

文章编号:1001-5078(2007)09-0828-04

兔子食道组织基质层的高对比度多光子显微成像

邹定嵩,卓双木,陈建新,郭阿彬,傅金地

(医学光电科学与技术教育部重点实验室,福建师范大学,福建 福州 350007)

摘要:利用 LSM 510 META 激光扫描共聚焦显微成像系统,提出了一种能够获得胶原蛋白和弹性蛋白高对比度成像的双通道连续探测成像技术,并应用于食道基质层中的胶原蛋白和弹性蛋白的成像研究。实验结果表明,两个独立通道的使用显著地提高了胶原蛋白和弹性蛋白成像的对比度。由于成像过程中收集的二次谐波和双光子激发荧光信号均是背向,为双通道连续探测成像技术有望推广到病理诊断等临床应用中提供了可能。

关键词:激光技术;高对比度成像;食道组织

中图分类号:R318.51

文献标识码:A

High-contrast Mutiphoton Microscopy Images of Stromal Layer in Rabbit Esophageal Tissue

ZOU Ding-song, ZHUO Shuang-mu, CHEN Jian-xin, GUO A-bin, FU Jin-di

(Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine Ministry of Education,
Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: A novel imaging method which can acquire high-contrast image of collagen and elastin, two-channel sequential detection imaging based on two-photon excited autofluorescence and second harmonic generation of biological tissues, is presented by using a Zeiss LSM 510 META laser scanning microscopy system. And this method is successfully used to obtain high-contrast image of collagen and elastin in the stromal layer of esophageal tissue at 84 μm and 150 μm depths. The experimental findings show that the use of two independent channels obviously increases imaging contrast of collagen and elastin. Both two-photon excited autofluorescence and second harmonic signals of tissue samples are collected in a backscattering geometry. This makes two-channel sequential detection imaging technique have a clinic application potential for pathological diagnosis.

Key words: laser technology; high-contrast image; esophageal tissue

1 引言

随着医学诊断方法向无损方向发展,光学技术在医学诊断中的应用已经展现出越来越大的潜力。利用光学手段实现对人类各种疾病的更为早期和精确的诊断已经成为当今生物医学光子学的一个重要研究课题。相对于现有的手术活检,通常把这种方法称为“光活检”。近年来,随着多光子显微成像技术的不断发展,使它在“光活检”方面呈现出巨大的潜力。多光子显微成像技术主要依赖于强的近红外

飞秒激光与生物组织相互作用发生的非线性光学效应而产生的谐波和双光子激发荧光作为信号源^[1-2],对生物组织的内在成分进行成像。胶原蛋

基金项目:福建师范大学本科生课外科技计划项目(No. BKL2006-014);福建省自然科学基金(No. A0510015);福建省教育厅科技项目(No. JA05215)和国家自然科学基金项目(No. 60508017)资助。

作者简介:邹定嵩(1984-),男,研究方向为激光生物医学。

收稿日期:2007-01-26; **修订日期:**2007-03-16

白和弹性蛋白是重要的细胞外间质,常常同时分布在人体的皮肤真皮、上皮组织下的固有层、动脉、肺、肝脏和膀胱等组织中,它们的形态变化反映了生物组织的生理、病理情况^[3-9]。当飞秒激光与这些组织相互作用时,由于胶原蛋白具有非对称中心结构,很容易产生光学二次谐波信号^[10-11],同时弹性蛋白也是细胞外间质荧光的重要信号源^[12-13]。因此,利用胶原蛋白的二次谐波产生和弹性蛋白的双光子激发荧光过程,研究生物组织的微结构成为多光子显微成像技术应用比较活跃的领域^[1-2,4-7]。由于二次谐波产生和双光子激发荧光是两个完全不同的物理机制,两者所获得的信息互为印证并补充,这两种非线性光学信号的复合成像已代表了目前非线性光学显微成像的一个发展方向^[14-15]。目前多数采用双通道同时探测方法实现这两种非线性光学信号的复合成像。然而,这种方法具有一定的缺陷,要么探测的二次谐波和双光子激发荧光信号是前向的^[14,16],在临床应用中受到限制,要么获得的胶原和弹性纤维图像的对比度较差^[17-18]。本文通过把一个锁模的钛宝石飞秒激光器连接到蔡司公司生产的 LSM 510 META 激光扫描显微成像系统中,提出了基于背向二次谐波和双光子激发荧光信号的双通道连续探测成像技术,实现兔子食道组织固有层中的胶原蛋白和弹性纤维的高对比度复合成像,并与目前常用的双通道同时探测成像技术相对比。

