

文章编号: 0258-702X(2001)07-0669-04

人肺组织内源性显微荧光特性研究*

郑蔚^{1,2} 黄志伟^{1,3} 谢树森¹ S. M. Krishnan² Chia Teck Chee³

¹福建师范大学激光研究所 福州 350007
²Biomedical Engineering Research Center, Nanyang Technological University, Singapore 639798
³School of Science, Nanyang Technological University, Singapore 259756

提要 采用新型显微荧光分光光度系统,实现激光诱导人肺组织内源性显微荧光光谱与图像的测量,获得不同组织层(即上皮层、粘膜层和软骨层)的荧光分布和荧光特性,为探索癌与正常组织自体荧光光谱特征差异的根源,揭示激光诱导自体荧光法诊断和定位早期肺癌的机理提供重要的实验依据。

关键词 显微荧光分光光度系统,激光诱导自体荧光,内源性显微荧光光谱与图像,人肺组织

中图分类号 R 730.57 文献标识码 A

Intrinsic Microscopic Fluorescence and Imaging of Human Lung Tissues

ZHENG Wei^{1,2} HUANG Zhi-wei^{1,3} XIE Shu-sen¹ S. M. Krishnan² Teck-Chee Chia³

¹Institute of Laser, Fujian Normal University, Fuzhou 350007
²Biomedical Engineering Research Centre, Nanyang Technological University, Singapore 639798
³School of Science, Nanyang Technological University, Singapore 259756

Abstract The microscopic fluorescence spectra and imaging of excised lung tissue sections were studied under a novel microspectrophotometer system using a He-Cd laser light at 442 nm. Differences of the intrinsic autofluorescence distributions in different tissue layers, i. e., epithelium, mucosa and cartilage, were observed in normal and malignant lung tissues. The results show that the study of microscopic fluorescence on various tissue layers can be used to explore the origin of spectral differences between normal and abnormal lung tissues, which is very useful for the better understanding of the mechanism of the early cancer diagnosis using the laser-induced autofluorescence technique.

Key words microspectrophotometer system, laser-induced autofluorescence, microscopic fluorescence spectroscopy and imaging, human lung tissue

1 引言

肺癌的死亡率在我国及欧美大城市已居各种恶性肿瘤的前列。目前被诊为肺癌的患者大多已是晚期,其手术切除后的 5 年存活率不足 15%,但对早诊患者,相应的存活率可增至 90%,甚至可进一步延长或彻底治愈^[1,2]。因此,早期诊断和定位是减少死亡率的关键。遗憾的是,用传统的检测方法,如 X 射线胸透术、核医学法、CT 及白光支气管镜检查等均难以探测无明显临床症状且病灶小(厚 0.2 ~ 1

mm,直径数毫米)的早期肺癌。80 年代末,90 年代初,新兴的激光诱导生物组织自体荧光诊断技术在肺癌早诊上的应用研究引起了人们的关注^[3~7]。该方法具有灵敏度高、无损、无副作用、无需服用外加药物等优点,尤其是它不必象激光诱导药物荧光诊断法^[8~10]那样,为防止皮肤的光敏副作用而要求受检者避光近一个月,因而更方便且费用较低,更适于临床普查和早诊,是前景十分看好的一种“光学活检(Optical Biopsy)方法”。

近年来,国外一些学者发现^[3~7]重度不典型增生病灶或原位癌灶的自体荧光光谱与正常支气管的波形相似,但荧光强度前者明显比后者弱,尤其是在绿光部分,而在红光部分相对减弱得不如绿光部分快。此外,他们还发现,用激发效率高的 Kr^+ 激光

* 国家自然科学基金(编号:69778029)和福建省科委国际科技合作计划资助项目。

收稿日期 2000-03-07;收到修改稿日期 2000-06-05

405 nm 波长激发所观测到的活体人肺支气管组织自体荧光谱与用 He-Cd 激光 442 nm 波长激发的结果相似,故可用性能稳定且价格低及能通过支气管镜导光束传导的 He-Cd 激光取代以往使用的 Kr^+ 激光。他们还研制了相应的诊断和定位系统,结果表明应用激光诱导生物组织自体荧光诊断技术能够探测早期肺癌。然而,目前人们对造成肺癌组织与其正常组织光谱差异的原因尚不十分清楚,只大致定性地认为与癌组织中荧光基团的浓度以及细胞间质大分子组份变化或细胞层增加等因素有关。为深入定量地分析组织自体荧光的发光过程,研究组织的内源性显微荧光分布和荧光特性十分必要。国外学者曾用显微镜和 OMA 系统等对皮肤和大肠组织的内源性显微荧光特性^[1]进行了研究,而此类研究在国内尚未见报道。本文运用新型显微荧光分光光度系统(microspectrophotometer (MSP) system)对激光诱导人肺癌组织和正常组织的内源性显微荧光光谱、图像和特性进行实验研究。

