

基于光学相干层析成像技术的肿瘤细胞侵袭成像

斯培剑¹, 王玲^{1,2*}, 徐铭恩^{1,2**}

¹杭州电子科技大学自动化学院, 浙江 杭州 310018;

²浙江省医学信息与生物三维打印重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘要 构建合适的肿瘤细胞侵袭模型、开发肿瘤细胞侵袭的定量监测方法一直是癌症研究的热点。构建了厚度超过 1 mm 的三维肿瘤体外侵袭模型, 利用搭建的超宽带谱域光学相干层析成像系统, 检测了细胞的迁移和侵袭动态, 从细胞迁移距离变化和基质材料分解两方面来表征肿瘤细胞的体外侵袭过程; 通过光学相干层析成像散射界面的峰值变化来定量检测肿瘤细胞的迁移距离, 结合三维图像量化基质材料的表面曲度、厚度、整体体积变化来表征肿瘤细胞侵袭过程的基质材料分解与变形信息。结果表明: 光学相干层析成像技术检测到的肿瘤细胞侵袭引起的细胞团簇位置变化、基质材料形态改变与苏木精-伊红染色切片、激光共聚焦结果相匹配, 验证了光学相干层析成像技术检测肿瘤细胞侵袭的可行性; 通过设计不同营养梯度、不同 pH 微环境下的三维肿瘤模型, 利用搭建的光学相干层析成像系统, 准确地量化了不同时间、不同体外微环境下肿瘤细胞的迁移距离、基质材料表面曲度、厚度和整体体积变化。与苏木精-伊红染色、激光共聚焦方法相比, 所提方法可以连续监测肿瘤细胞的侵袭过程, 更全面地反映肿瘤细胞迁移和侵袭的机理。

关键词 医用光学; 光学相干层析成像技术; 细胞侵袭; 细胞三维成像; 胶原外基质

中图分类号 R73-37; O434.3

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201946.0907003

Tumor Cell Invasion Imaging Based on Optical Coherence Tomography

Si Peijian¹, Wang Ling^{1,2*}, Xu Ming'en^{1,2**}

¹School of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China;

²Zhejiang Provincial Key Lab of Medical Information and Three-Dimensional Bio-Printing, Hangzhou, Zhejiang 310018, China

Abstract Cancer research has increasingly focused on developing appropriate tumor cell invasion models and developing a quantitative method to monitor tumor cell invasion. In this study, a three-dimensional tumor invasive model with >1 mm thickness is constructed. An ultra-wideband spectral domain optical coherence tomography system is used to detect cell migration and invasion dynamics, and the *in vitro* invasion process of tumor cells is characterized by the change of cell migration distance and matrix material decomposition. The quantitative detection of tumor cell migration distance based on peak change of the optical coherence tomography scattering interface is combined with three-dimensional images to quantify the matrix surface curvature, thickness, and overall volume change, thereby realizing the characterization of the matrix material decomposition and deformation information during tumor cell invasion. The changes of cell cluster positions caused by tumor cell invasion and morphological changes of matrix materials are matched with hematoxylin-eosin staining sections and laser confocal results, which verifies the feasibility of optical coherence tomography for detecting tumor-cell invasion. Three-dimensional tumor models under different nutrient gradients and different pH microenvironments are utilized. The established optical coherence tomography system accurately quantifies the migration distance of tumor cells and surface curvature and overall volume change of matrix materials at different time and *in vitro* microenvironments. Compared with hematoxylin-eosin staining and the laser confocal imaging method, the proposed optical coherence tomography-based method enables the continuous monitoring of the invasion process of tumor cells, thereby providing a more comprehensive view of tumor-cell migration and invasion mechanisms.

Key words medical optics; optical coherence tomography; cell invasion; three-dimensional imaging of cells;

收稿日期: 2019-02-14; 修回日期: 2019-04-23; 录用日期: 2019-05-12

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1103400)、国家自然科学基金(61675059)

* E-mail: lingw@hdu.edu.cn; ** E-mail: xumingen@hdu.edu.cn

collagen extracellular matrix

OCIS codes 170.4500; 170.1530; 170.3880

1 引 言

肿瘤细胞侵袭是癌症致死的重要因素,构建合适的肿瘤细胞侵袭模型,开发肿瘤细胞侵袭的定量监测方法,对于研究癌症发病机理、探寻癌症治疗新方案、开发癌症新药等具有重要价值^[1-2]。Matrigel或胶原穿膜侵袭实验是研究肿瘤细胞在体外侵袭能力的常用方法之一,可以通过显微镜统计的穿过基质细胞的数量来表示细胞侵袭能力的强弱^[3]。受检测手段的限制,用来模拟细胞外基质的 Matrigel 或胶原厚度一般约为 10 μm ,无法为肿瘤细胞提供真实的三维环境,更无法准确模拟细胞与三维细胞外基质的相互作用^[4]。荧光显微、激光共聚焦等常规光学检测手段在三维体外模型中的成像深度受限,高散射基质材料的成像深度很难突破 100 μm 。双光子显微镜使用红外激光作为光源,结合了激光共聚焦技术和双光子激发技术,最大成像深度可达 1 mm。Kong 等^[5]利用双光子荧光探针特异性标记肿瘤,特制的荧光探针可通过近红外方式高特异性地追踪肿瘤细胞,但成像深度仅为 90 μm 。Lü 等^[6]利用纳米探针标记肿瘤,对活体肿瘤组织(直径为 300 μm)、三维肿瘤细胞球(直径为 500 μm)进行双光子成像,具有高度特异性,借助探针的特殊设计,穿透深度可以达到 500 μm 。Kilin 等^[7]基于双光子成像技术设计了肺癌研究模型 OncoCilAirTM,基于肺癌细胞自体荧光来区分三维肿瘤与正常组织的边界,穿透深度可达到 180 μm 。双光子成像分辨率高,可以实现单细胞成像,单细胞成像需要荧光标记物,无法实现细胞和材料的同时成像^[8]。外源荧光团可能会干扰细胞内的生物反应,而高强度的激发光会对细胞活性造成光损伤^[1,9-10]。光声显微成像基于物理学基质的光声效应,主要利用生物组织对于红外光的吸收不同来区分组织。Liu 等^[11]基于具有靶向性的探针,利用多尺度光声显微镜系统,对体外培养的 U87MG 肿瘤细胞以及体内 U87MG 实体肿瘤进行成像,实现了 0.1~10 mm² 的成像。Olafsson 等^[12]将超声技术与光声技术相结合,使光声成像的高精度(40 μm)与超声成像的大探测深度(>12 mm)特点相互补充,检测了肿瘤体积的变化。Ragnar 等^[13]以金纳米棒作为造影剂,将超声技术与光声技术相结合,对小鼠的前列腺肿瘤进行成像,

利用造影剂提高了光声信号的强度。光声显微成像可以实现 10 mm 的成像深度,但其分辨率仅为 30~100 μm ,无法分辨生物组织内部的精细结构^[14-15]。如果提高分辨率,就会使成像深度减小,需要结合其他技术,如超声来改善成像深度,且光声成像信号依赖于局部光流,局部激光会随着肿瘤侵袭动态而改变,导致连续监测肿瘤细胞侵袭动态的成像非常困难。

