

文章编号: 0258-7025(2009)03-0765-04

甲状腺组织的双光子荧光成像

李钻芳¹ 黄祖芳¹ 陈荣¹ 力超² 林少俊² 陈燕坪²

(¹ 福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007)
² 福建省肿瘤医院病理科, 福建 福州 350014)

摘要 分别对离体新鲜的正常甲状腺组织、结节性甲状腺肿组织以及甲状腺乳头状癌组织进行自体双光子激发荧光(TPEF)和二次谐波(SHG)成像的研究。从双光子图像可知,正常甲状腺组织中滤泡大小较均匀,形态较相似,结节性甲状腺肿滤泡大小不等,而甲状腺癌组织则为大量的实质性癌细胞团结构,结果与标准组织学苏木精-伊红(H&E)染色图相一致。此外,正常甲状腺组织和结节性甲状腺肿在胶原分布上存在一定差别。研究表明,双光子荧光成像技术可在微观结构上分辨出正常甲状腺组织、结节性甲状腺肿组织以及甲状腺乳头状癌组织的形态学差异,并有望成为甲状腺微创、快速诊断的有效方法。

关键词 医用光学与生物技术;双光子;荧光成像;甲状腺组织

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093603.0765

Two-Photon Fluorescence Imaging of Thyroid Tissue

Li Zuanfang¹ Huang Zufang¹ Chen Rong¹ Li Chao² Lin Shaojun² Chen Yanping²

(¹ Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China)
² Department of Pathology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou, Fujian 350014, China)

Abstract By using two-photon excited fluorescence (TPEF) and second harmonics generation (SHG), we imaged fresh ex vivo thyroid tissues, including normal thyroid tissue, nodular thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma tissue. As can be seen, the follicles in normal thyroid tissue are in uniform size and shape, while in nodular thyroid tissue the follicles are in different size, and there are abundant substantial cancer cells in papillary thyroid carcinoma. These results are consistent with the corresponding standard H&E histology imagings. Furthermore, the collagen distributions in normal thyroid tissue and nodular thyroid tissue are observed to be different. These results suggest that the two-photon fluorescence microscopy imaging can distinguish the morphologic differences between normal thyroid tissue, nodular thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma tissue in microstructure, and it has the potential to be used for minimal invasive and rapid diagnosis of thyroid cancer.

Key words medical optics and biotechnology; two-photon; fluorescence imaging; thyroid tissue

1 引言

近红外光对生物样品的激发具有光损伤小、穿透深度深和荧光收集率高等优点。结合双光子激发荧光(TPEF)与二次谐波(SHG),配以可调谐近红外激发光源的多光子显微镜技术,可以通过细胞内的双光子激发荧光以及细胞外胶原纤维二次谐波提供实时的内生差异信息。因 TPEF/SHG 图像能很

好地提供组织细胞内外结构形态方面的信息,多光子显微技术已经成功应用于脑、神经、皮肤、眼科、口腔、肠胃等各种组织成像以及光学活检领域^[1~5]。

甲状腺癌占人类恶性肿瘤的1%,是所有内分泌器官中恶性肿瘤发病率最高的,近年来发病率逐年上升,早期诊断非常重要。目前较常用的诊断方法是术中快速冰冻切片检查和细针穿刺细胞学检

收稿日期:2008-07-09;收到修改稿日期:2008-08-20

基金项目:国家自然科学基金(60778046,60711120031)和福建省科技厅(2008J0015,2008J0016)资助项目。

作者简介:李钻芳(1984—),男,硕士研究生,主要从事生物医学光学研究。E-mail:lizuanfang@163.com

导师简介:陈荣(1950—),男,教授,博士生导师,主要从事生物医学光学研究。

E-mail:chenr@fjnu.edu.cn (通信作者)