2 材料和方法

2.1 组织样品

新鲜的正常组织和肺癌块状样品取自肺叶切除的病人或未经处理的尸体。每块组织样品均用 OCT (Optimum Cutting Temperature) 材料(TBS, Durham, N. C.) 包裹并液氮速冻后,用低温切片(HM 500 OM, Carls Zeiss, Germany)沿垂直于组织粘膜表面的方向切成厚度为 $10\ \mu\text{m}$ 的组织薄片,这样每一组织切片均包含了完整的支气管组织层,切片组织的大小约为 $2\ \text{mm} \times 5\ \text{mm}$ 。本研究共测量了 50 个人肺正常组织和癌变组织的切片。用于内源性显微荧光分析的组织不做染色和固定,而用于组织病理学检查的组织切片用 H&E 染色和福尔马林固定,癌变组织经病理学检查结果为微浸润鳞癌。

2.2 显微荧光分光光度系统

图 1 所示为测量组织内源性显微荧光光谱和图像的新型显微荧光分光光度系统的框图。它将倒置显微镜与 OMA 光谱检测系统及 CCD 图像探测系统三者巧妙地连为一体,并具有方便地指示荧光收集光纤位置的功能^[1]。它主要由倒置显微镜、光谱仪、后向照射的 CCD 探测器和高灵敏度的 CCD 数值照相机、光机配件及计算机控制系统组成。激发光源选用目前被认为较理想的 442 nm He-Cd 激光器。

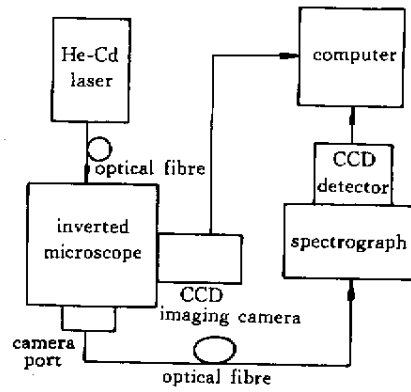


图 1 测量生物组织内源性显微荧光特性的显微荧光分光光度系统

Fig.1 Microspectrophotometer (MSP) system for microscopic analysis of biotissues

将待测切片组织样品置于显微镜平台上。He-Cd 激光经透镜耦合后由一直径为 $100\ \mu\text{m}$ 且末端带显微透镜的光纤传导,并均匀地辐照在被测组织上。被测样品前面的光路上加入 442 nm 干涉滤光片(440 ~ 450 nm, Omega optical, Inc.)以消除激光器产生的等离子体辐射干扰,在显微物镜(本研究选用 10 倍物镜)后放置一块 470 nm 的长波通滤光片,以截去透过的激发光而只让组织的内源性荧光通过。样品的显微荧光图像既可通过目镜观测,亦可由位于显微像平面上的分束器反射后聚焦到 CCD 数值照相机,然后由与之相连的计算机进行图像存储和显示。被测样品上某一区域(直径 $6\ \mu\text{m}$)的自发荧光信号,则是由于像平面上的一芯径为 $600\ \mu\text{m}$ 的光纤收集并耦合至光谱仪。计算机与数值照像机和 CCD 光谱探测系统相连,控制光谱信号和荧光图像的采集、处理和显示。测量前用标准灯对检测系统进行波长和强度校正。系统的光谱分辨率约为 $1.2\ \text{nm}$ (FWHM)。每张谱图均是在相同的采集条件下获得的。

3 实验结果与讨论

图 2 是用显微荧光分光光度系统测量得到的 $10\ \mu\text{m}$ 厚人肺正常组织和癌组织典型的显微自体荧光图像。由图 2(a)显微荧光图像可见,正常支气管组织的形态学结构层次分明,包含了上皮层、粘膜层和粘膜下层及软骨层。利用显微分光光度系统目镜上的标尺,测得 40 个正常支气管组织上述各层的平均厚度分别为 $60 \pm 15\ \mu\text{m}$, $750 \pm 120\ \mu\text{m}$ 和 $1100 \pm 130\ \mu\text{m}$ 。而肺癌支气管组织的显微荧光图像则不

同,如图 2(b) 中所示,癌变组织无明显的层状结构,微浸润癌组织的出现使典型的上皮层已难以辨认(图 2(b) 中箭头所示),并且癌组织荧光图像的亮度也明显比正常组织小得多。但图 2(b) 中的旁癌组织尚能分辨出有关的层状结构。