光学相干层析成像技术(OCT)基于低相干干涉原理,深度分辨率可以达到 1~10 μm ,对高散射样品的成像深度可以达到 1~3 mm。该技术依据后向散射特性和折射率差异来识别样品内的结构和功能特性,无需荧光标记或其他外源对比剂,能对活体样品进行非接触、非侵入的横断面实时成像^[16-17]。Yang 等^[17]利用光源中心波长为 1310 nm 的时域 OCT 系统检测了肺癌细胞在三维凝胶基质中的侵袭情况,肺癌细胞表现为基质材料表面的亮层或埋在较暗基质内的亮点,并与组织切片有较好的对应关系,初步验证了 OCT 用于检测肿瘤细胞侵袭的可行性。Tan 等^[19]采用光源中心波长为 800 nm 的高分辨时域 OCT(轴向分辨率为 3 μm)系统观测了细胞在三维组织模型内的动态,通过不同时间点三维 OCT 图像的融合来检测细胞团的迁移路径。Rey 等^[20]采用光源中心波长为 800 nm 的高分辨时域 OCT 系统(轴向分辨率为 4 μm ,横向分辨率为 4 μm)观测了网柄菌属细胞在三维琼脂糖基质内的迁移,分别通过二维和三维 OCT 图像在不同时间点的融合来检测细胞的三维和四维趋药性,系统的高分辨率使得量化细胞的迁移速度成为可能。Kuo 等^[21]采用扫频 OCT 来研究射线是否会影肝癌细胞的侵袭,通过细胞与周围背景 3 倍以上的强度差异来识别肝癌细胞,基于图像分割量化肝癌细胞的侵袭距离和数量来探究射线对细胞侵袭的影响。Chu 等^[22]使用超高分辨率 OCT 研究单个上皮细胞中性粒子的跨膜迁移,通过超高分辨图像识别细胞并统计中性粒细胞的数量和分布,探究其跨膜迁移的机制。现有研究主要依据 OCT 图像来研究细胞侵袭距离的变化,背景噪声对细胞侵袭路径的轨迹影响较大,此外,这些研究没有考虑细胞侵袭过程中肿瘤细胞与基质材料的相互作用,不能反映三维环境对细胞侵袭的影响,也无法全面表征肿瘤细胞的侵袭机理。

本文构建了不同的细胞微环境,用以模拟 HepaRG 细胞在三维胶原基质内的侵袭,并通过自主开发的高分辨谱域 OCT 系统观测肿瘤细胞的侵袭过程,研究微环境对肿瘤细胞侵袭与转移的影响。首先采用 OCT 图像与苏木精-伊红染色(H-E染色)切片进行对照,验证 OCT 可视化不透明三维厚组织中细胞侵袭的可行性和准确性;然后利用基质中细胞层厚度的变化以及基质表面曲度、厚度、三维体积的变化,来反映细胞侵袭路径及细胞与基质的相互作用,通过检测不同营养梯度、不同 pH 环境下肿瘤细胞的侵袭,探讨肿瘤细胞的侵袭机理。

2 实验方法

2.1 细胞培养

将 HepaRG 细胞分别在 pH 为 6.8 的酸性培养基和 pH 为 7.2 的常规培养基中培养,常规培养采用含 10% (体积分数) 胎牛血清(简称血清)的 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基,酸性培养则是利用 HCl 将培养基的 pH 调整至酸性。将 HepaRG 细胞复苏后接种到 75 mL 的培养瓶中,然后加入 15 mL DMEM 培养基,静置培养于细胞培养箱中。培养条件如下:温度为 37 °C, CO₂ 的体积分数为 5%, 饱和湿度。待细胞生长至培养瓶底面积的 90% 时,酸性组换用酸性培养基培养 48 h, 对照组使用常规培养基培养 48 h, 然后进行后续细胞实验。

2.2 细胞侵袭实验

Matrigel 穿膜侵袭实验是研究肿瘤细胞在体外侵袭能力的常规实验之一,经常使用 Boyden 小室体外侵袭实验来检测肿瘤细胞的侵袭潜能。本文采用基于 Boyden 小室改进的 Transwell 体外细胞侵袭模型,利用牛跟腱 I 型胶原模拟细胞外基质,胶原的质量浓度为 2 mg/mL, 每个样品中加入 200 μ L 胶原,胶原成胶后的厚度约为 1 mm。实验分为酸性组和正常对照组,每组根据 Transwell 上室内血清浓度的不同分为 4 组,血清体积分数分别为 0%、2%、5%、10%。细胞消化后加入含有不同浓度血清的培养基,配制成细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液。Transwell 上室每孔加入 200 μ L 配制好的细胞悬液,下室每孔加入 600 μ L 含 10% (体积分数) 血清的 DMEM 培养基。培养条件如下:温度为 37 °C, CO₂ 体积分数为 5%, 培养时间为 48 h。培养过程中,分别在 12, 24, 48 h 时用 OCT 检测同一样品。所有检测完成后,利用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤胶原 2 次,样品洗涤完成后,用甲

醛溶液固定,并静置 30 min,用于 H-E 染色。肿瘤细胞侵袭实验原理如图 1 所示。

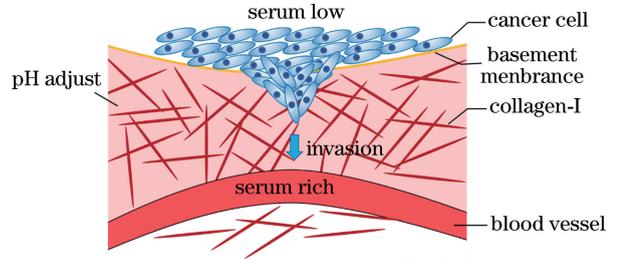


图 1 肿瘤细胞侵袭实验原理图

Fig. 1 Principle diagram of tumor cell invasion

2.3 OCT 检测

本文所用 OCT 系统的构成如图 2 所示。OCT 光源采用超宽带光源发光二极管(SLD),中心波长为 1310 nm,带宽为 245 nm,系统灵敏度为 81 dB,其在空气中的轴向分辨率为 4.6 μ m,横向分辨率为 13 μ m,空气中的最大成像深度为 3.5 mm。光源发出的光进入耦合器后被分为等光强的 2 束光,2 束光分别进入样品臂和参考臂,进入参考臂的光被平面镜反射,进入样品臂的光通过振镜扫描后聚焦照射到样品表面。样品臂的后向散射光与参考臂的反射光在耦合器中发生干涉,干涉光进入光谱仪,光栅将干涉光分光后通过聚焦透镜聚焦到电荷耦合器件(CCD)探测器上,得到干涉光谱。CCD 探测到的光谱信号由图像采集卡采集后传输到计算机,最后由计算机完成信号的处理及样品图像显示。OCT 采集的图像大小为 6 mm \times 6 mm \times 3.5 mm(空气中),每个 A-scan 的采集频率为 48 kHz。为降低系统噪声,每个 A-scan 重复采集 20 次,取平均值。