查^[6,7],但仍存在漏诊或误诊情况。采用拉曼光谱、红外光谱和自体荧光光谱等方法对甲状腺癌组织的研究,取得了一些结果^[8~11],但这类方法单纯地依赖光谱技术,而不能提供组织形态学的信息。

本文基于激光扫描显微成像系统,对甲状腺新鲜离体组织进行双光子显微成像,结合 SHG 成像技术,试图在细胞层次上揭示正常甲状腺组织、结节性甲状腺肿以及甲状腺乳头状癌组织的差异。

2 材料与方 法

2.1 仪器系统

采用的仪器由双光子显微镜系统(Axiovert 200, Zeiss LSM 510 META)和锁模钛宝石飞秒激光器(110 fs, 76 MHz, 波长范围 700~980 nm)组成。实验装置如图 1 所示(AOM 为声光调制器, MDBS 为主二色分光镜, IR 为近红外滤光片, PMT 为光电倍增管, BS 为分束器)。飞秒脉冲激光经由主二色分光镜(Main Dichroic Beam Splitter, MDBS)进入共焦显微镜的扫描器,然后由 63×物镜(A Plan-Apochromat, 63×, NA = 1.4 oil immersion objective, Zeiss)聚焦于样品表面。扫描显微系统主要由 *xy* 扫描器和步进电动机(HRZ 200, Zeiss)组成。*xy* 扫描器能快速扫描光束以获得 XY 图像。获得图像中的每个像素所需时间为 2.56 μs。步进电动机则将样品在 *z* 方向移动,以便系统获取光学切片,实现光层析。TPEF/SHG 信号由一高质量反射光栅和 32 通道 PMT 阵列组成的 META 探测器接收。META 探测器前的红外(IR)滤光片(Zeiss, KP650)过滤激发光。激光激发波长为 730 nm 和 850 nm。因为 730 nm 激发波长最适合成像细胞结构,而在 850 nm 激发波长激发下,胶原纤维主要发生光学二次谐波效应,这样可以避免产生自体荧光而损伤生物组织。

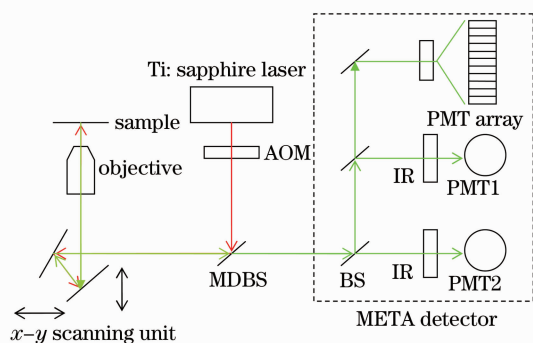


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

本实验采用两个独立的探测通道,一个通道接收 SHG 信号(409~441 nm),另一个则接收 TPEF 信号(441~719 nm)。得到的点扫描图像为 512 pixel×512 pixel,获得一整幅图像的时间为 1.57 s,到样品表面的激光平均功率小于 15 mW。大面积扫描图像则由 9 幅 512 pixel×512 pixel 的图像组成,成像面积为 691 μm×691 μm。

2.2 样品处理

人体甲状腺组织样品均由福建省肿瘤医院病理科提供。外科手术切除的新鲜样品立即存放于 -20℃ 冰箱中,带到显微镜实验室。实验在甲状腺组织手术切除后 4 h 内完成。之后将样品浸泡在体积分数为 10% 的甲醛缓冲液中进行固定,石蜡包埋,切片,作组织学苏木精-伊红(H&E)染色。

