

文章编号: 0258-7025(2009)10-2636-06

# 单细胞水平的光纤共焦后向散射显微光谱

王 成<sup>1</sup> 方宝英<sup>1</sup> 蔡文杰<sup>1</sup> 徐安成<sup>1</sup> 陈 芸<sup>2</sup> 李 延<sup>2</sup> 魏勋斌<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 上海理工大学医学光学与视光学研究所, 上海 200093; <sup>2</sup> 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

**摘要** 为了在实验上分析人正常胃上皮细胞与癌变细胞的显微后向散射光谱的区别, 为临床医学检测提供实验依据, 在光纤共聚焦显微成像技术基础上, 结合细胞散射理论, 建立了一套基于光纤共聚焦的细胞检测显微光谱分析装置, 能够同时获取细胞显微图像和显微光谱医学信息。利用本装置测量了贴壁人正常和癌变胃上皮细胞, 得到细胞水平的显微光谱特性。波长在 500~800 nm, 癌变细胞的散射光强明显高于正常细胞所对应的散射光强; 正常细胞所对应的光谱曲线中, 800~1000 nm 范围内有规则强度变化, 癌细胞没有出现这种干涉; 说明本装置适用于细胞的癌变检测, 而且实验结果与现有理论预测结果一致。理解不同病理阶段的细胞光散射特性有助于为在体实时检测早期癌变组织提供有利的光学手段。

**关键词** 光谱; 散射; 共聚焦; 癌; 细胞

中图分类号 O436.2 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2636

## Fiber Confocal Back-Scattering Micro-Spectrum in Single Biology Cellular Scale

Wang Cheng<sup>1</sup> Fang Baoying<sup>1</sup> Cai Wenjie<sup>1</sup> Xu Ancheng<sup>1</sup> Chen Yun<sup>2</sup>  
Li Yan<sup>2</sup> Wei Xunbin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Medical Optics & Optometry, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China*  
<sup>2</sup> *Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China*

**Abstract** In order to analyze experimentally the back-scattering micro-spectrum difference between human normal stomach epithetic cell and the cancerous cell to provide optical technique for clinical checking, a micro-spectral measurement setup for checking cell was established based on fiber confocal microscopically imaging technique combined with cell light scattering theory. It could provide micro-imaging and micro-medical spectral information simultaneously. Adherent monolayer human normal gastric epithelium line GES-1 and human carcinoma cell line NCI-N87 were measured with the setup respectively. The spectral results illuminated that micro-back-scattering intensity from NCI-N87 cells was stronger than that from GES-1 in 500~800 nm range, and GES-1's scattering spectrum showed a regular intensity change but NCI-N87's didn't. It indicates that fiber confocal back scattering (FCBS spectrometer) micro-spectral measurement system established can distinguish normal from dyplastic cell at cellular level. The experimental results agree well with theoretical expecting results from literature. Understanding the cell scattering properties of different pathological phases will aid in the development of noninvasive optical techniques for detection of precancerous conditions.

**Key words** spectrum; scattering; confocal; cancer; cell

## 1 引 言

在人体中所有癌变的 85% 都发生在组织内表

面的上皮细胞。虽然这些癌变在原位癌阶段可以诊断并被救治, 但这些早期的病灶几乎不可能被检

收稿日期: 2009-01-08; 收到修改稿日期: 2009-04-21

基金项目: 上海市重点学科发展基金(B109)、国家 985 二期, 上海市教育发展基金(2007CG62)和上海高校选拔优秀青年教师科研专项基金(571211)资助课题。

作者简介: 王 成(1977—), 男, 副教授, 主要从事医学光学与视光学等方面的研究。E-mail: shhwangcheng@yahoo.com.cn

测<sup>[1]</sup>。新光学方法的快速发展为细胞生物学和病理学提供了良好的技术条件,既能研究活体细胞也能在体进行组织诊断<sup>[2]</sup>。光学技术变得如此受关注,主要是因为可见光和近红外光对活体细胞是相对安全的,这可以使细胞在其自然状态下进行研究,可以获得细胞成分和结构的光学特性。对于组织活检和病理学分析的无创光学技术与传统的病理学方法有几个优点。例如:可以实时获得生物信息,并能同时对怀疑部位进行处理;而且,消除了组织切除的并发症和感染的可能性<sup>[3]</sup>。