2.4 细胞侵袭量化方法

肿瘤细胞与基质材料的折射率存在明显差异,肿瘤细胞侵入基质材料后,会在 OCT 图像中表现出明显的细胞散射界面,可以通过测量上、下散射界面间的距离来定义肿瘤细胞的侵袭距离。利用阈值分割 OCT 图像边界时会在很大程度上受到主观的影响,故可以基于低相干干涉信号峰值来判断不同散射界面的边界。低相干干涉技术很早就被用于工业测量中,主要有平行盘厚度测量、光学镜片厚度测量等一维的测量应用^[23-24],维度的限制导致低相干干涉技术的应用有一定的局限性。OCT 技术基于低相干干涉技术,同时结合了基于振镜的二维扫描机构,可以测量样品的二维和三维距离,结果更加直观,对于斜面或不规则表面有更好的适应性^[25]。当肿瘤细胞侵入基质材料时,肿瘤细胞和培养基、基质

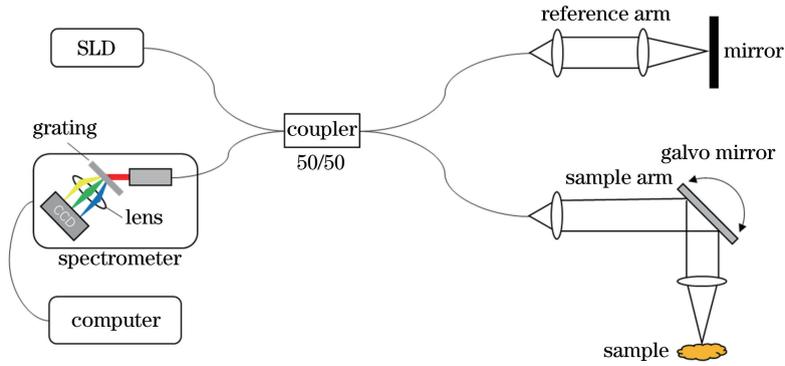


图 2 OCT 系统的构成

Fig. 2 OCT system composition

材料散射界面的折射率会发生突变, OCT 干涉信号强度会达到光强包络的峰值, 显著强于附近其他深度处的信号强度。利用“Peak-to-Peak”法测量细胞层不同散射界面 2 个信号峰之间的像素数量, 然后用像素数量乘以轴向分辨率再除以材料折射率即可得到对应点之间的实际距离^[26], 即细胞的侵袭距离, 公式为

$$D = \frac{\delta_z}{n} N_p, \quad (1)$$

式中: δ_z 为 OCT 轴向分辨率; N_p 为 2 个信号峰之间的像素数量; n 为材料的折射率。由文献[27]可知, 细胞的折射率为 1.38, 胶原的折射率为 1.43。系统的轴向分辨率决定了测量细胞侵袭距离的灵敏度。

为了验证“Peak-to-Peak”厚度测量方法的准确性和精度, 以单层厚度为 $(170 \pm 10) \mu\text{m}$ 的多层玻璃作为样品进行 OCT 测量, 并用“Peak-to-Peak”法测量玻璃厚度。图 3(a) 所示为多层玻璃的 OCT 图像。从图 3(a) 中可以看到玻璃的分层, 但无法分辨 2 块玻璃之间的缝隙。从 OCT 信号中选取一系列 A-scan 信号, 多层玻璃 OCT 信号强度的分布曲线如图 3(b) 所示。已知玻璃的折射率为 1.5, 使用“Peak-to-Peak”法, 根据(1)式计算得到上层玻璃 glass 1 的厚度为 $175 \mu\text{m}$, 下层玻璃 glass 2 的厚度为 $177 \mu\text{m}$, 2 层玻璃之间的缝隙距离为 $7 \mu\text{m}$ 。结果表明, “Peak-to-Peak”法可以根据反射界面准确地测量玻璃的厚度, 同时也可以量化 2 层玻璃之间的微小缝隙。

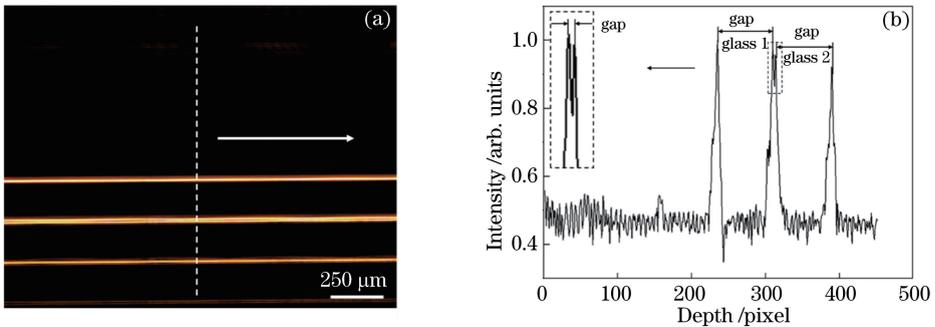


图 3 “Peak-to-Peak”算法的验证。(a)多层玻璃 OCT 图像; (b)多层玻璃 OCT 信号强度分布曲线

Fig. 3 “Peak-to-Peak” algorithm verification. (a) OCT image of multi-layer glass; (b) OCT signal intensity distribution curve of multi-layer glass

肿瘤细胞在侵入基质材料过程中会分解基质材料, 引起基质材料变形, 导致基质材料的表面曲度、厚度和体积发生变化, 可以用这些信息来量化基质材料的分解特征。胶原的表面轮廓可近似看作是一段曲线, 连接曲线两端的线段为基准线, 长度为 L , 垂直于基准线并与胶原轮廓曲线相交的线段为高度线, 长度为 H , 如图 4 所示。胶原的表面曲度 C 定

义为在 L 一定的情况下(实验中取基质材料中心区域的长度 $L = 2.5 \text{ mm}$), H 所能取到的最大值。

选取基质材料中间区域的位置, 尺寸为 $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$, 分割出基质材料, 其体积的计算公式为

$$V = \sum_{i,j,k} I(x_i, y_j, z_k), \quad (2)$$

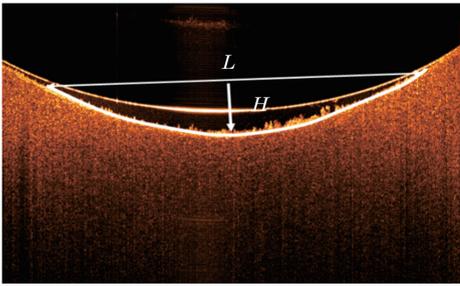


图 4 表面曲度测量示意图

Fig. 4 Diagram of surface curvature measurement

式中: V 为量化癌细胞分解后基质材料的体积; i, j, k 为 X, Y, Z 方向的坐标轴; $I(x_i, y_j, z_k)$ 为坐标是 x_i, y_j, z_k 的像素体积。针对基质材料厚度最小的区域,在以最低处为中心轴、左右各延伸 1.25 mm 的区域中,均匀选取 5 个测量点,通过“Peak-to-Peak”法测量基质材料的厚度并取平均值,将平均值定义为癌细胞分解后的基质材料的厚度 T 。

