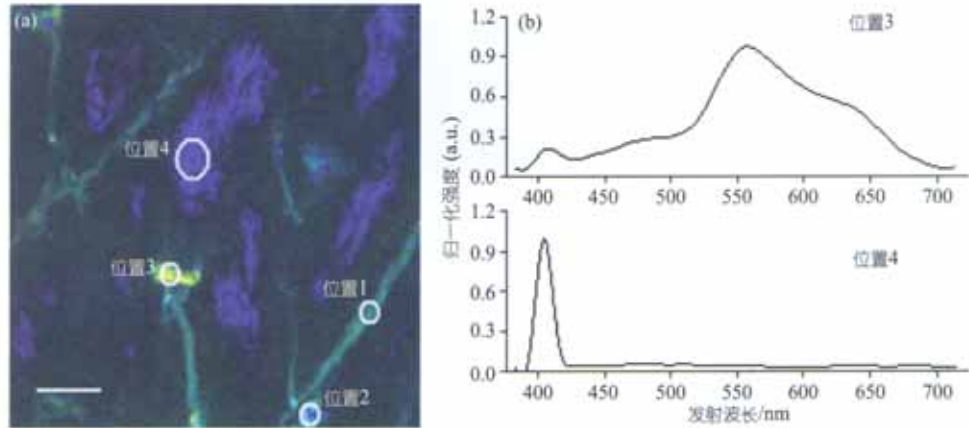


图3 在30 μm 深度处, 活体小鼠皮肤的非线性光谱成像

(a) 非线性光谱成像图; (b) 图3(a)中位置3和4对应的胶原纤维和黄素蛋白成分的发射光谱. 标尺的长度为20 μm

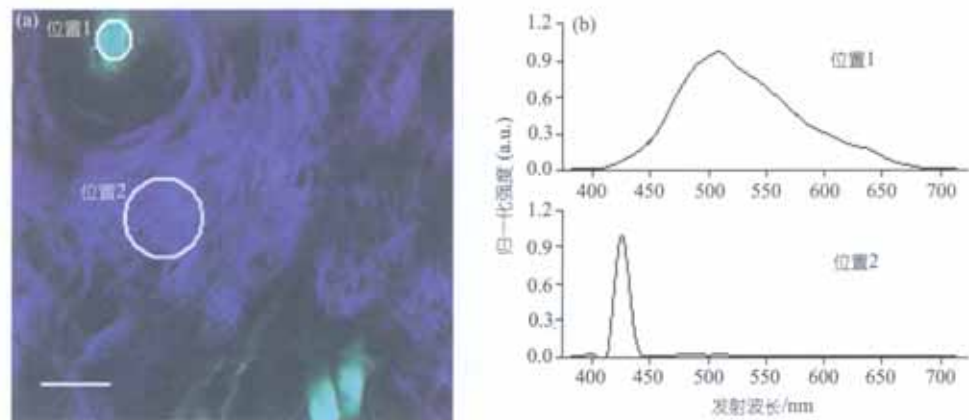


图4 在40 μm 深度处, 活体小鼠皮肤的非线性光谱成像

(a) 非线性光谱成像图; (b) 图4(a)中位置1和2对应的毛干和胶原纤维成分的发射光谱. 标尺的长度为20 μm

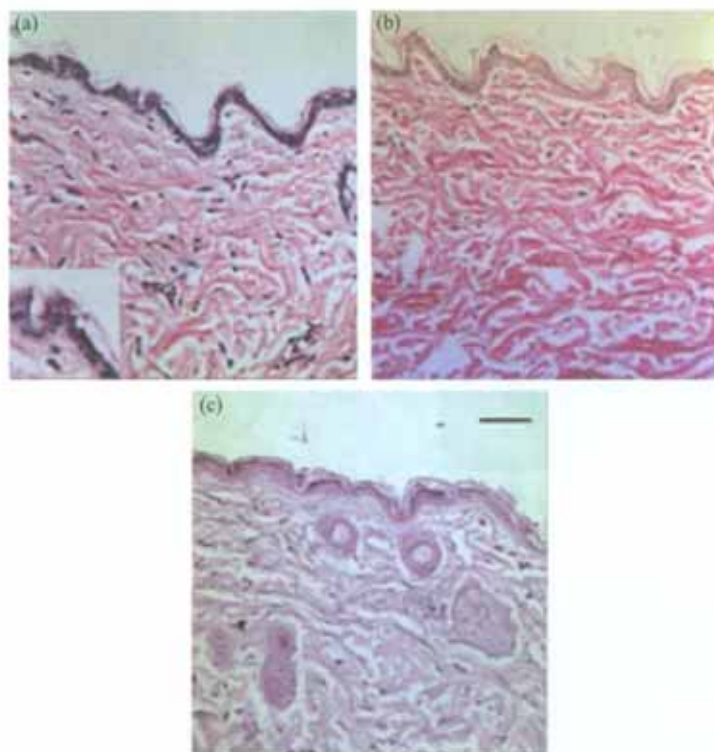


图 5 小鼠皮肤的组织切片染色

(a) HE 染色, 左下角为上皮细胞层的局部放大; (b) VG 染色, 胶原纤维特殊染色; (c) Aldehyde-Fuchsin 染色, 弹力纤维特殊染色. 标尺的长度为 20 μm

3 结论

利用深度分辨非线性光谱成像技术对活体小鼠皮肤的微结构和光谱特性进行了研究, 实验结果表明, 深度非线性光谱分辨成像技术能够识别活体小鼠上皮组织的细胞层和基质层结构, 能够监测上皮细胞的 NADH、细胞内间质黄素蛋白、基质层的胶原蛋白、毛干中的角蛋白和黑色素等不同组织成分的光谱强度. 实验观察部位的小鼠皮肤的 HE 染色、胶原纤维和弹力纤维特殊染色的结果也证明了利用深度分辨非线性光谱成像技术获得结果的准确性.

具有分层结构的上皮组织的结构一般由角质上皮层、上皮细胞层、基底膜和下面的基质层构成. 肿瘤细胞起源于基底膜附近, 以很快的速度向上皮细胞层扩散, 最终占据整个上皮组织并穿过基底膜侵蚀基质层. 在上皮肿瘤的形成过程中, 上皮细胞核的大小和密度、上皮细胞的新陈代谢、角质层和上皮层的厚度、基质层胶原纤维的密度等都会不断发生相应的变化^[14~16]. 本文给出的深度分辨非线性光谱成像技术基于组织内在成分的二次谐波和双光子激发荧光效应, 它不需要对组织进行切除、固定和染色等处理, 就能够给出组织内在成分的微结构和光谱特性, 因此, 能更全面的为生物组织生理和病理的临床早期无损诊断提供可行方法. 随着微型、便捷的多光子显微系统的出现, 该技术在临床医学应用中具有重大意义和实用价值.

致谢 感谢福建医科大学附属第一医院整形(美容)外科熊舒原主任和曹宁同学的有益讨论.

参 考 文 献

- 1 American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2005, Atlanta: American Cancer Society. 2005
- 2 American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. Atlanta (GA): American Cancer Society. 2003
- 3 Bird D, Gu M. Two-photon fluorescence endoscopy with a micro-optic scanning head. *Opt Lett*, 2003, 28:1552—1554
- 4 Jung J C, Schnitzer M J. Multiphoton endoscopy. *Opt Lett*, 2003, 28: 902—904
- 5 Ouzounov D G, Moll K D, Foster M A, et al. Delivery of nanojoule femtosecond pulses through large-core microstructured fibers. *Opt Lett*, 2002, 27: 1513—1515
