

生物活组织的背向二次谐波成像*

林幸笋¹⁾ 潘琳²⁾ 胡金云¹⁾ 马辉¹⁾** 陈颢延¹⁾

(¹⁾清华大学物理系原子分子纳米科学实验室, 北京 100084;

(²⁾中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

摘要 光学二次谐波成像技术由于具有三维高分辨率、不需要荧光标记、对生物样品的杀伤效应小等特点, 在生物医学研究上具有广阔的应用前景. 在双光子荧光成像基础上, 实现了适合对厚组织样品观测的背向光学二次谐波成像, 探讨了背向二次谐波成像的特点和影响因素. 通过对多种生物组织样品进行大量实验, 发现胶原纤维和肌肉纤维均可以产生很强的背向二次谐波, 并成功地将背向二次谐波成像技术应用于糖尿病患者皮肤的观测. 背向二次谐波成像技术可望推广到病理检查等临床应用中.

关键词 二次谐波, 显微成像, 生物组织, 糖尿病

学科分类号 O43, Q6

激光扫描双光子荧光显微镜自 20 世纪 90 年代出现以来, 已在生物医学领域得到广泛应用, 是研究组织和细胞内特定分子和特定结构动态变化的有力工具^[1]. 它利用双光子激发荧光 (two-photon excitation fluorescence, TPF) 效应进行成像. 由于激发效率与激光光强的平方成正比, 双光子荧光只发生在焦点附近的极小区域. 因此, 它不需要共焦小孔就可实现三维高分辨, 信号收集效率高, 而且降低了对焦点以外染料的漂白, 减少光化学毒性. 所采用的激发光源是近红外的超快激光, 对生物样品的光损伤小. 近红外光散射效应小, 在介质中的穿透深度大, 因此成像深度比较大.

在双光子荧光显微镜中, 超快脉冲激光与生物样品相互作用还会发生其他光学非线性效应, 例如光学二次谐波 (second harmonic generation, SHG) 效应. 利用二次谐波作为图像信号来源的成像技术称为二次谐波成像. 二次谐波发生和双光子激发荧光都是二阶非线性过程, 因此二次谐波成像具有双光子荧光成像的优点, 同时具有如下特征: a. 二次谐波光谱宽度完全由激发光源决定, 对于 150 fs 超快激光谱峰宽度理论上只有 10 nm, 利用窄波段带通滤波片可以有效排除荧光和各种背景干扰, 获得较高的信号对比度和图像分辨率; b. 二次谐波一般为非共振过程, 光子在生物样品中只发生非线性散射, 不被吸收, 因此也不会产生伴随的光化学过程, 可以减小对生物样品的损伤; c. 二次谐波成像不需要进行染色, 可以避免使用染料带来的光毒性. 除需要不同滤光片之外, 二次谐波成像与双光子荧光成像在测量装置上几乎完全相同, 但二者

所获得的信息互为印证并补充, 因此近几年来备受重视. Guo 等^[2,3]利用超短脉冲激光对鸡的肌肉和皮肤等生物组织进行二次谐波层析成像. Lewis 等^[4]利用二次谐波对生物膜上指定区域进行功能成像, 并研究了膜电势. Campagnola 的实验小组利用二次谐波成像方法研究活细胞和生物组织中的结构蛋白, 还观察到了有丝分裂细胞中的纺锤体和微丝微管^[5,6].

能够产生二次谐波的介质必须具有中心不对称性, 并且二次谐波的传播方向还要满足相位匹配条件. 原晶体材料中产生的二次谐波, 其相位匹配的方向与基频激光一致, 为前向传播^[7]. 由于光在高散射的生物组织中穿透深度有限, 前向二次谐波成像技术难以应用于对厚组织样品的研究. 本工作利用双光子激发扫描显微镜, 获得生物组织的背向二次谐波图像. 文章列举了实验中能够产生强烈背向二次谐波的生物组织, 分析了背向二次谐波成像的特点和影响因素, 得出该技术用于糖尿病皮肤研究的初步结果, 并讨论了背向二次谐波产生的机制.

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验装置如图 1 所示. 本工作在实验室已有的

* 海外青年学者合作基金项目 (19928408), 国家自然科学基金重点项目 (60138010) 和面上项目 (10274039) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62784531-164, Fax: 010-62781598

E-mail: mahui@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2003-06-18, 接受日期: 2003-07-25

激光扫描双光子荧光显微镜基础上, 通过改装信号探测外通道, 从背向上收集信号, 实现了背向二次谐波成像. 背向二次谐波成像和双光子荧光成像都是从背向上进行探测, 不受样品厚度的影响, 技术上完全兼容. 在这套成像系统中, 可以同时进行双通道复合测量.