3 实验结果

3.1 OCT 检测肿瘤细胞侵袭的可行性验证

图 5 所示为 HepaRG 细胞在胶原中培养 48 h 的检测结果。图 5(a)所示为 OCT 检测结果,通过灰度的不同来反映不同材料反射率的差异,其中胶原顶部较亮的区域为细胞层,较暗的区域为胶原。

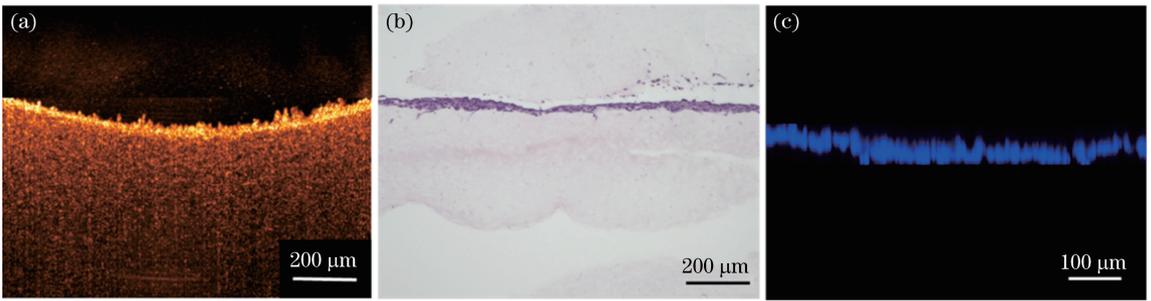


图 5 样品培养 48 h 的检测结果。(a) OCT 检测;(b) H-E 切片;(c)激光共聚焦检测结果

Fig. 5 Test results after sample cultivating for 48 h. (a) OCT test; (b) H-E slice; (c) laser confocal test results

3.2 细胞在不同培养时间时的侵袭结果

使用 OCT 检测不同培养时间时细胞在胶原中的侵袭情况,分别在培养 12, 24, 48 h 时采集 HepaRG 细胞侵袭过程的信息,并采用 H-E 切片检测进行验证,如图 6 所示。图 6(a)所示为肿瘤细胞侵袭模型培养 12 h 时的 OCT 图像。从图 6(a)中可以看出,胶原表面的明亮区域较薄且不均匀,表明细胞进入到基质材料的深度较浅,基本只有单层或 2 层细胞的厚度,且细胞在胶原表面的分布并不完全均匀。图 6(b)所示为肿瘤细胞侵袭模型培养 24 h 时的 OCT 图像,可以看出,胶原表面

从图 5(a)中可以看出,细胞区域与胶原区域的灰度差异较大,说明细胞与胶原的散射系数有明显区别,细胞的后向散射更强。细胞层的厚度分布并不均匀,表面有较多矛刺状或肉芽状凸起,同时胶原的表面形状整体下凹。胶原与细胞层的分界线不平整,二者之间有一定的交错。为了验证 OCT 检测的准确性,样品经 OCT 检测后,使用甲醛固定样品,利用 4',6-二脒基-2-苯基叫啶(DAPI)进行染色,并进行共聚焦检测。共聚焦检测完成后,对样品进行 H-E 染色,再制备组织染色切片。图 5(b)所示为 H-E 切片结果,其中深红色区域为细胞,下方浅粉色区域为胶原。从图 5(b)中可以看出,细胞层的厚度分布不均,这与 OCT 的检测结果相吻合,但是没有看到胶原的变形和肉芽状凸起。图 5(c)所示为激光共聚焦的检测结果,其中蓝色区域为细胞被 DAPI 染色后的荧光图像。从图 5(c)中可以看出,细胞层整体下凹,细胞表面有肉芽状凸起,激光共聚焦成像结果与 OCT 检测结果类似。通过比较图 5(a)、(b)、(c)可知,利用 OCT 成像的分辨率和对比度可以准确区分出细胞与胶原,验证了 OCT 检测细胞侵袭的可行性,并且 OCT 不需要破坏样品、成像深度较大、细胞与基质材料同时成像的特点更适合监测肿瘤细胞侵袭的过程。

的明亮区域比较均匀且有一定的厚度,胶原表面出现了明显下凹的弧度,表明肿瘤模型培养 24 h 后侵入到基质材料的细胞层厚度相较于培养 12 h 时明显增加,细胞的分布更均匀,细胞侵袭过程导致基质材料的收缩和分解更明显。图 6(c)所示为肿瘤细胞侵袭模型培养 48 h 时的 OCT 图像,可以看出,侵入到基质材料的细胞层厚度相较于培养 24 h 又有增加,但是增长的程度减小。图 6(d)~(f)所示为培养 12, 24, 48 h 时的 H-E 切片检测结果,可以看出,H-E 切片检测结果与 OCT 检测结果有较好的对应关系。

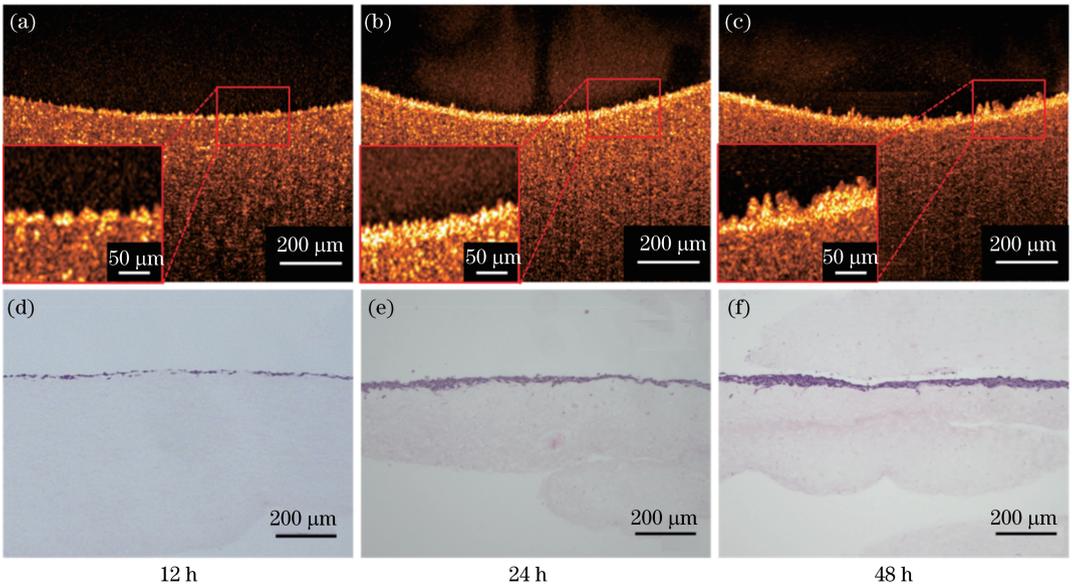


图 6 样品培养 12, 24, 48 h 时的检测结果。(a)~(c) OCT 检测; (d)~(f) H-E 染色切片

Fig. 6 Test results of samples with different culture time of 12, 24, and 48 h. (a)-(c) OCT tests; (d)-(f) H-E stained slices