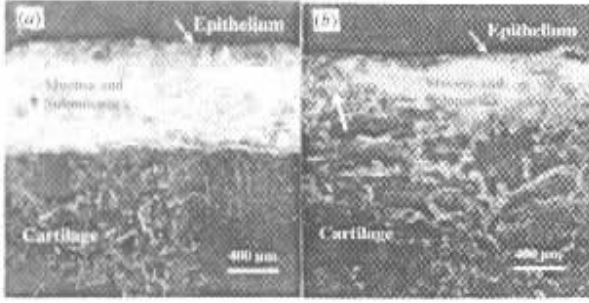


图 2 442 nm 激光诱导的 10 μm 厚人肺组织切片的内源性显微荧光图像
(a) 正常组织 (b) 癌组织

Fig.2 Microscopic fluorescence image of a 10 μm lung tissue section obtained by the MSP system using excitation laser light at 442 nm
(a) normal tissue ; (b) carcinomatous tissue

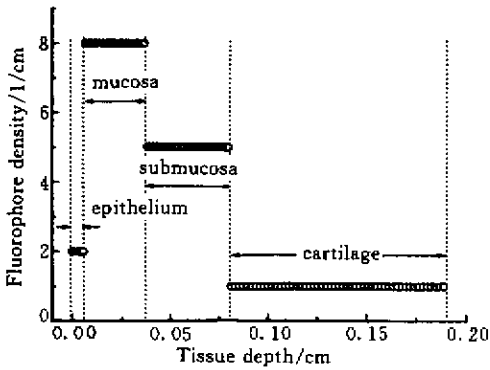


图 3 正常支气管组织各层的相对荧光基团密度 $\rho(z)$ 分布

Fig.3 Relative fluorophore density ρ , as a function of tissue depth z , inside the bronchial tissue

图 3 是利用显微荧光分光光度系统中 CCD 数值相机测得的正常支气管组织每一层的荧光基团密度 $\rho(z)$ (cm^{-1}) 分布,图中的结果已相对于软骨层做了归一化处理。由图 3 可见,粘膜层的荧光最强,其亮度约为软骨层的 8 倍,粘膜下层和上皮层则分别约是软骨层的 5 倍和 2 倍。

图 4 是测得的 10 μm 厚的人肺癌组织和正常组织的显微自体荧光光谱。对正常支气管组织,如图 4(a) 所示,不同层的荧光光谱其形状和强度均有所不同。从粘膜层到上皮层到软骨层,其内源性荧

光光谱的峰位出现红移,从 508 nm 移到 514 nm,这说明各层的荧光发光基团均不太相同。此外,比较各层的荧光强度发现,主要的内源性荧光来自粘膜层和粘膜下层,上皮层发出的荧光较少,而软骨层的贡献最少,几乎可以忽略不计。这与上述测得各层荧光基团密度的结果一致。各层荧光强度的明显差异说明了位于各层荧光基团的浓度也不相同。

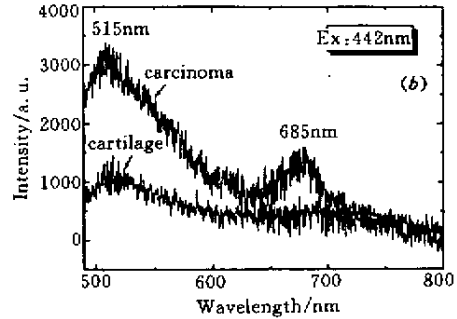
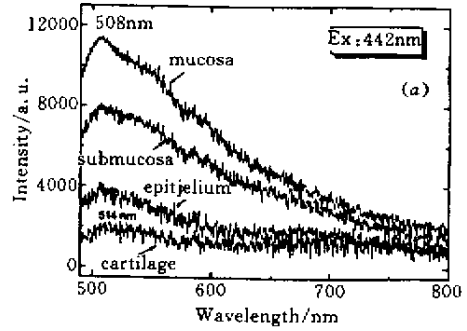


图 4 442 nm 激光诱导的 10 μm 厚人肺组织切片的内源性显微荧光光谱
(a) 正常组织 (b) 癌组织

Fig.4 Typical intrinsic fluorescence spectra of the 10 μm lung tissue sections under the 442 nm laser light
(a) normal tissue ; (b) carcinomatous tissue