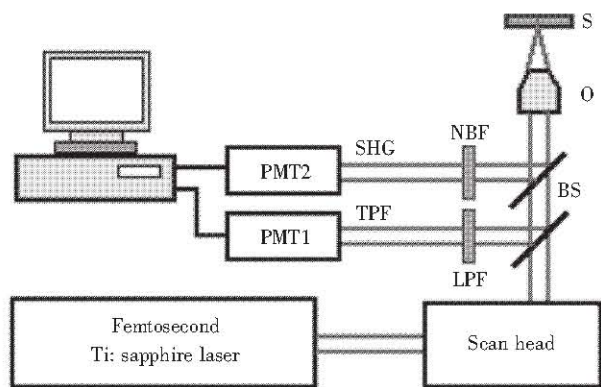


Fig. 1 Experimental setup

激发光源是掺钛蓝宝石飞秒超快激光器 (Tsunami, Spectra Physics, USA), 波长 λ 选为 811 nm, 脉冲宽度 120 fs, 重复频率 80 MHz. 激光输出的功率可达 1 W, 经光路衰减后在样品处仍有 200 mW 左右, 加上衰减片组之后可在 0 ~ 200 mW 之间调节. 激发光由物镜聚焦到样品上, 产生的背向二次谐波信号由同一个物镜收集, 经过窄带滤波片 (中心波长 405.6 nm, 半高全宽 8 nm), 由光电倍增管转化为电信号送计算机处理, 得到背向二次谐波图像. 如果样品有自荧光或者经过荧光染料染色, 将同时产生双光子荧光信号. 物镜收集的荧光经过另外一个信号通道, 送到计算机中成像. 双光子荧光波长略大于激发波长的一半, 光谱比较宽, 一般为几十到几百纳米, 而二次谐波的波长正好是激发波长的一半, 光谱很窄, 半高全宽大约只有 10 nm. 因此, 在双光子荧光通道使用带通或高通滤波片, 可以有效避开二次谐波的峰值波长, 在二次谐波通道使用半高全宽只有 8 nm 的窄带滤波片, 可以很好地挑选出二次谐波信号, 荧光信号的贡献可以忽略.

利用这套实验装置, 我们首先观察了大量生物组织样品, 比较其背向二次谐波的强度, 选择适合用背向二次谐波成像方法研究的生物组织. 然后用背向二次谐波成像和双光子荧光成像两种方法对经

过染色的人体组织病理切片进行复合测量. 我们还研究了样品制备过程中切片、固定、封片和染色等处理对背向二次谐波的影响, 并尝试将背向二次谐波成像技术应用到有实际意义的体系, 比较了糖尿病发生前后皮肤背向二次谐波强度的变化.

1.2 样品制备及实验方法

1.2.1 不同组织背向二次谐波信号的强度: 断颈处死大鼠, 剥离皮肤、肌肉、动脉、大腿神经、尾巴肌腱、脂肪、视网膜、耳软骨、肝、心脏等组织器官, 徒手切片得到厚度约为 5 mm 左右的新鲜样品, 浸泡在生理盐溶液 (PSS) 中保持组织的活性, 在 1 h 之内进行实验观察, 比较背向二次谐波的强度.

1.2.2 背向二次谐波成像与双光子荧光成像的结合: 剥离大鼠胸主动脉并切成环状, 将血管环立于载玻片上, 让其中轴与光轴平行. 对同一位置分别用背向二次谐波和双光子荧光进行成像, 然后将两个通道的图像合并.

1.2.3 切片制备方法对背向二次谐波的影响: 将人体皮肤用切片机制作 4 ~ 50 μm 不等的冰冻切片, 分成 4 组. 其中 3 个实验组分别进行如下处理: 用甲醇进行固定, 滴上加拿大树胶后封片, 用 FITC 进行染色. 然后在激发光强相同的条件下进行成像, 比较切片制备过程中各种因素对二次谐波信号的影响.

1.2.4 用二次谐波成像观察糖尿病患者皮肤: 选择正常人皮肤、糖尿病人正常皮肤和糖尿病人坏疽皮肤, 比较组织病变对其背向二次谐波强度的影响. 人体皮肤样品由中日友好医院临床医学研究所提供, 用切片机制作成 20 μm 的冰冻切片, PBS 溶液喷洒保湿. 切片未经任何固定、染色和封片处理.