2 材料和方法

本文生物样品采用兔子的食道组织,它具有很好的层结构,由角质上皮层、上皮细胞层和基质层等组成,我们感兴趣的是以胶原蛋白和弹性纤维为主要成分的基质层。选择此样品还有另外一个原因,上皮肿瘤占所有人类肿瘤的 80%,在上皮肿瘤的形成过程中,角质层的厚度、上皮细胞核的大小、胶原蛋白和弹性纤维的结构都发生了很大的变化^[19-20],早期无损诊断、定位和治疗对减少上皮肿瘤病人的死亡率至关重要,本文中的实验结果是分别在 84 μm 和 150 μm 的深度下获得的胶原蛋白和弹性纤维的复合成像,对临床应用更有实际意义。在制作样品中,新鲜的兔子食道组织沿着纵向切开,夹在载波片和盖波片中,并使角质上皮层面对显微镜的物镜。在成像过程中,为了避免脱水和起皱,样品被喷洒了 PBS 溶液(pH=7.4)。

实验装置与以前发表的文章中介绍的相同^[13,15],以美国相干公司的钛宝石飞秒激光器(110fs,76Hz)作为激光光源来实现胶原蛋白的二次谐波产生和弹性蛋白的双光子激发荧光,此激光器的输出波长是可调谐的,范围为 700~980nm。实验中采用的激光波长为 810nm,因为在此激光波长激发下,可以避免胶原蛋白的双光子自体荧光信号对弹性纤维成像的影响。多光子显微镜成像的获得由德国蔡司公司生产的 LSM 510 META 系统完成。此系统的特点是基于 META 探测器的多轨道模式功能。在多轨道模式下,有 8 个独立的通道可以设置,每个通道都能在 377nm 至 716nm 波段内接收发射信号而连续获得各自通道的图像,同时获得不同通道的复合成像,每个通道的系统参数,包括激光强度、探测增益、放大偏移量、放大增益等可以分别设置,这是提高不同成分在不同通道成像而获得高对比度成像的关键。在实验中,我们从 8 个通道中选择 2 个通道,通道 1 收集的光谱范围是 387~419nm,用来成像兔子食道组织中固有层的胶原蛋白结构;通道 2 收集的光谱范围是 430~719nm,成像固有层的弹性纤维结构。此成像系统也具有单轨道模式功能,在单轨道模式下,有 8 个相互依赖的通道,它们总的探测范围是 377~716nm 波段,但每个通道不能有重叠信号。选定的每个通道的成像是同时获得的,而且不同通道的复合成像也是同步得到的,此时,对于每个通道的系统参数,包括激光强度、探测增益、放大偏移量、放大增益等都是是一致的,显然,与多轨道模式下的连续探测成像技术相比,单轨道模式下的同时探测成像技术具有一定的缺陷。

3 实验结果与分析

图 1(a)和 1(b)给出了利用双通道同时探测成像技术,获得的 84 μm 深度下食道组织基质层胶原蛋白和弹性纤维的非线性光学复合成像。图 1(a)中成像的参数是为了得到兔子食道组织固有层中胶原蛋白的清晰图像而设置的,图 1(b)的各项参数是为了得到组织中弹性纤维的清晰图像而设置的。表 1 中给出了激光强度、探测增益、放大偏移量、放大增益等参数的具体值。图 1(c)给出了利用双通道连续探测成像技术得到的胶原蛋白和弹性纤维的非线性光学复合成像,两个通道的参数设置在表 1 中也给了出来。

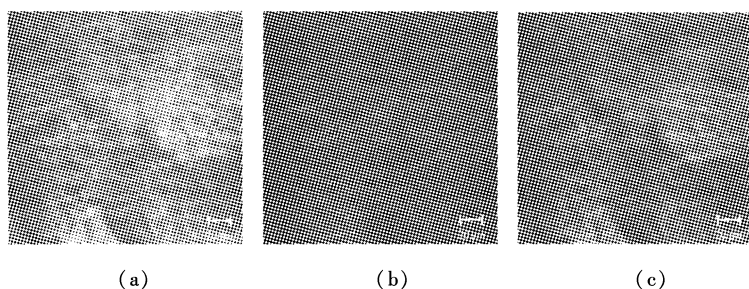


图1 食道组织基质层胶原蛋白和弹性纤维的非线性光学复合成像
(a)和(b)基于双通道同时探测成像技术;(c)基于双通道连续探测成像技术
Fig. 1 multimodal nonlinear optical imaging of collagen and elastic fiber in the stromal layer of esophageal tissue
(a) and (b) basing on two-channel simultaneous detection imaging technique;
(c) basing on two-channel sequential detection imaging technique