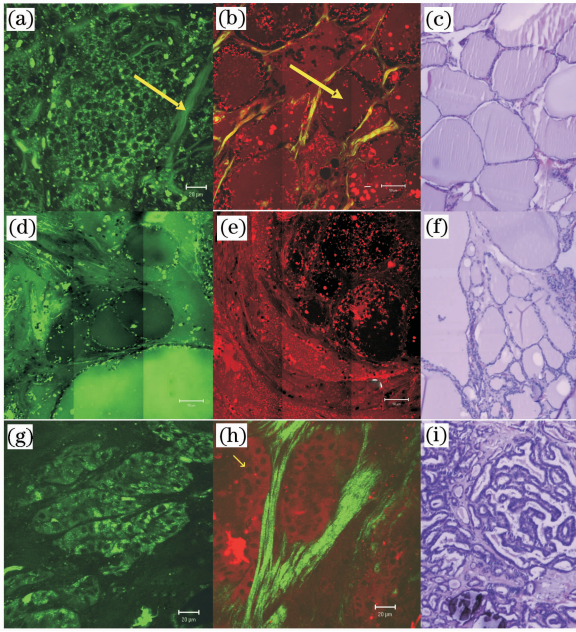
3 结果与讨论

对 11 例离体甲状腺组织样品进行成像,包括 4 例正常甲状腺组织,3 例结节性甲状腺肿以及 4 例甲状腺乳头状癌组织样品。实验所用的乳头状癌组织样品均来源于癌巢大小在 2 cm 以上的病人。

图 2(a)~(c)分别是 730 nm, 850 nm 激发下得到的具有代表性的正常甲状腺组织的 TPEF/SHG 图像及其 H&E 染色切片图。正常甲状腺组织由滤泡组成,滤泡内充满胶质,滤泡由单层立方的滤泡上皮细胞围成。如图 2(a)所示,正常甲状腺滤泡呈蜂窝状结构,大小较为一致,可见少量的弹性纤维(箭头所示)。图 2(b)是 850 nm 激发、大面积扫描模式下得到的。滤泡结构清晰可见,颜色较浅区域为滤泡内胶质(箭头所示)。图 2(c)则是对应组织的 H&E 染色切片图。

图 2(d)~(f)分别是 730 nm, 850 nm 激发下得到的具有代表性的结节性甲状腺肿的 TPEF/SHG 图像及其 H&E 染色切片图。明显不同于图 2(a),结节性甲状腺肿滤泡大小不等,滤泡上皮受压变扁平或低立方状。由于胶质的变性,在结节中形成大小不等、形状不一的囊腔(图 2(d), (e))。如进一步互相融合,就形成囊肿。结节性甲状腺肿的包膜厚薄不均,可见多个大小不等的挤压甲状腺滤泡存在(图 2(f))。

图 2(g)~(i)分别是 730 nm, 850 nm 激发下得到的具有代表性的甲状腺乳头状癌组织的 TPEF/SHG 图像及其 H&E 染色切片图。图 2(g)所示的是实性的癌细胞团,呈分枝乳头状,细胞核常为椭圆形,排列不齐、极向紊乱。850 nm 波长激发得到的



(a)~(c) TPEF/SHG imaging of normal thyroid tissue with the excitation wavelength of 730 nm and 850 nm, and H&E stained section of the sample; (d)~(f) TPEF/SHG imaging of nodular thyroid tissue with the excitation wavelength of 730 nm and 850 nm, and H&E stained section of the sample; (g)~(i) TPEF/SHG imaging of papillary thyroid carcinoma with the excitation wavelength of 730 nm and 850 nm, and H&E stained section of the sample. Frames of Figures (a), (g) and (h) are 512 pixel \times 512 pixel. Frames of Figures (b), (d) and (e) are 1536 pixel \times 1536 pixel. Magnification of Figures (c), (f) and (i) is 40 \times

图2 三种甲状腺组织的 TPEF/SHG 图像及对应 H&E 染色切片图

Fig.2 TPEF/SHG imagings of three different kinds of thyroid tissue and corresponding H&E stained section of each sample