2 结 果

2.1 不同组织背向二次谐波信号的强度

实验表明, 皮肤、皮下结缔组织、神经、肌腱、血管壁和肌肉等组织可以产生强的背向二次谐波, 而脂肪、视网膜、耳软骨和内脏没有背向二次谐波, 或者很弱. 图 2a、b、c、d 分别是大鼠真皮、皮下结缔组织、动脉壁外膜和腿部肌肉的背向二次谐波图像. 从图像的特征可以初步断定背向二次谐波是来自这些生物组织所包含的胶原纤维或肌肉纤维. 因此, 背向二次谐波成像方法适合对生物组织中的胶原纤维或肌肉纤维进行研究.

纤维为柱状结构, 具有中心不对称性, 可以发生二阶非线性效应, 这是产生二次谐波的前提. 而二次谐波的强度还与样品的非线性光学系数有关. 胶原纤维和肌肉纤维的背向二次谐波比较强, 说明

其非线性光学系数比较大. 这与 Verbiest 等^[8]的报道相符合, 该研究表明, 胶原纤维的三螺旋结构使它具有较高的非线性光学系数, 可以使二次谐波的转换效率提高 30 倍.

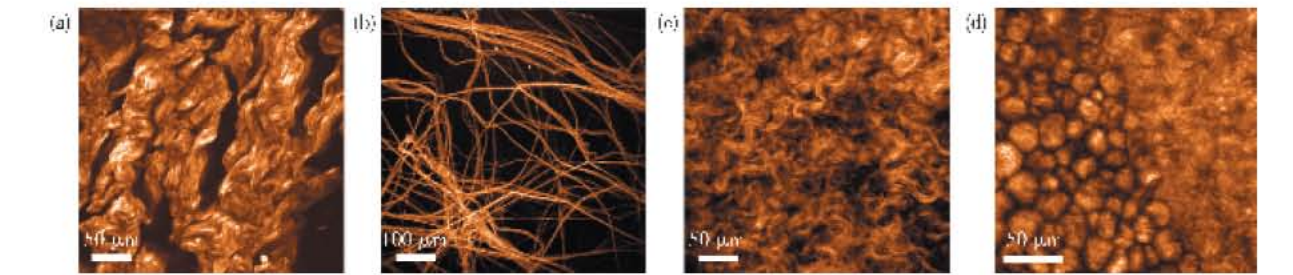


Fig. 2 Backward SHG images of rat tissues
(a) Skin; (b) Connective tissue; (c) Adventitia; (d) Muscle.

2.2 背向二次谐波成像与双光子荧光成像的结合
背向二次谐波成像和双光子荧光成像在技术上是兼容的, 但双光子荧光和背向二次谐波来源不同, 前者只与样品的化学成分有关, 后者除了与化学成分有关, 还与超分子结构和长程的有序结构有关. 因此, 两种成像方法配合使用, 可从不同侧面揭示样品的结构信息. 例如, 动脉壁中的弹力纤维可以产生自荧光, 而外膜中的胶原纤维可以产生背向二次谐波. 图 3 即为大鼠动脉血管环双通道成像的结果, 绿色为弹力纤维, 土黄色为胶原纤维. 其效果类似于荧光双标染色, 而这里实际上没有引入任何荧光标记, 成像时组织仍保持着活性, 适合动态观察和分析^[9,10]. 多通道复合测量也代表了目前非线性光学显微镜的一个发展方向^[11].