细胞侵入到胶原内部与胶原结合,但细胞团簇区域以细胞为主,因此该区域的折射率按细胞的折射率 1.38 进行计算。采用“Peak-to-Peak”方法测量细胞侵袭距离时,对通过测量两个信号峰之间的距离来量化肿瘤细胞的侵袭距离。为了减小统计误差,对每个样品均匀取 10 个位置,对每个位置重复采集 3 次数据。由于激光共聚焦无法检测到侵袭距离较远的细胞,因此本文采用 H-E 切片图像,将手动采集 HepaRG 细胞侵入到胶原基质内的距离与 OCT 量化结果进行对比。图 7 所示为不同培养时间时 HepaRG 细胞侵袭距离的量化表征结果,可以看出,“Peak-to-Peak”法量化测得的细胞侵袭距离的变化趋势与 OCT 图像观察到的趋势一致,且与 H-E 切片量化结果的趋势一致,二者最大相差不超过 $10 \mu\text{m}$,表明 OCT 使用“Peak-to-Peak”法量化肿瘤细胞侵袭距离是可行的。从图 7 中还可以看出,细胞侵袭主要发生在前 24 h,48 h 时的细胞层厚度与 24 h 时细胞层厚度的差别较小。

3.3 微环境对细胞侵袭的影响

为了探究微环境对肿瘤细胞侵袭的影响,在肿瘤侵袭模型的下室设置培养基血清的体积分数为 10%,对上室血清的体积分数梯度进行递增设置,分别为 0、2%、5%、10%,以此模拟不同的营养梯度对肿瘤细胞侵袭的影响,对基质材料配制不同的 pH,以模拟基质的酸碱环境对肿瘤细胞侵袭的影响。图 8 所示为不同营养梯度时肿瘤细胞侵袭的 OCT 检测结果,可以看出:当上室血清体积分数为 2%时,

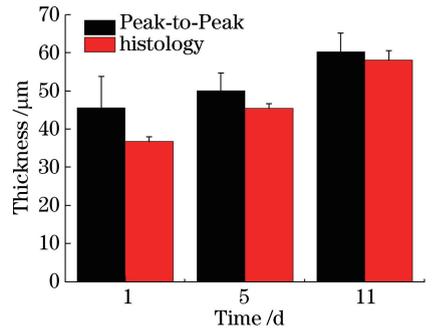


图 7 不同培养时间时细胞的侵袭距离

Fig. 7 Cell invasion distance for different culture time

侵入基质材料的细胞密度最大,同时细胞侵袭的距离也最远;当上室血清体积分数为 0 时,上、下室血清的浓度差最大,但细胞侵袭的距离并不是最大的。

图 9 所示为在上室血清体积分数为 2%、下室血清体积分数为 10%、胶原基质材料 pH 不同的条件下,HepaRG 细胞侵袭模型培养 12, 24, 48 h 时的二维和三维 OCT 图像。三维 OCT 图像相比二维图像可以更清晰地显示出细胞侵袭引起的基质材料的分解变形。从图 9 中可以看出,在相同的血清浓度差下,酸性环境会促进细胞的侵袭和胶原的分解变形。从图 9(a2)、(a3)、(b2)、(b3)的对比中可以看出 HepaRG 细胞侵袭模型培养 12 h 后基质材料在不同 pH 下的细胞侵袭差异,培养 24 h 后,酸性环境下胶原基质材料的分解变形更加明显。此外,从图 9 中还可以看出,在不同培养环境下培养 HepaRG 肿瘤细胞侵袭模型 48 h 后,细胞层表面有许多肉芽状小凸起,这可能是因为细胞在侵袭过程

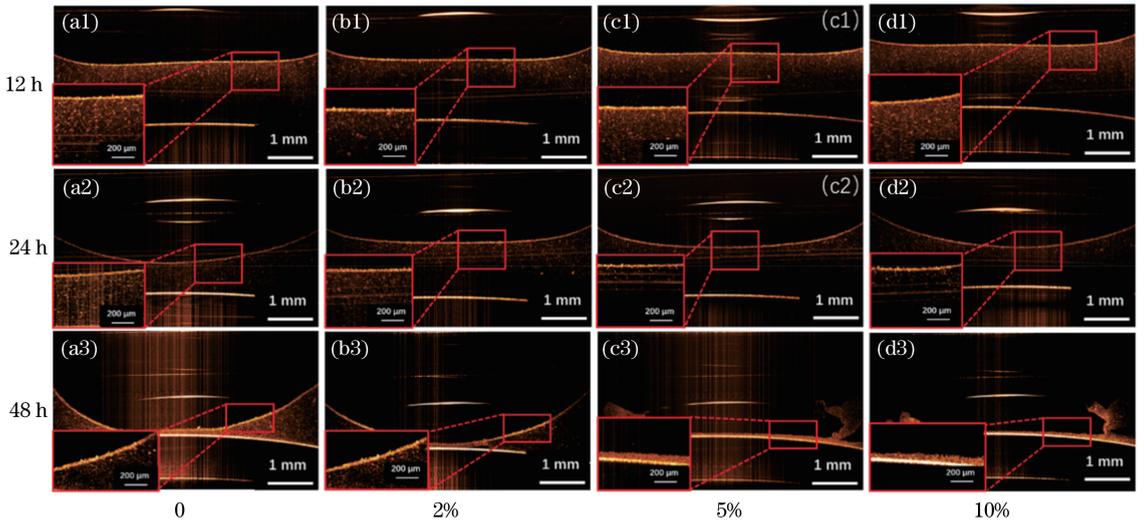


图 8 上室血清体积分数为 0、2%、5%、10% 和培养时间为 12、24、48 h 时细胞侵袭的 OCT 图像

Fig. 8 OCT images of cell invasion with different upper chamber serum volume fractions of 0, 2%, 5%, and 10% and different culture time of 12, 24, and 48 h