然而光与组织相互作用的一个基本形式就是弹性光散射。有核细胞的光散射包含细胞尺寸和细胞形态的信息<sup>[4,5]</sup>。对生物细胞的光散射的基本理解与癌变和组织病理学的许多无创医学诊断技术有关。如光学层析成像(OCT)<sup>[6]</sup>、弹性散射光谱仪<sup>[7]</sup>、共聚焦显微镜技术<sup>[8]</sup>等都是依据组织与作用的光散射产生的信号开发出来的对生物组织进行无创、实时光学诊断的方法。在细胞对光散射的理论研究中,主要有3个方面的研究:1)基于Mie理论的球形<sup>[9]</sup>和同心双球模型<sup>[10]</sup>的细胞散射分析,这是细胞散射分析的基础理论;2)在Mie理论的基础上的近似和发展,如瑞利-德拜-甘斯近似理论下的双椭球模型分析<sup>[10,11]</sup>等;3)利用时域有限差分(FDTD)建立复杂结构细胞模型分析细胞的散射特性<sup>[12]</sup>。光散射测量方面,光散射光谱仪<sup>[13,14]</sup>是一种通过测量与角度有关的后向散射光的光谱可以分析出细胞器形态的量化信息的光学技术。Tao T. Wu等<sup>[15]</sup>使用弹性散射光谱研究了乙酸对子宫癌细胞和细胞成分导致的光散射的变化。Yang Liu等<sup>[16]</sup>报道了一个能同时在单像素上得到背向散射光谱和显微图像的弹性后向散射光谱显微镜。Hui Fang等<sup>[17]</sup>已经开发出一种新的光学技术,称为共聚焦光吸收和散射光谱显微镜,可以在活细胞上观察亚微米尺度的细胞内结构。但他们都没有给出实际的细胞散射光谱,只分析了系统的分辨能力。

本文报道一种新设备——光纤共聚后向散射(FCBS)光谱仪,来研究正常的人胃黏膜上皮细胞及其癌细胞。FCBS光谱仪是光纤共聚焦显微镜与弹性散射光谱仪结合能同时获得单细胞后向散射光谱和这个单细胞的图像。因为使用背向散射光探测亚细胞结构,所以这个仪器可以在不进行外因标记研究活体细胞。把共聚焦显微镜技术与弹性散射光谱技术结合成为适合在细胞水平上无创地研究活细胞,而以前的光散射光谱仪研究主要集中在细胞水平上

检测显微的组织结构。使用小粒子的光散射光谱作为生物标记,根据特征的细胞器官大小和形状可以通过光散射光谱区分不同类型的细胞<sup>[14]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验装置

在共焦原理的基础上,提出采用光纤耦合器实现共焦的设想,图1给出了使用光纤作为光源和探测器的共焦成像示意图。一个单模光纤被用来传输照明光到物体使之成像,并收集来自照明焦点体积内的后向散射光<sup>[18]</sup>。图1中的光学透镜把光纤端面成像到物体上,光纤端面起到发射光源和点探测的作用,形成共聚焦探测;而光纤耦合器代替了激光共焦系统中的分光器件,实现照明与信号的分离。光纤共聚焦显微镜与光散射光谱仪(LSS)结合,称之FCBS光谱仪,它能够探测和描述活细胞的特性。因为焦点以外的细胞光散射信号大多数被接收物体后向散射光的光纤挡住了,形成了共焦探测。采用光纤共聚焦显微镜可以使光学探头尺寸小型化,能在体、实时获得整个上皮组织的亚细胞成像。

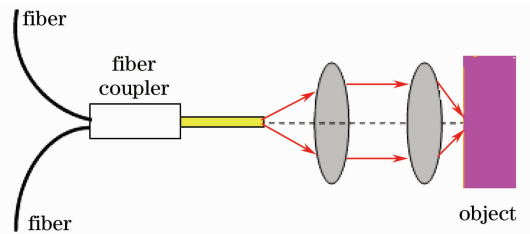


图1 使用光纤作为光源和探测器的共焦成像原理图  
Fig.1 Schematic diagram of confocal imaging using an optical fiber as the light source and the detector