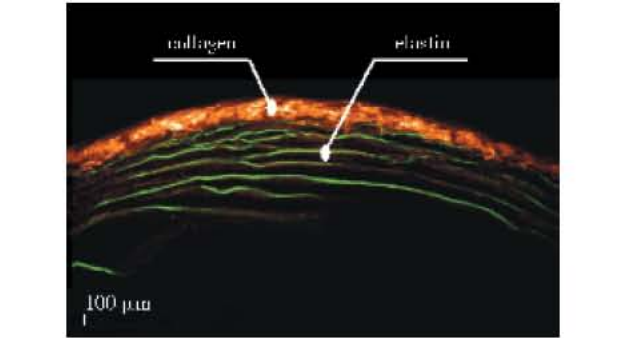


Fig. 3 Collagen and elastin in rat aorta

激光扫描显微镜可以对样品不同深度的光学切面进行扫描, 从而得到三维图像. 然而随着扫描平

面的深入, 信号会很快衰减. 可清晰成像的深度首先取决于生物样品的光学性质, 吸收和散射系数小的样品成像深度就比较大, 其次与成像系统的信号产生机制也有关系. 我们在实验中发现, 对同样的生物组织样品, 背向二次谐波成像的深度往往要比双光子荧光成像的深度大. 例如, 大鼠动脉血管壁的双光子荧光成像深度大约在 80 μm 左右^[9], 而二次谐波成像的深度可达 200 μm . 可对深层组织成像的显微成像方法在生物医学应用中无疑具有重要意义. 图 4 是浅埋在肌肉组织中的小血管的二次谐波图像, 图 4a 为某一深度的光学切面图, 图 4b 是用数字图像处理软件从该血管的三维图像中重构出来的横截面图, 可以看见完整的 100 μm 左右的血管环.

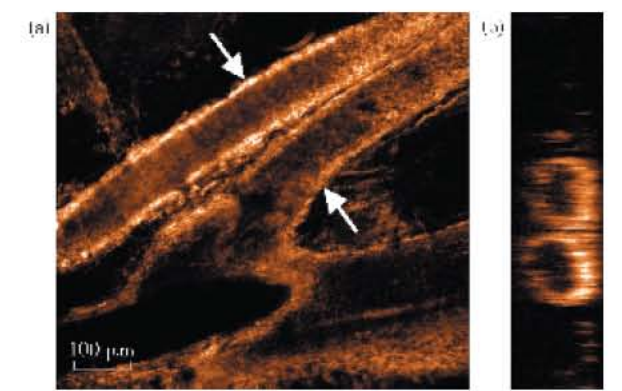


Fig. 4 Vein buried in rat thigh muscle
(a) SHG section image of veins buried in muscle. (b) A cross sectional image along the arrows in (a).

2.3 切片制备方法对背向二次谐波的影响

背向二次谐波成像的一个优点是不受生物样品厚度的限制, 有利于实现在体测量. 这在将来的临床应用中具有重要意义, 例如对皮肤等组织的检查可能不必提取样品, 从而避免损伤. 但目前的实验仍然离不开组织切片, 因为二次谐波图像的解释不如荧光图像直接, 需要通过与其他显微成像方法得到的图像进行比较来积累经验. 而制作切片的过程或多或少会导致组织光学性质的变化, 使背向二次谐波图像失真. 因此实验比较了组织切片制作过程中各种因素对背向二次谐波强度的影响.

将组织切成几十微米薄片的过程会使生物组织的结构发生形变, 实验结果表明, 这个过程对背向二次谐波强度的影响可以忽略. 如果需要将组织切片长期保存, 需要用固定液进行固定, 再用加拿大树胶封片. 实验发现, 固定和封片过程使二次谐波信号增强. 对于没有荧光的组织, 为了把二次谐波图像跟荧光图像进行比较, 就需要染色. 实验发现, 用 FITC 染色会使二次谐波信号减弱. 因此, 将来把二次谐波成像方法应用到组织切片病理检查时, 应避免这些因素的影响, 尽可能在同样的条件下进行比较.

2.4 用二次谐波成像观察糖尿病患者皮肤

胶原纤维在真皮中的含量非常丰富. 正常的胶原蛋白处于不断代谢更新的动态平衡中, 保持着皮

肤的健康. 糖尿病发生之后, 会引发一系列并发症, 包括皮肤坏疽病, 这时真皮中的胶原纤维会发生某些变化. 用背向二次谐波成像方法探测皮肤胶原纤维的变化, 有可能提供早期诊断信息.

实验比较了正常人皮肤、糖尿病人正常皮肤和糖尿病人坏疽皮肤的背向二次谐波强度. 在样品制备及成像条件保持一致的情况下, 发现正常人皮肤中的胶原纤维发出很强的背向二次谐波, 而另外两组样品的背向二次谐波都比较弱, 结果如图 5 所示. 其中图 5a 是正常人皮肤, 背向二次谐波图像显示清晰的胶原纤维结构. 图 5c 是糖尿病人坏疽皮肤, 其胶原纤维已经遭到破坏, 背向二次谐波非常弱, 强度比正常人皮肤低一个数量级. 图 5b 是糖尿病人正常皮肤, 用肉眼观察与正常人皮肤无区别, 没有发生坏疽, 但背向二次谐波也非常弱, 图像与坏疽皮肤类似. 结果提示, 糖尿病人正常皮肤的胶原纤维实际上已经遭到某种破坏, 有可能是胶原纤维被分解, 也有可能是胶原纤维束的高度有序结构发生了变化, 背向二次谐波图像能够反映这种变化, 为皮肤疾病的早期诊断提供信息, 具有临床意义.