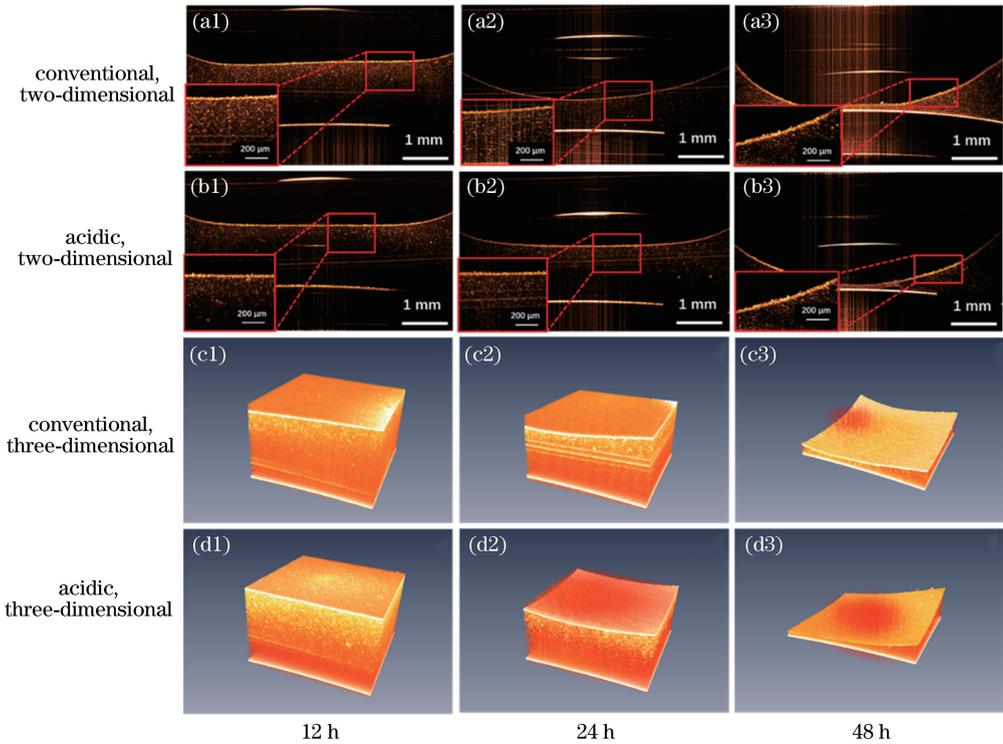


图 9 常规培养环境和酸性培养环境 (pH=6.8) 下上室血清体积分数为 2% 且培养 12、24、48 h 时胶原的二维和三维图像
Fig. 9 Two-dimensional and three-dimensional images of collagen in conventional culture environment and acidic culture environment (pH=6.8) with upper chamber serum volume fraction of 2% and different culture time of 12, 24, and 48 h

中分解胶原,部分脱离了胶原层,漂浮在胶原表面,这与激光共聚焦检测的结果类似。

利用“Peak-to-Peak”距离测量方法对细胞侵袭距离进行量化。图 10 所示为不同 pH 培养环境下肿瘤细胞侵袭模型培养 48 h 时细胞的侵袭距离,可以看出:不同营养梯度时,肿瘤细胞侵袭距离均随时

间延长而增大;上、下室血清浓度差越大,细胞的侵袭距离相对越大;当上室血清体积分数为 2%,细胞侵袭距离最大;当上室血清体积分数 0 时,上、下室血清浓度差最大,但细胞的侵袭距离不是最远的,这可能是由于当上室血清体积分数为 0 时,肿瘤细胞缺少足够的营养,无法侵袭足够远的距离^[28-29]。从

图 10 中还可以看出,在酸性环境下,细胞的侵袭能力更强,相较于常规的培养环境,尤其是在上、下室浓度差较大时,细胞可以侵袭更远的距离。在每种营养梯度下,细胞侵袭主要发生在 12~24 h,这是因为胶原层厚度超过 1 mm 后,下室的培养基渗透需要一定的时间,在前 12 h 时,细胞未探测到更高的血清浓度,所以不会向下侵袭,并且上层悬液中的细胞下沉并附着在胶原表面需要一定的时间。肿瘤细胞侵袭模型培养 24 h 时,下室的培养基渗透到上室一段时间后,上、下室培养基中的血清含量非常接近,细胞的趋向性减弱,且上、下室培养基中的部分养分已被细胞消耗,细胞的侵袭能力减弱,导致细胞的侵袭速度下降。

为了更全面地了解细胞侵袭的机理,研究细胞侵袭过程对基质产生的作用。采用 2.4 节中的量化方法,分别量化胶原的厚度、体积、表面曲度等参数。图 11 所示为不同培养环境下基质材料分解变形的量化表征,可以看出:随着培养时间延长,胶原基质材料的厚度、体积逐渐减小,而表面曲度则是先增大后减小;当肿瘤细胞侵袭培养 0~12 h 时,胶原分解变形的规律不明显,但培养 12~48 h 时具有明显的趋向性,即当上室血清体积分数为 0 时,胶原的分解

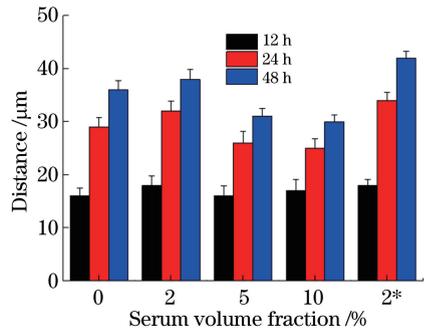


图 10 不同 pH 培养环境下肿瘤细胞侵袭模型培养 48 h 时细胞的侵袭距离 (* 指细胞培养环境为酸性)

Fig. 10 Invasion distance of tumor cells in different pH culture environments for 48 h (* means that cell culture environment is acidic)

变形比其他浓度时更显著,原因可能是处于极端饥饿状态的肿瘤细胞会吸取基质材料的营养^[28-29]。随着上室浓度增加,在正常培养环境下,胶原的分解变形越来越显著,胶原的厚度、体积明显减小,表面曲度增大;在相同的浓度下,胶原基质在酸性环境下的变形比弱碱性环境下的更明显。对比图 10 和图 11 可以看出,细胞迁移主要发生在 12~24 h 时间段内,胶原的分解变形相对于细胞迁移有一定的滞后。

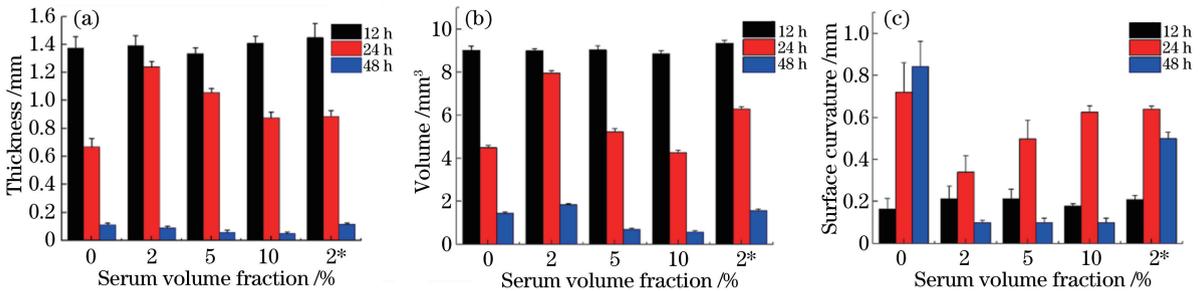


图 11 不同培养环境下基质材料分解变形的量化表征。(a)胶原厚度;(b)胶原体积;(c)胶原表面曲度(*指细胞培养环境为酸性)

Fig. 11 Quantitative characterization of matrix material decomposition deformation in different culture environments.