接收散射光方面,FCBS光谱仪是一个与LSS不同的新技术,FCBS光谱仪在物镜数值孔径角的大角度范围接收散射光,而LSS只在 $180^\circ$ 角方向接收散射光。大大提高了信号光接收能力,提高了信噪比。

图2给出了FCBS光谱仪的原理图。在此系统中,带有特殊聚焦系统的宽带光源(B&W Tek Inc., BPS120, 20 W)发射的光线经SMA-905的标准接口耦合到 $1 \times 2, 50:50$ 分光比的多模光纤耦合器中的一个端口,其中光纤芯径为 $62.5 \mu\text{m}$ ,数值孔径为0.22。这一光纤耦合器不但是光的传输通道,也起到了共聚焦显微镜系统中的宽带分光镜的作用。而且,光纤耦合器的端口3也代替了共焦系统中的探测针孔。光纤耦合器的端口3把光源的光线耦合到光学探头,这里的光学探头由作为准直作用的消

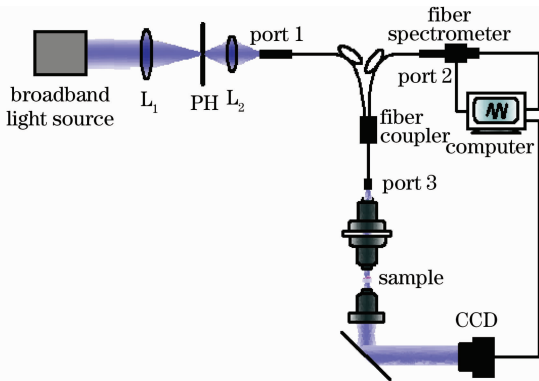


图2 光纤共焦后向散射光谱原理图

$L_1$  和  $L_2$  为透镜; PH 为针孔 ( $D=2\text{ mm}$ )

Fig. 2 Schematic of the prototype FCBS spectrometer

$L_1$  and  $L_2$ : lens; PH: pinhole ( $D=2\text{ mm}$ )

色差物镜(数值孔径为  $0.25, 10\times$ )和聚焦作用的消色差物镜(数值孔径为  $0.4, 20\times$ , 接收半角为  $23.78^\circ$ )组成。这种结构成像的横向和纵向分辨率分别为  $5\ \mu\text{m}$  和  $10\ \mu\text{m}$ 。这说明 FCBS 光谱仪系统有能力探测细胞尺度的小体积, 有光学层析的能力。细胞散射在物镜数值孔径角范围内的所有光线被光学探头接收并通过光纤耦合器端口 2 传输, 最终细胞的后向散射光被光学探头接收后由光纤耦合器分光通过端口 2 的 SMA-905 接口进入 CCD 光谱仪 (B&W Tek Inc., BRC112, USA)。此光谱仪响应较好的光谱宽带为  $600\text{ nm}$  ( $400\sim 1000\text{ nm}$ ), 光谱分辨率为  $4\text{ nm}$ 。CCD 探测的数据传输到计算机进行分析和光谱曲线的显示。为了确保物镜探测的是一

个细胞, 而不是其他的物质, FCBS 光谱仪系统设置了一个观察功能。这允许我们观测目标的视觉图像, 确保细胞的位置。照明光源由同样的光学探头的透射光提供。结构上类似于传统的临界照明的倒置显微镜。使用这个视觉系统, 不但可以直接通过人眼观测被探测细胞, 也可以采用 CCD 相机进行成像。所以这样的安排不但能确定被检测的对象是细胞, 同时也可以获得细胞的图像。