这里只是从二次谐波强度上进行判断, 成像方法的意义却不仅如此. 我们还可以用计算机数字图像分析的方法获取胶原纤维构像信息, 客观定量地描述胶原纤维的形态变化^[12].

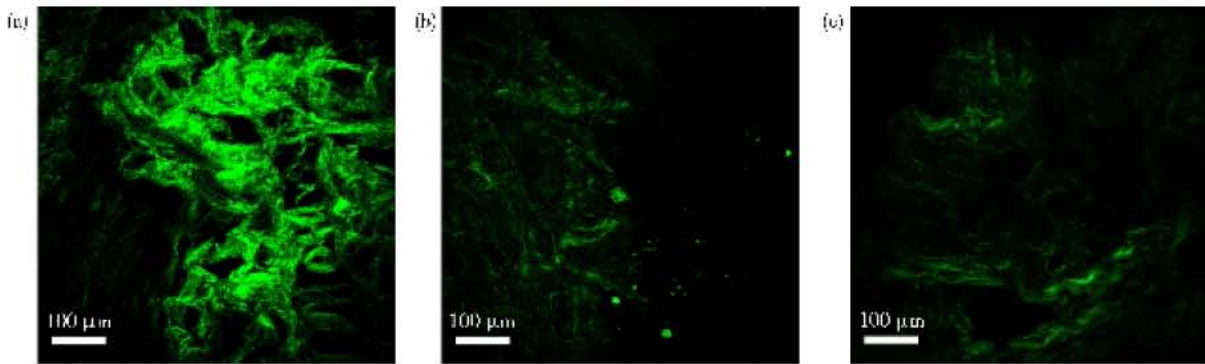


Fig. 5 Backward SHG intensity of collagen in different human skin
(a) Normal human skin; (b) Normal skin of diabetic patient; (c) Gangrenosis skin of diabetic patient.

3 讨 论

生物组织背向二次谐波的产生机制目前尚未有定论. 由于体材料产生二次谐波需要满足相位匹配条件, 即二次谐波发生的方向基本上与基频光方向

一致, 因此有文献认为背向二次谐波是经过生物组织背向漫散射回来的^[11]. 二次谐波确实会发生背向漫散射, 但这仍无法解释我们在实验中观察到的如此强的背向二次谐波. 因为生物组织漫散射的各项异性因子 g 大于 0.8, 根据 Henyey-Greenstein 近

似公式计算散射光的空角分布,发现光基本上朝前向散射,背向散射比前向散射的强度低三个数量级,其贡献可以忽略不计。当然,也可能存在某种背向散射增强机制,例如布拉格散射。胶原纤维是由直径为几十微米的胶原原纤维高度有序排列而成的结构^[13],有可能形成二维布拉格光栅。在光栅常数适当的情况下,可以将前向的体二次谐波较多地反射回来。

除了布拉格散射增强,我们认为另外一种可能的产生机制是,背向二次谐波直接背向产生,不需要经过漫散射或反射。体二次谐波只有前向的,但表面二次谐波在透射和反射两个方向上同时发生。对于光学性质复杂的生物组织,相位匹配条件难以满足,表面二次谐波的转换效率跟体二次谐波的转换效率可以比拟,其贡献不能忽略。在实验中,激光聚焦到生物组织内部,背向二次谐波不会来自组织表面,但可以来自组织内部的微小界面,例如胶原原纤维(fibril)的表面。焦点体积内包含上百条胶原原纤维,背向二次谐波可能是所有胶原原纤维产生的表面二次谐波的总和。此外,实验探测到的背向二次谐波还可能有其他倍频信号的贡献,例如超瑞利散射等。

即使背向二次谐波发生的物理机制还不完全确定,仍然可以利用这种成像技术的特点进行生物和医学方面的应用研究。胶原纤维和肌肉纤维可以产生强的背向二次谐波。利用背向二次谐波成像系统可以对皮肤、皮下结缔组织、神经、肌腱、血管壁和肌肉等富含胶原纤维或肌肉纤维的生物组织进行成像研究。背向二次谐波成像不受样品厚度的限制,适合对厚的生物组织进行成像,可以实现在体研究。除了上文提到的糖尿病皮肤病变研究,还有一个已经引起广泛关注的潜在应用是皮肤癌的早期诊断。生物组织的病变会引起其光学性质的变化,二次谐波对组织的构象变化尤其敏感。通过比较癌变皮肤和正常皮肤背向二次谐波图像的异同,包括强度和偏振等信息,筛选出有用的统计性规律和指标,可用于皮肤癌的早期诊断。二次谐波成像还可应用在心血管疾病研究方面。由于动脉血管壁含有大量的弹力纤维和胶原纤维,这些结构直接影响到