图像中,在胶原纤维的包绕下,癌细胞结构更加明显(图 2(h))。图 2(i)是对应的 H&E 染色切片图,切片多见乳头断面。

比较图 2 不同组织的 TPEF/SHG 图像,可以观察到几个比较显著的特征。首先,滤泡的大小形态及细胞核的异形性差异;正常组织中滤泡大小较为均匀,形态相似。结节性甲状腺肿组织中滤泡大小不一,形态发生了变化,出现大小不一的结节。而甲状腺乳头状癌组织中细胞排列呈乳头状、腺泡状,核呈毛玻璃状,异形性大。其次,正常甲状腺组织、结节性甲状腺肿以及甲状腺癌组织中胶原纤维分布有所不同。随着癌细胞的增生发展,发生纤维性间质反应,将组织包绕起来,正常的甲状腺分泌功能也因此受到损坏。然而,在结节性甲状腺肿组织

TPEF/SHG 图像中没有观察到大量的胶原纤维分布,并不意味着没有胶原纤维分布,因此还需对胶原纤维分布情况进行单独研究。

4 结 论

采用 TPEF/SHG 技术对新鲜的甲状腺离体组织成像,从获得的双光子荧光和二次谐波像中可以直观地分辨出正常甲状腺组织、结节性甲状腺肿以及甲状腺乳头状癌组织在形态学上的差异,而且可以分辨出各类不同组织的细胞滤泡大小分布情况。与组织学切片相比,TPEF/SHG 图像的重要优势在于不需要对组织进行切片、染色等处理。随着微型化的双光子内窥扫描系统的发展与完善,基于 TPEF/SHG 的双光子显微成像技术与甲状腺微创外科技术的结合,有望成为甲状腺疾病早期诊断的重要方法。

参 考 文 献

- 1 Kenneth W. Dunn, Pamela A. Young. Principles of multiphoton microscopy [J]. *Nephron Exp. Nephrol.*, 2006, **103**:33~40
- 2 R. Cicchi, D. Massi, S. Sestini *et al.*. Multidimensional non-linear laser imaging of basal cell carcinoma [J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(16):10135~10148
- 3 Song Fang, Xu Wencheng, Shen Minchang *et al.*. Actively mode-locked femtosecond pulse fiber laser [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(3):347~350
宋方,徐文成,申民常等.主动锁模飞秒光纤激光器[J].*中国激光*, 2008, **35**(3):347~350
- 4 Qu Xiaochao, Liang Jiaming, Yao Cuiping *et al.*. Optical properties of gold nanoparticle and its application in biological imaging and photothermal therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(11):1459~1465
屈晓超,梁佳明,姚翠萍等.金纳米微粒的光学性质及其在生物成像和光热疗法中的应用[J].*中国激光*, 2007, **34**(11):1459~1465
- 5 Xing Qirong, Wei Heying, Wang Minwei *et al.*. Study of HpD two-photon fluorescence of cancer tissue stimulated by femtosecond laser [J]. *Chinese J. Lasers*, 2000, **A27**(8):765~768
邢岐荣,魏赫颖,王明伟等.飞秒激光 HpD 双光子荧光法诊断癌症[J].*中国激光*, 2000, **A27**(8):765~768
- 6 S. Olson, Y. Cheema, J. Harter *et al.*. Does Frozen section alter surgical management of multinodular thyroid disease? [J]. *Journal of Surgical Research*, 2006, **136**:179~181
- 7 H. Mazeh, N. Beglaibiter, D. Prus *et al.*. Cytohistologic correlation of thyroid nodules [J]. *The American Journal of Surgery*, 2007, **194**:161~163
- 8 Li Rong, Zhou Guangming, Peng Hongjun *et al.*. FT-Raman spectroscopic investigation on hypothyroid cancer [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(10):1868~1870
李蓉,周光明,彭红军等.甲状腺癌组织的傅里叶变换拉曼光谱研究[J].*光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(10):1868~1870
- 9 Liu Renming, Ji Yong, Tang Weiye *et al.*. A study of the features of human thyroid cancer tissues with infrared

spectrometry [J]. *Henan Journal of Oncology*, 2006, **19**(2): 99~100

刘仁明, 冀 勇, 唐伟跃 等. 人体甲状腺癌组织红外光谱特征的研究[J]. *肿瘤基础与临床*, 2006, **19**(2): 99~100

- 10 Chen Rong, Zeng Haishan, Huang Baohua *et al.*. Fluorescent spectrum of skin with trichrome vitiligo [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(1): 124~128