## 2.2 细胞培养

实验细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, 细胞编号分别为: 正常胃上皮细胞 (GES-1), 如图 3(a) 所示和胃癌细胞 (NCI-N87), 如图 3(b) 所示。使用合成培养基 RPMI-1640 培养液, 其主要成分有: 氨基酸、碳水化合物、无机盐、维生素及其他辅助物质。培养液中添加的是  $10\%$  国产胎牛血清。将细胞放置于  $(36.5\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$  恒温二氧化碳细胞培养箱中培养。细胞的传代均在纯净台中进行, 由于胃上皮为贴壁细胞, 传代之前还需要胰蛋白酶溶液对细胞进行消化, 胰酶的主要作用是使细胞间的蛋白质水解, 使细胞相互离散。过程中还需要用平衡盐液体 PBS 溶液冲洗。按照  $1:2$  或  $1:3$  的比例对细胞进行传代后, 将装有细胞的培养瓶和培养皿重新放回培养箱继续培养。在细胞消化和传代过程中, 还需要在显微镜下观察和捕捉细胞不同时期的性状图片, 以便进一步地研究对比。实验时所使用的样品基本上是  $24\text{ h}$  前进行传代, 并在培养皿中培养贴壁的活细胞。

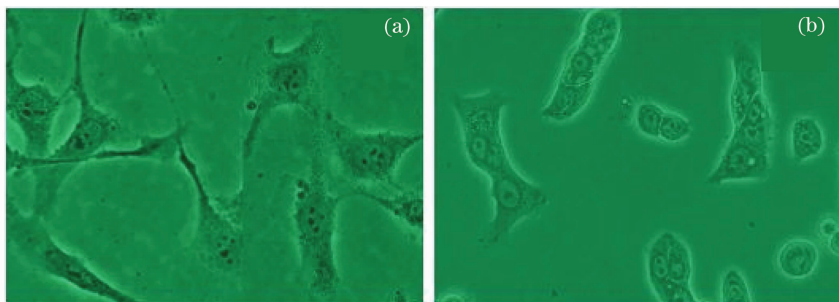


图3  $400\times$  生物显微镜下的细胞图片。(a) 正常胃上皮细胞; (b) 胃癌细胞

Fig. 3 Bio-microscopy images of cells by  $400\times$ . (a) Normal gastric epithelium cells; (b) gastric cancerous cells

## 3 实验结果

在细胞后向散射光谱的分析中, 利用硅片作为所有光谱的标准, 硅片在可见光和近红外波段的反射率为  $30\%$ , 采用如此反射率的样品为反射率标准主要考虑是细胞散射的光强度比较低, 若采用高反射率的标准反射板为参考, 会使测得的光谱对比度不高, 较难分辨不同波段的光谱, 太低会使光谱仪的

信号饱和, 也不能真实反映所测样品的真实光谱特性。图 4, 5, 是利用本实验装置获得的细胞后向散射光谱曲线。图 4(a) 是人胃正常黏膜细胞 GES-1 后向散射光谱曲线, 图 4(b) 是胃癌细胞 NCI-N87 的后向散射光谱曲线。纵坐标表示细胞后向散射光谱相对参考硅片反射的后向散射光强度比, 曲线的波长范围:  $450\sim 800\text{ nm}$ 。图 5 给出了人胃正常黏

膜细胞 GES-1 图(5a)和胃癌细胞 NCI-N87 图 5(b) 的后向散射光谱曲线, 曲线的波长范围: 800 ~

1000 nm。两个光谱涵盖了从可见光波段到近红外 波段的谱线特征。

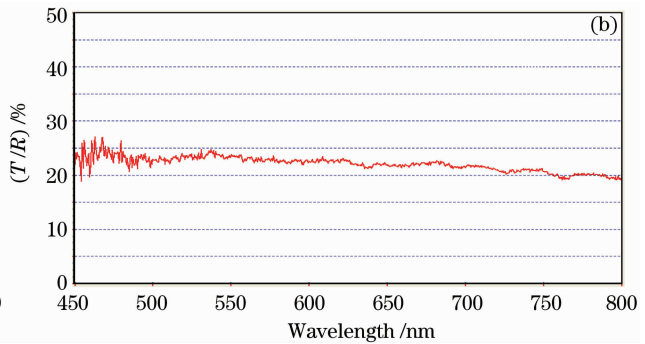
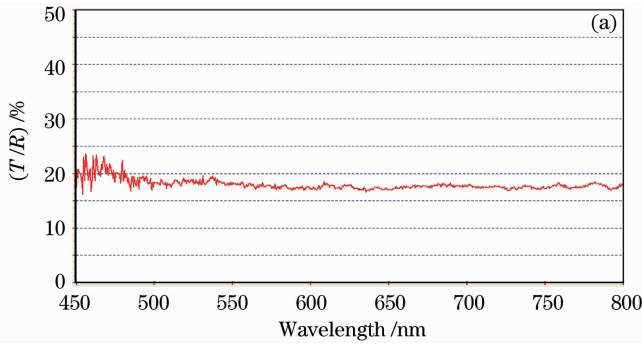