血管的生物力学特性,与糖尿病和动脉硬化等疾病有密切关系。弹力纤维有自荧光,而血管壁外层膜的胶原纤维有很强的二次谐波,因此可以对两种纤维进行多同道同时成像,通过数字图像分析的手段从微观上研究心血管疾病的发生机制。

参 考 文 献

- Williams R M, Piston D W, Webb W W, *et al.* 2-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry. *FASEB*, 1994, **8** (11): 804 ~ 813
- Guo Y, Ho P P, Alfano R R, *et al.* Second-harmonic tomography of tissues. *Optics Letters*, 1997, **22** (17): 1323 ~ 1325
- Guo Y, Ho P P, Alfano R R, *et al.* Optical harmonic generation from animal tissues by the use of picosecond and femtosecond laser pulses. *Applied Optics*, 1996, **35** (34): 6810 ~ 6813
- Lewis A, Khatchaturians A, Treinin M. Second-harmonic generation of biological interfaces: probing the membrane protein bacteriorhodopsin and imaging membrane potential around GFP molecules at specific sites in neuronal cells of *C. elegans*. *Chemical Physics*, 1999, **245** (1 ~ 3): 133 ~ 144
- Campagnola P J, Wei M, Lewis A. High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophys J*, 1999, **77** (12): 3341 ~ 2249
- Campagnola P J, Andrew C M, Mark T, *et al.* Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys J*, 2002, **81** (1): 493 ~ 508
- Shen R Y. *The principle of non-linear optics*. New York: Wiley, 1984. 76
- Verbiest T, Elshocht S V, Kauranen M, *et al.* Strong enhancement of nonlinear optical properties through supramolecular chirality. *Science*, 1998, **282** (5390): 913 ~ 915
- 庞 焕, 石 磊, 马 宁, 等. 一种新的红细胞源降压因子对大鼠血管的保护作用. *科学通报*, 2002, **47** (4): 249 ~ 253
Pang H, Wen Y Y, Shi L, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47** (9): 717 ~ 721
- Lin X, Sun F, Ma H, *et al.* Two-photon fluorescence imaging of rat aorta. *Proceedings of SPIE*, Beijing Nov. 8 ~ 10
- Gauderon R, Lukins P B, Sheppard C J R. Simultaneous multichannel nonlinear imaging: combined two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Micron*, 2001, **32** (7): 685 ~ 689
- Wang J, Ji L, Ma H. Reconstruction of deforming aortas in two-photon autofluorescence image sequences. *Applied Optics*, 2003, **42** (5): 1 ~ 11
- 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 3 ~ 9
Li Y R, *et al.* *Biochemistry and Research Method of Extracellular Matrix*. Beijing: People Health Press, 1998. 3 ~ 9

Backward Second Harmonic Generation Imaging of Tissues*

Lin Xing-Sun¹⁾, Pan Lin²⁾, Hu Jin-Yun¹⁾, Ma Hui¹⁾**, Chen Die-Yan¹⁾

(¹⁾ Atomic and Molecular Nanosciences Laboratory, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ Clinical Medicine Research Institute, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Second harmonic generation (SHG) imaging needs no fluorescent labels and brings no photobleaching or toxicity. It's a promising tool for high-resolution, three-dimensional studies in biomedicine fields. Backward SHG imaging system is established base on a converted laser-scanning two-photon fluorescence microscope. This epifluorescence configuration is especially advantageous to thick tissue imaging and *in situ* detection. Various tissues were tested to find out those which give rise to strong backward SHG. Then backward SHG imaging was applied in the studies of human skins. The SHG intensity from gangrenosis skins was much lower than that from normal skins. The skins of diabetic patients, which showed no macroscopic abnormality, also displayed a distinct decrease in SHG intensity. The result indicated that collagen in these skins may have suffered from micro-structural disorder or other changes. SHG imaging may serve as a new diagnosis method for dermatopathy or other diseases.

Key words second harmonic generation, microscopy, tissue, diabetes

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of China (19928408, 60138010 and 10274039).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62784531-164, Fax: 86-10-62781598, E-mail: mahui@tsinghua.edu.cn

Received: June 18, 2003 Accepted: July 25, 2003