对癌组织,如图 4(b) 所示,其内源性荧光光谱也不同于正常组织,它除了在绿光部分的峰位红移到 515 nm 外,荧光强度也比正常组织弱得多,并且在癌组织样品某些部位的荧光光谱还出现位于 685 nm 的小荧光峰,该荧光峰的出现可能与因癌组织的新陈代谢变化或微生物合成而产生的内源性卟啉有关^[12]。此外,从所测得的显微荧光光谱可见,血红蛋白的影响不大,并没有出现块状组织自体荧光光谱上血红蛋白 540 nm 和 580 nm 的吸收峰^[3,5],这主要是因为所测的支气管组织切片很薄(仅 10 μm)的缘故。

据文献^[3,5,7]报道,胶原蛋白和黄素是产生支气管组织内源性荧光的主要成分。因为胶原是粘膜层的主要发光基团,它在激光的诱导下能发出位于

460 ~ 590 nm 波段很强的绿色荧光,而氧化核黄素,核黄单核苷酸及核黄双核苷酸等黄素类荧光团能吸收 450 nm 左右的可见光并发出很强的、峰位在 510 ~ 520 nm 左右的荧光,但还原的黄素不发荧光。一些研究已证实^[3,5],肿瘤组织中核黄素的含量低于正常组织。因此,肿瘤组织和正常组织中荧光基团,如氧化与还原形式的黄素的浓度差异是造成内源性荧光强度差异的原因之一。此外,发源于支气管上皮层的癌细胞使上皮层增厚且它不发黄绿光,由于上皮层的增厚而使激发光和荧光的强度衰减,是造成临床观察到的癌组织荧光强度比正常组织弱的又一主要原因。

4 结 论

本文运用新型的显微分光光度系统,测量了 442 nm 激光激发人肺正常组织和癌组织切片的内源性显微荧光光谱和图像。结果发现,正常支气管组织的荧光图像具有明显的层状结构,但各层荧光基团分布是不均匀的,主要分布在粘膜层;临床上,在组织表面探测到的“宏观”自体荧光是不止一种的荧光基团共同作用的结果;癌组织和正常组织内源性荧光在组织学结构上的显著差异也进一步说明:激光诱导生物组织自体荧光法将成为肺癌早期诊断和定位的一种有效手段。本文的“微观”研究结果是深入定量地理解临床上“宏观”自体荧光光谱的特征及其发光机制的基础。

参 考 文 献

- 1 S. Lam, Timothy Kennedy, Michael Unger *et al.*. Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest*, 1998, **113**(3) 696 ~ 702
- 2 O. J. Balchum, D. R. Doiron, A. E. Profio *et al.*. Fluorescence bronchoscopy for localizing early bronchial cancer and carcinoma in situ. *Recent Results in Cancer Research*, 1982, **82** 97 ~ 120, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
- 3 G. C. Tang, A. Pradhan, R. R. Alfano. Spectroscopic differences between human cancer and normal lung and breast tissues. *Lasers in Surg. & Med.*, 1989, **9** 290 ~ 295
- 4 S. Lam, J. Hung, B. Palcic. Detection of lung cancer by ratio fluorometry with and without photofrin II. *SPIE*, 1990, **1201** 561 ~ 568
- 5 J. Hung, S. Lam, J. C. LeRiche *et al.*. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg. Med.*, 1991, **11** 99 ~ 105
- 6 S. Lam, J. Y. C. Hung, S. M. Kennedy *et al.*. Detection of dysplasia and carcinoma in situ by ratio fluorometry. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **146** 1458 ~ 1461
- 7 S. Lam, C. MacAulay, *et al.*. Fluorescence imaging of early lung cancer. *SPIE*, 1995, **2324** 2 ~ 8
- 8 A. E. Profio, D. R. Doiron, J. Sarnaik. Fluorometer for endoscopic diagnosis of tumors. *Med. Phys.*, 1984, **11** 516 ~ 520
- 9 S. Montan, K. Svanberg, S. Svanberg. Multicolor imaging and contrast enhancement in cancer-tumor localization using laser-induced fluorescence in hematoporphyrin-derivative bearing tissue. *Opt. Lett.*, 1985, **10**(2) 56 ~ 58
- 10 H. Kato, T. Imaizumi, K. Aizawa. Photodynamic diagnosis in respiratory tract malignancy using an excimer dye laser system. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1990, **6** 189 ~ 196
- 11 H. Zeng, C. MacAulay, D. I. McLean *et al.*. Novel microspectrophotometer and its biomedical applications. *Opt. Eng.*, 1993, **32**(8) 1809 ~ 1814
- 12 D. M. Harris, J. Weekhaven. Endogenous porphyrin fluorescence in tumours. *Lasers Surg. Med.*, 1987, **7** 467 ~ 472