陈 荣, 曾海山, 黄宝华 等. 具有三种颜色的白癜风皮肤的荧

光光谱[J]. *光学学报*, 2007, **27**(1): 124~128

- 11 Yang Junyi, Ma Hongliang, Lu Bo *et al.*. Raman spectroscopy study of phase transformation of TiO₂ rutile single crystal induced by infrared femtosecond laser [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(10): 1909~1912

杨俊毅, 马洪良, 鲁 波 等. 飞秒激光诱导二氧化钛金红石单晶相变的拉曼光谱研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(10): 1909~1912

Chinese Optics Letters (《中国光学快报》) 2009 年“*Nanophotonics*”和“*Digital and Computer-Generated Holography*”

专题征稿启事

Chinese Optics Letters (《中国光学快报》) 计划于 2009 年 10 月在正刊上推出“*Nanophotonics*”(“纳米光子学”)专题, 特向国内外广大读者以及作者征集该方面原创性的研究论文。征稿范围包括:

- Metamaterials; negative index, cloaking and nonlinear phenomena
- Materials synthesis; molecular architectures for photonic applications, eg. carbon nanotubes, DNA and dendrimers
- Nanofabrication techniques; eg. multiphoton polymerization and nanoimprint technology
- Nanocharacterization methods and instrumentation; Near-field techniques, super-resolution and high temporal resolution
- Nanosensors; resonators and field enhancement strategies for improved sensitivity
- Photonic crystals; spatial and temporal dispersion phenomena with applications and nonlinear effects
- Plasmonics; localized and propagating surface modes, metallodielectrics, fishnet structures
- Quantum confined structures; quantum dots to quantum wells with applications to sources and detectors
- Nanostructures for energy; Dye-sensitization, plasmonic enhancement, organic and carbon based nanomaterials, quantum structures

Feature Editors:

Joseph W. Haus, Director

Electro-Optics Program, University of Dayton, Dayton, USA

Yiping Cui

Advanced Photonics Center, Southeast University, Nanjing, China

截稿日期: 2009 年 5 月 30 日

Chinese Optics Letters (《中国光学快报》) 计划于 2009 年 12 月在正刊上推出“*Digital and Computer-Generated Holography*”(“数字与计算全息”)专题, 特向国内外广大读者以及作者征集该方面原创性的研究论文。征稿范围包括:

- Digital holography theory and systems
- Phase unwrapping
- Computer generated holograms
- Spatial light modulators for holography
- Holographic optical elements
- 2D and 3D pattern recognition
- Three-dimensional imaging and processing
- Three-dimensional display
- 2D-3D content conversion
- Shape and deformation measurement
- Holographic imaging and microscopy
- Holographic Optical Micro-Manipulation

Feature Editor:

Ting-Chung Poon, Ph. D., Professor

Bradley Department of Electrical and Computer Engineering

Virginia Tech

Blacksburg, Virginia 24061 USA

截稿日期: 2009 年 7 月 15 日

投稿方式以及格式: 可直接将稿件电子版发至邮箱: col@mail.shnc.ac.cn(主题标明“专题(上述两个专题的具体名称)投稿”), 或通过网上投稿系统直接上传稿件(投稿类型选择 focus issue submission, 备注中写明具体专题名称, 推荐用此方式投稿), 详情请参见《中国光学快报》网站: <http://www.col.org.cn>。投稿必须是英文稿, 其电子版请使用 Latex 或者 MS-Word 格式。有任何问题请发邮件至 col@mail.shnc.ac.cn 询问。