图 4 450~800 nm 内正常胃细胞 GES-1(a)和癌变胃细胞 NCI-N87(b)的显微后向散射光谱

Fig. 4 Micro-backscattering spectrum of normal gastric cell GES-1 (a) and cancerous gastric cell NCI-N87 (b) from 450 nm to 800 nm

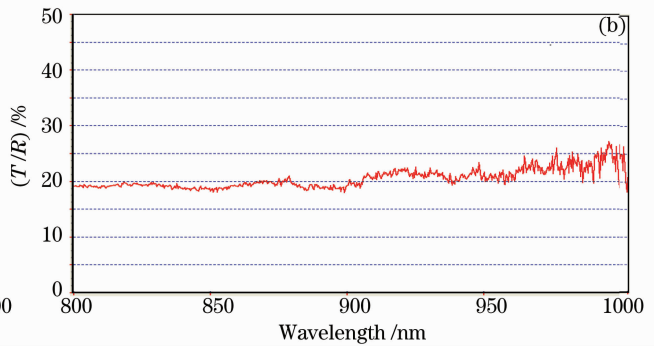
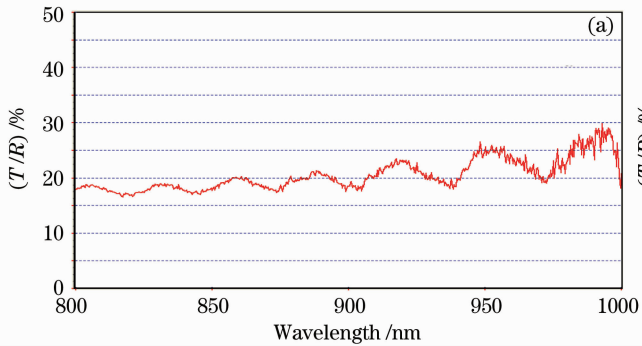


图 5 800~1000 nm 内正常胃细胞 GES-1(a)和癌变胃细胞 NCI-N87(b)的显微后向散射光谱

Fig. 5 Micro-backscattering spectrum of normal gastric cell GES-1 (a) and cancerous gastric cell NCI-N87 (b) from 800 nm to 1000 nm

为了说明本系统的性能,对上述细胞进行了多次测量,测量结果经归一化后的结果如图 6,7 所示。各光谱归一化的目的主要是消除系统误差,确保每条光谱强度不影响分析结果。图 6 为人正常胃上皮细胞的多次测量(20 次)后各光谱归一化后的结果,图 7 为癌变细胞的多次测量后各光谱归一化的结果(图中各给出 4 条归一化光谱)。

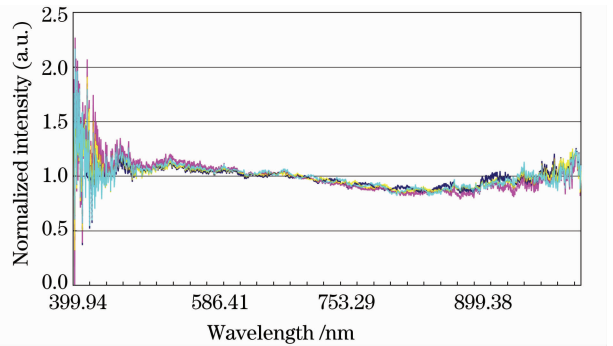


图 7 胃癌变细胞 NCI-N87 的归一化光谱(4 条)