表1 获得图1(a)~(c)胶原蛋白和弹性纤维复合成像的系统参数设置

Tab. 1 system parameters for acquiring multimodal images of collagen and elastic fiber

	Detector Gain/V	Amplifier Gain/V	Amplifier Offset/V	Spectral Range /nm	Laser Intensity/mW
Fig. 1 (a)	Ch1:900 Ch2:900	Ch1:2.5 Ch2:2.5	Ch1:0.10 Ch2:0.10	Ch1:387~419 Ch2:430~719	Ch1:45 Ch2:45
Fig. 1 (b)	Ch1:820 Ch2:820	Ch1:1.0 Ch2:1.0	Ch1:0.07 Ch2:0.07	Ch1:387~419 Ch2:430~719	Ch1:28 Ch2:28
Fig. 1 (c)	Ch1:900 Ch2:820	Ch1:2.5 Ch2:1.0	Ch1:0.10 Ch2:0.07	Ch1:387~419 Ch2:430~719	Ch1:45 Ch2:28

对比图1中的三个分图可以看到,图1(c)清晰地给出了具有网状结构的胶原蛋白和细丝状的弹性纤维的高对比度复合成像。在图1(a)中,虽然能够同时看到胶原蛋白和弹性纤维的结构,由于弹性纤维的信号强度太强,极大地降低了二者成像的对比度。而在图1(b)中,可以清晰地看到弹性纤维的细丝结构,但已经基本无法分辨出胶原蛋白的结构和分布。

从表1中对应的为获得成像而设置的参数可以看到,获得二者最佳成像的参数设置完全不同,获得最佳的胶原蛋白成像的探测增益、放大增益和激光强度高于获得最佳的弹性纤维成像的相应参数,这说明了在相同的入射激光强度激发下,获得背向胶原蛋白的二次谐波信号效率低于背向的弹性纤维的双光子激光荧光效率,这是导致双通道同时探测成像技术缺陷的根源所在。获得黏膜

组织基质层的胶原蛋白和弹性纤维的结构分布是研究无损诊断上皮肿瘤的主要内容,在以前的实验结果中,要么成像深度不够,成像没有到达黏膜组织基质层,要么只观察到胶原蛋白的结构^[20~21]。从上面的分析可以看到,利用双通道连续探测成像技术,可以获得胶原蛋白和弹性纤维的高对比度非线性复合成像。

为了进一步验证双通道连续探测成像技术的优势,实验中对150 μm 深度下的食道组织基质层胶原蛋白和弹性纤维进行了双通道连续探测成像,如图2(a)所示。从图2(a)可以看到,随着成像深度

的增加,由于生物组织的散射和折射而对成像对比度的影响越来越强,但是仍然可以分辨出基质层中两个主要的组成成分——胶原蛋白和弹性纤维的结构与分布。为了更进一步讨论在相同的入射激光强度激发下,胶原蛋白的二次谐波信号效率和弹性纤维的双光子激光荧光效率的相对强度,利用可以同时获得组织成像和光谱数据的光谱分辨成像技术^[15],对150 μm 深度下的食道组织基质层的二次谐波信号和双光子激发荧光信号的强度进行了测量。图2(b)和2(c)分别给出了150 μm 深度下的食道组织基质层的光谱分辨成像和对应的发射光谱。图2(b)的网状结构的组织成分来自于胶原蛋白的二次谐波信号,细丝状成像来自于弹性纤维的双光子激发荧光信号。在图2(c)中,具有中心峰值405nm的较窄的光谱范围对应着胶原蛋白的二次谐波信号,中心峰值在511nm处的较宽的光谱范围对

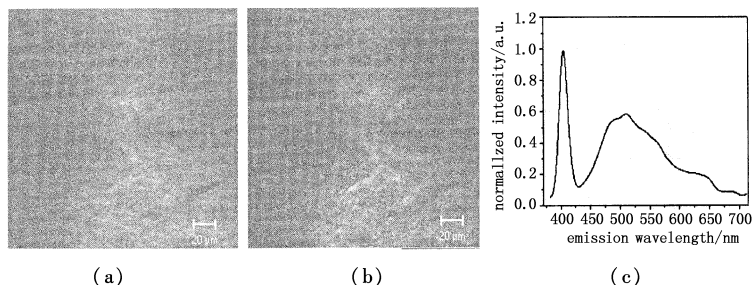


图2 150 μm 深度下基质层的胶原蛋白和弹性纤维成像及光谱
(a)胶原蛋白和弹性纤维的双通道连续探测成像;(b)胶原蛋白和弹性纤维的光谱分辨成像;(c)食道组织基质层的发射光谱
Fig. 2 images and spectrum of collagen and elastic fiber in the stromal layer at 150 μm depth
(a) two-channel sequential detection imaging of collagen and elastic fiber;
(b) nonlinear spectral resolved imaging of collagen and elastic fiber;
(c) the emission spectrum of the stromal layer of esophageal tissue