(a) Collagen thickness; (b) collagen volume; (c) collagen surface curvature (* means that cell culture environment is acidic)

4 讨 论

现有肿瘤细胞侵袭的研究大多关注细胞本身,而较少探究肿瘤细胞侵袭过程中细胞对周围基质的影响规律,若要更全面地了解肿瘤细胞侵袭过程和机理,需要同时从细胞和基质材料多个角度来量化表征肿瘤细胞侵袭引起的变化。基于自制的 OCT 系统,通过细胞侵袭距离以及胶原厚度、体积、表面曲度等多个参数,探究不同微环境下肿瘤细胞侵袭产生的变化。通过 H-E 切片、激光共聚焦的对比,验证 OCT 检测肿瘤细胞侵袭的准确性。根据图 5

和图 6 所示的 OCT 检测肿瘤细胞侵袭,可以通过细胞层与基质的灰度差异,明显区分肿瘤细胞的分布,检测结果与 H-E 切片图像、激光共聚焦图像有较好的对应关系,验证了 OCT 测量的可行性。同时,OCT 不需要复杂的样品准备过程,也不需要样品进行荧光染色,检测更方便。通过标准多层盖玻片仿体对 OCT 检测界面间距离的准确性进行校准,如图 3 所示,识别得到的细胞层上、下界面量化肿瘤细胞侵袭距离,与 H-E 切片检测的细胞侵袭距离具有一定的对应关系,但比 H-E 切片量化的结果大 5~9 μm 。原因如下:一方面,OCT 量化细胞

侵袭距离可能存在 $3.5 \mu\text{m}$ (1 pixel) 的误差, 而 H-E 切片量化误差约为 $1 \mu\text{m}$ (1 pixel), OCT 的距离量化误差比 H-E 切片大 $2\sim 3 \mu\text{m}$; 另一方面, H-E 切片检测对肿瘤模型进行固定、脱水、再水化等处理会引起样品收缩和变形, 使 H-E 切片的量化结果偏小, 而 OCT 是对正常培养状态下的样品进行非侵入无损检测的, 检测结果更接近真实情况。激光共聚焦检测不需要对肿瘤模型进行脱水、再水化处理, 可以与 OCT 一样检测肿瘤模型的三维图像。为了提高细胞与基质材料的对比度, 需要对细胞进行染色, 从而可以检测到细胞侵袭分布, 但单一染色很难同时检测细胞与基质材料的分布, 如图 5(c) 所示。

研究人员在肿瘤侵袭的研究中发现, 肿瘤细胞快速增殖会消耗大量营养物质, 肿瘤细胞对高营养浓度具有趋向性^[30], 肿瘤细胞通过分泌金属基质酶来分解, 并突破细胞外基质向外侵袭, 细胞分泌的金属基质酶分解细胞外基质中的胶原, 使胶原的蛋白质结构重构并收缩^[31]。本文通过设计肿瘤细胞侵袭模型上、下室的不同浓度差来模拟营养梯度对肿瘤细胞侵袭的影响。实验中, 下室设置固定的较高血清浓度(体积分数为 10%), 上室设置不同的较低的血清浓度, 由于肿瘤细胞对高营养浓度具有趋向性, 因此肿瘤细胞发生从上到下的定向迁移运动, 如图 8 和图 10 所示。上室血清体积分数为 0 时, 血清浓度差最大的组, 肿瘤细胞的侵袭距离并不是最大的, 原因在于肿瘤细胞在侵袭过程中需要消耗大量的营养物质, 处于完全饥饿状态的肿瘤缺乏足够的营养以进行迁移运动。培养 0~12 h 时, 肿瘤细胞的增殖较慢, 整体细胞数量较少, 且分布不均, 如图 8(a1)、(b1)、(c1)、(d1) 所示。这是因为细胞悬液被添加到胶原后, 需要一定时间下降并附着到胶原表面, 肿瘤细胞需要一定的时间恢复状态。培养的前 12 h, 肿瘤细胞主要聚集在胶原表面, 侵袭到胶原内部的细胞数量较少, 肿瘤细胞侵袭引起胶原体积、厚度、曲度等的变化都比较小, 血清浓度不同引起的差异也非常小, 如图 11 所示。培养 12~24 h 时, 肿瘤细胞适应环境, 增殖加快, 细胞数量增多, 同时肿瘤细胞通过降解胶原大量侵袭到胶原内部, 如图 8(a2)、(b2)、(c2)、(d2) 所示, 胶原开始受细胞分泌水解酶的影响而加快收缩和分解, 胶原的厚度、体积减小的速度加快, 表面曲度增大明显, 如图 11 所示。培养 24~48 h 时, 肿瘤细胞的侵袭速度减慢, 一方面是因为细胞悬液中的血清大部分被细胞消耗, 营养减少; 另一方面是因为上、下室之间的血清浓度差

减小, 不足以吸引细胞向下侵袭。同时, 培养 24~48 h 时, 细胞表面有许多芽状小凸起, 如图 8(a3)、(b3)、(c3)、(d3) 所示, 细胞表面的芽状凸起说明细胞开始向上增殖, 从侧面说明细胞向下侵袭的速度减慢。胶原的厚度、体积进一步减小, 但表面弯曲程度变化不大, 这是因为已经有较多的细胞侵袭到了胶原内部, 营养进一步消耗, 肿瘤细胞分泌水解酶的速度减慢, 导致胶原的降解变慢, 胶原的收缩和形变程度降低, 如图 11 所示。由于分泌水解酶需要有营养支撑, 上室血清含量少的肿瘤细胞侵袭模型缺乏营养, 因此分泌水解酶减慢。从图 11 中可以看出, 上室血清含量少的模型的胶原厚度、体积的减小速度低于上室血清含量高的模型, 不同培养环境下, 胶原表面曲度变化的整体趋势是先增大后减小, 但胶原表面曲度的变化规律与血清浓度差的关联性不明显, 这可能是由胶原本身成胶后的密度不均匀, 胶原表面曲度受模型本身平整度及胶原表面细胞分布均匀度等因素影响造成的, 因此需要优化细胞体外侵袭模型。

研究^[32-33]表明, 酸性微环境会加速肿瘤细胞内离子的交换, 激发肿瘤细胞增殖和诱导细胞分解细胞外基质。有学者认为, 调节细胞微环境的 pH 将是一种治疗癌症的有效方式之一。本文实验发现, 在酸性微环境下, 肿瘤细胞侵袭更活跃, 肿瘤细胞分解胶原的能力增强, 胶原收缩的速度和厚度减小的速度较正常 pH 环境实验组有所增加, 如图 9~11 所示, 实验结果与现有研究报道相符, 这为探究细胞微环境 pH 对肿瘤细胞侵袭的影响提供了新方法。

5 结 论

基于胶原蛋白细胞外基质构建厚度超过 1 mm 的三维肿瘤体外侵袭模型, 模拟肿瘤细胞在体内的侵袭。利用 OCT 纵向分辨率高、成像深度大、非侵入式等优点, 开发了一套肿瘤细胞侵袭的定量监测方法。采用自主搭建的 OCT 系统和定量监测方法, 检测肿瘤细胞在基质内迁移和侵袭时的动态变化, 包括细胞迁移距离和基质材料变形。通过对比 OCT 检测结果与 H-E 染色、激光共聚焦结果, 验证了本文方法的可行性。进一步利用 OCT 监测了不同营养梯度、不同 pH 微环境下, 肿瘤细胞侵袭模型在不同培养时间时的侵袭情况, 量化了细胞侵袭距离以及胶原基质材料的表面曲度、厚度和体积。研究发现, 细胞的侵袭距离与营养梯度相关, 较大的营养梯度会促使细胞侵袭更远的距离, 但是细胞本身

缺乏营养,也会影响其侵袭的距离。此外,酸性的微环境也会增强细胞的侵袭能力。细胞侵袭过程中会引起胶原收缩,且胶原的收缩与细胞的侵袭并不同步,胶原收缩发生的时间有一定的滞后性。