Fig. 7 Normalized spectrum of human gastric cancerous cell NCI-N87

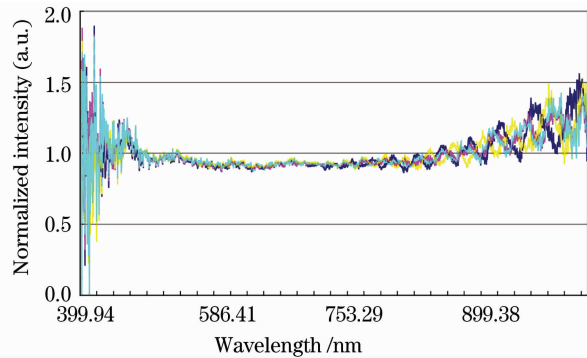


图 6 正常胃细胞 GES-1 的归一化光谱(4 条)

Fig. 6 Normalized spectrum of human normal gastric cell GES-1

### 4 讨 论

由图 4(a),(b)比较可见,在 450~800 nm 波长范围内,癌变细胞的散射光强明显高于正常细胞所对应的散射光强,这是由于细胞癌变后,染色体形状改变和染色体聚集,以及细胞质成分的改变引起的折射率变化,提高了散射系数,系统接收到更多后向散射信号,导致散射光强的增大<sup>[10~19]</sup>。



图 5(a) 为正常细胞所对应的光谱曲线中, 800~1000 nm 范围内有规则的强度变化, 分析表明这是由于正常细胞内部结构相对规律, 虽然核也是不均匀分布的, 但变化率不大, 所以, 细胞壁和细胞核之间形成对照明光的干涉; 而图 5(b) 所示的癌变细胞的内部结构和生化特性发生变化, 使细胞内部不均匀加重, 所对应的光谱曲线便没有出现强度的规则变化。

由图 6 和图 7 比较可以看出, 同种细胞的后向散射显微光谱归一化后都具有相同的光谱特征, 说明本系统可以提供重复性良好的测试结果。

当组织癌变时, 不但发生细胞形态的变化, 如细胞核质比、细胞核形状、细胞边界等的差异, 同时也发生生化特性的变化, 如 DNA 浓度增加、过染色等的细胞内变化。这些变化都会使光与细胞相互作用时, 光学特性发生改变。在文献[19]中, 采用 FDTD 计算分析了细胞光散射特性。为了说明细胞形态变化对细胞光散射的影响, 细胞外型尺度都是 9  $\mu\text{m}$ , 异常细胞相对于正常细胞最明显的区别是核尺寸, 核质比(正常 0.2, 异常 0.67), 不对称的核形状, DNA 浓度的增加和过染色核。其计算结果为异常细胞的散射强度明显高于正常细胞的散射光强; 散射光强光分布中没有出现明显的干涉峰。然而, 虽然正常细胞也存在不均匀的细胞结构, 但这些结构不足以破坏细胞质与细胞和界面的干涉峰。实验结果与理论预测结果比较, 从光谱趋势上具有较好的一致性。

## 5 结 论

光纤共聚焦显微镜技术与弹性散射光谱分析技术结合, 搭建了用于细胞显微光谱分析的实验装置, 本装置充分考虑了如何捕捉单个细胞进行研究, 采用倒置显微镜的成像系统对细胞进行成像, 这样不但可以对细胞实时成像, 捕捉研究目标, 还可以了解所采集的光谱的研究对象, 保证了探测的精准。实验上, 取传代后贴壁生长 24 h 的胃上皮正常和癌变细胞作为实验样品, 进行实验研究, 获取到具有差别的光谱曲线。曲线分析表明, 波长在 500~800 nm 范围内, 癌变细胞的散射光强明显高于正常细胞所对应的散射光强, 这是由于细胞癌变后, 染色体形状改变和染色体聚集, 以及细胞质成分的改变引起的折射率变化, 提高了整体的散射系数, 系统接收到更多后向散射信号, 导致散射光强的增大; 正常细胞所对应的光谱曲线中, 800~1000 nm 范围内有规则的强度变化, 分析表明这是由于正常细胞内部结构相

对规律, 而且折射率一致, 所以, 细胞壁和细胞核之间形成对照明光的干涉; 而癌变细胞的光谱曲线没有出现干涉是由于内部形态和生化特性的变化, 内部形态和成分不均匀性增加导致的。本文所建立的光纤共聚焦显微光谱测量系统, 能够在细胞水平上辨别正常和癌变细胞, 有希望用于癌症检测。