应着弹性纤维的双光子激发荧光信号。利用高斯函数拟合,得到背向二次谐波信号积分总强度与双光子激发荧光信号的总强度之比为 1:4.4,因此,当二次谐波成像处于最佳成像状态时,将导致太强的双光子激发荧光信号,而当双光子激发荧光成像处于最佳成像状态时,将导致太弱的二次谐波信号的产生。因此,同时探测无法得到高对比度的基于背向二次谐波信号和双光子激发荧光信号的非线性复合成像。

4 结 论

基于钛宝石飞秒激光为激发光源的多光子激光扫描显微成像系统,提出了利用背向二次谐波和双光子激发荧光信号的双通道连续探测成像技术,实现了对 84 μm 和 150 μm 的深度下食道组织基质层中的胶原蛋白和弹性纤维的高对比度成像。该技术可以建立起对细胞间质的信息监测,提供一种新的、无损的、实时的、精确的和客观的分析方法及手段。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。

参考文献:

- [1] W R Zipfel, R M Williams, W W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nat. Biotechnol., 2003, 21(11): 1369 – 1377.
- [2] W R Zipfel, R M Williams, R Christie, et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(12): 7075 – 7080.
- [3] B M Kim, J Eichler, K M Reiser, et al. Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity [J]. Lasers Surg. Med., 2000, 27: 329 – 335.
- [4] S J Lin, R J Wu, H Y Tan, et al. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy [J]. Opt. Lett., 2005, 30(17): 2275 – 2277.
- [5] A T Yeh, M J Hammer-Wilson, D C V Sickle, et al. Non-linear optical microscopy of articular cartilage [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2005, 13: 345 – 352.
- [6] H S Lee, Y Liu, H C Chen, et al. Optical biopsy of liver fibrosis by use of multiphoton microscopy [J]. Opt. Lett., 2004, 29(22): 2615 – 2616.
- [7] J Condeelis, J E Segall. Intravital imaging of cell movement in tumours [J]. Nat. Rev., 2003, 3: 921 – 930.
- [8] D Y Li, B Brooke, E C Davis, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis [J]. Nature, 1998, 393(21): 276 – 280.
- [9] L Debelle, A M Tamburro. Elastin: molecular description and function [J]. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 1999, 31: 261 – 272.
- [10] P J Campagnola, L M Loew. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms [J]. Nat. Biotechnol., 2003, 21(11): 1356 – 1360.
- [11] R M Williams, W R Zipfel, W W Webb. Interpreting second harmonic generation images of collagen I fibrils [J]. Biophys. J., 2005, 88(2): 1377 – 1386.
- [12] L H Laiho, S Plete, T M Hancewicz, et al. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra [J]. J. Biomed. Opt., 2005, 10(2): 0240161 – 10.
- [13] J X Chen, S M Zhuo, T S Luo et al. Two-photon excited spectroscopies of ex vivo human skin endogenous species irradiated by femtosecond laser pulses [J]. Chi. Opt. Lett., 2006, 4(10): 598 – 600.
- [14] R Gauderon, P B Lukins, C J R Sheppard. Simultaneous multichannel nonlinear imaging: combined two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation microscopy [J]. Micron., 2001, 32: 685 – 689.
- [15] S M Zhuo, J X Chen, T S Luo, et al. Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multichannel mode and Lambda mode [J]. Opt. Express., 2006, 14(17): 7810 – 7820.
- [16] P J Campagnola, A C Millard, M Terasaki, et al. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues [J]. Biophys. J., 2002, 81(1): 493 – 508.
- [17] Y C Guo, H E Savage, F Liu, et al. Subsurface tumor progression investigated by noninvasive optical second harmonic tomography [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96: 10854 – 10856.
- [18] A Zoumi, X Lu, G S Kassab, et al. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy [J]. Biophys. J., 2004, 87(4): 2278 – 2286.
- [19] P Wilder-Smith, K Osann, N Hanna, et al. In vivo multiphoton fluorescence imaging: a novel approach to oral malignancy [J]. Lasers. Surg. Med., 2004, 35: 96 – 103.
- [20] J Sun, T Shilagard, B Bell, et al. In vivo multimodal nonlinear optical imaging of mucosal tissue [J]. Opt. Express., 2004, 12(11): 2478 – 2486.
- [21] M C Skala, J M Squirrell, K M Vrotsos, et al. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues [J]. Cancer. Res., 2005, 65(4): 1180 – 1186.