与 H-E 染色、激光共聚焦等常规生物检测方法相比,OCT 技术具有成像深度大、无损、高精度等优点。与其他研究相比,本文提出的肿瘤细胞侵袭的定量监测方法不仅可以研究整个侵袭过程中细胞的动态变化,还关注细胞与基质间的相互作用,并且通过多个量化信息,更全面地反映和揭示了细胞侵袭的情况和机理。

参 考 文 献

- [1] Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(2): 97-109.
- [2] Zhu J R, Liang L, Jiao Y, *et al.* Enhanced invasion of metastatic cancer cells via extracellular matrix interface[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118058.
- [3] Vicente-Manzanares M, Horwitz A R. Cell migration: an overview[M] // Wells C, Parsons M. *Cell Migration. Methods in molecular biology (methods and protocols)*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2011, 769: 1-24.
- [4] Marshall J. Transwell® invasion assays[M] // Wells C, Parsons M. *Cell migration. Methods in molecular biology (methods and protocols)*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2011, 769: 97-110.
- [5] Kong X Q, Dong B L, Zhang N, *et al.* A unique red-emitting two-photon fluorescent probe with tumor-specificity for imaging in living cells and tissues[J]. *Talanta*, 2017, 174: 357-364.
- [6] Lü Y, Liu M, Zhang Y, *et al.* Cancer cell membrane-biomimetic nanoprobe with two-photon excitation and near-infrared emission for intravital tumor fluorescence imaging[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(2): 1350-1358.
- [7] Kilin V, Mas C, Constant S, *et al.* Health state dependent multiphoton induced autofluorescence in human 3D *in vitro* lung cancer model[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16233.
- [8] Lin H X, Zuo N, Zhuo S M, *et al.* Application of multiphoton microscopy in disease diagnosis [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207014. 林宏心, 左宁, 卓双木, 等. 多光子显微技术在医学诊断中的应用 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207014.
- [9] Wäldchen S, Lehmann J, Klein T, *et al.* Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15348.
- [10] Yang Y L, Zong W J, Wu R L, *et al.* Light-sheet fluorescence microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318007. 杨豫龙, 宗伟建, 吴润龙, 等. 光片荧光显微成像 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318007.
- [11] Liu L M, Qin H. Multiscale-photoacoustic microscopy for imaging cancer cells and solid tumors [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2017, 26(2): 116-120. 刘丽鸣, 覃欢. 多尺度的声光显微镜用于癌细胞及实体瘤成像 [J]. *激光生物学报*, 2017, 26(2): 116-120.
- [12] Olafsson R, Bauer D R, Montilla L G, *et al.* Real-time, contrast enhanced photoacoustic imaging of cancer in a mouse window chamber [J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 18625-18632.
- [13] Ragnar O, Bauer D R, Montilla L G, *et al.* Real-time, contrast enhanced photoacoustic imaging of cancer in a mouse window chamber [J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 18625-18632.
- [14] Zhang H F, Maslov K, Stoica G, *et al.* Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(7): 848-851.
- [15] Chen C J, Yang S H, Xing D. Progress and application of photoacoustic microscopy technique [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(3): 0307008. 陈重江, 杨思华, 邢达. 光声显微成像技术研究进展及其应用 [J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307008.
- [16] Liang X, Graf B W, Boppart S A. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(11): 643-655.
- [17] Huang D, Swanson E A, Lin C P, *et al.* Optical coherence tomography [J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [18] Yang Y, Sule-Suso J, *et al.* Use of OCT to study tumor cell growth in 3D membranes[J]. *Proceedings of SPIE*, 2004, 5486: 154-160.
- [19] Tan W, Oldenburg A L, Norman J J, *et al.* Optical coherence tomography of cell dynamics in three-dimensional tissue models[J]. *Optics Express*, 2006, 14(16): 7159-7171.
- [20] Rey S M, Považay B, Hofer B, *et al.* Three- and four-dimensional visualization of cell migration using optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(6/7): 370-379.
- [21] Kuo C, Chan H, Chou H, *et al.* Swept source optical coherence tomography for radiation-enhanced

- hepatocellular carcinoma cell invasion imaging [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2009, 54(13): 4289-4297.
- [22] Chu K K, Kusek M E, Liu L B, *et al.* Illuminating dynamic neutrophil trans-epithelial migration with micro-optical coherence tomography [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45789.
- [23] Zhang H, Chen M H, Li Z Y, *et al.* The measurement of the concentration of glucose solution by using optical low coherence interferometry [J]. *Optical Technique*, 2018, 44(3): 287-290.
张浩, 陈明惠, 李振洋, 等. 测量葡萄糖浓度的光学低相干干涉法 [J]. *光学技术*, 2018, 44(3): 287-290.
- [24] Tan Z H, Feng Y P, Wang Z. Advances in measurement of optical central thickness by low coherence interferometry [J]. *Imaging Science and Photochemistry*, 2016, 34(1): 5-14.
檀泽浩, 冯云鹏, 王钟. 基于低相干干涉的透镜厚度测量及生物影像研究进展 [J]. *影像科学与光化学*, 2016, 34(1): 5-14.
- [25] Wang Z B, Shi G H, He Y, *et al.* Application of optical coherence tomography to distance measurement of optical surface [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2012, 20(7): 1469-1474.
王志斌, 史国华, 何益, 等. 光学相干层析技术在光学表面间距测量中的应用 [J]. *光学精密工程*, 2012, 20(7): 1469-1474.
- [26] Xiao Z Y, Wu S L, Li H. Noninvasive measurement of epithelium thickness based on optical coherence tomography [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2009, 18(6): 810-814.
肖郑颖, 吴淑莲, 李晖. 基于光学相干层析成像技术的小鼠表皮厚度的无损测量及分析 [J]. *激光生物学*, 2009, 18(6): 810-814.
- [27] Robertson C. Optical coherence tomography imaging of tissue engineered skin cultured under perfusion conditions [D]. Sheffield: University of Sheffield, 2013.
- [28] Sakai K, Kurokawa T, Furui Y, *et al.* Invasion of carcinoma cells into reconstituted type I collagen gels: visual real-time analysis by time-lapse microscopy [J]. *BioScience Trends*, 2011, 5(1): 10-16.
- [29] Zanutelli M R, Goldblatt Z E, Miller J P, *et al.* Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(1): 1-9.
- [30] Liu L, Duclos G, Sun B, *et al.* Minimization of thermodynamic costs in cancer cell invasion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(5): 1686-1691.
- [31] Levitz D, Hinds M T, Choudhury N, *et al.* Quantitative characterization of developing collagen gels using optical coherence tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(2): 026019.
- [32] Zhou C F, Zhao S S, Sun Z Q, *et al.* Acid conditions induces EMT of hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Practical Oncology Journal*, 2017, 31(3): 199-204.
周春芳, 赵珊珊, 孙泽群, 等. 酸性环境诱导肝癌 HepG2 细胞 EMT [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2017, 31(3): 199-204.
- [33] Huang Y B, Song F Z. The mechanism of pH regulation on tumor cell growth and metastasis [J]. *China Cancer*, 2012, 21(6): 428-433.
黄裕兵, 宋方洲. pH 值调控肿瘤细胞生长转移的机制 [J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(6): 428-433.