- 6 Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, 2000, 2: 89—117
- 7 Wu Y, Xi P, Qu J Y. Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue. *Opt Express*, 2005, 13: 382—388
- 8 Chang S K, Follen M, Malpica A, et al. Optimal excitation wavelengths for discrimination of cervical neoplasia. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2002, 49: 1102—1110
- 9 Palero J, Bruijn H, Heuvel A, et al. In vivo nonlinear spectral imaging in mouse skin. *Opt Express*, 2006, 14: 4395—4402
- 10 Zhuo S M, Chen J X, Luo T S, et al. Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multichannel mode and lambda mode. *Opt Express*, 2006, 14: 7810—7820
- 11 Campagnola P J, Millard A C, Terasaki M, et al. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys J*, 2002, 81: 493—508
- 12 Laiho L H, Pelet S, Hancewicz T M, et al. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J Biomed Opt*, 2005, 10: 0240161
- 13 Zipfel W R, Williams R M, Christie R, et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7075—7080
- 14 Georgakoudi I, Jacobson B C, Muller M G, et al. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res*, 2002, 62: 682—687
- 15 Skala M C, Squirrell J M, Vrotsos K M, et al. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues. *Cancer Res*, 2005, 65: 1180—1186
- 16 Wilder-Smith P, Osann K, Hanna N, et al. In vivo multiphoton fluorescence imaging: a novel approach to oral malignancy. *Las Surg Med*, 2004, 35: 96—103