## 参 考 文 献

- 1 V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman *et al.*. Detection of preinvasive cancer cells[J]. *Nature*, 2000, **406**: 35~36
- 2 Wang Cheng, Fan Jin, Ren Qiushi. Visible light reflectance spectrum for measurement of cancerous tissue[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **13**(1): 33~36  
王 成, 范 瑾, 任秋实. 癌变组织可见光反射光谱测量[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **13**(1): 33~36
- 3 J. R. Mourant, M. Canpolat, C. Brocker *et al.*. Light scattering from cells; the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status[J]. *J. Biomedical Opt.*, 2000, **5**(2): 131~137
- 4 Judith R. Mourant, James P. Freyer, Andreas H. Hielscher *et al.*. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics [J]. *Appl. Opt.*, 1998, **37**(16): 3586~3593
- 5 R. Drezek, M. Guillaud, T. Collier *et al.*. Light scattering from cervical cells throughout neoplastic progression: influence of nuclear morphology, DNA content, and chromatin texture[J]. *J. Biomedical Opt.*, 2003, **8**(1): 7~16
- 6 J. G. Fujimoto. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging [J]. *Nature Biotechnol.*, 2003, **21**: 1361~1367
- 7 L. Lovat, S. Bown. Elastic scattering spectroscopy for detection of dysplasia in Barrett's esophagus[J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am.*, 2004, **14**(3): 507~517
- 8 P. J. Dwyer, C. A. Dimarzio, J. M. Zavislan *et al.*. Confocal reflectance theta line scanning microscope for imaging human skin in vivo[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**: 942~944
- 9 A. Brunsting, P. F. Mullaney. Light scattering from coated spheres; model for biological cells[J]. *Appl. Opt.*, 1972, **11**(3): 675~680
- 10 P. M. A. Sloot, C. G. Figdor. Elastic light scattering from nucleated blood cells: rapid numerical analysis [J]. *Appl. Opt.*, 1986, **25**(19): 3559~3565
- 11 Wang Yawei, Bu Min, Cui Qingyi *et al.*. Dynamic characters of light scattering intensity distribution for a nuclear-cell [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(10): 1434~1439  
王亚伟, 卜 敏, 崔青义等. 有核细胞光散射强度分布的动态特性[J]. *中国激光*, 2006, **33**(10): 1434~1439
- 12 P. M. A. Sloot, C. G. Figdor. Elastic light scattering from nucleated blood cells: rapid numerical analysis[J]. *Appl. Opt.*, 1986, **25**(19): 3559~3565
- 13 Rebekah Drezek, Andrew Dunn, Rebecca Richards-Kortum. Light scattering from cells: finited-difference time-domain simulations and goniometric measurements [J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(16): 3651~3660
- 14 M. Xu, T. T. Wu, J. Y. Qu. Unified Mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures [J]. *J. Biomedical Opt.*, 2008, **13**(3): 024015
- 15 Tao T. Wu, Jianan Y. Qu. Assessment of the relative contribution of cellular components to the acetowhitening effect in cell culture and suspensions using elastic light-scattering

- spectroscopy [J]. *Appl. Opt.* , 2007, **46**(21/20): 4834~4842
- 16 Yang Liu, Xu Li, Young L. Kim *et al.*. Elastic backscattering spectroscopic microscopy [J]. *Opt. Lett.* , 2005, **30** ( 18 ): 2445~2447
- 17 Hui Fang, Le Qiu, Edward Vitkin *et al.*. Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy [J]. *Appl. Opt.* , 2007, **46**(10): 1760~1769
- 18 Sung Kungbin. Fiber optic confocal reflectance microscopy: in vivo detection of pre-cancerous lesions in epithelial tissue[D] . Austin: University of Texas, 2003
- 19 Rebekah Drezek, Andrew Dunn, Rebecca Richards-Kortum. A pulsed finited-difference time-domain ( FDTD ) method for calculating light scattering from biological cells over broad wavelength ranges [J]. *Opt. Express.* , 2006, **6**(7): 147~156