

# 利用光谱和时间分辨的多光子显微技术识别 人体冠状动脉粥样硬化斑块

张荣丽<sup>1,2,3</sup>, 李慧<sup>3</sup>, 吴岳恒<sup>4</sup>, 余佳<sup>3</sup>, 刘尚敏<sup>5</sup>, 郑炜<sup>3\*\*</sup>, 林展翼<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>华南理工大学医学院, 广东 广州 510006;

<sup>2</sup>华南理工大学附属广东省人民医院, 广东 广州 510080;

<sup>3</sup>中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究室, 广东 深圳 518055;

<sup>4</sup>广东省人民医院, 广东省医学科学院, 广东省华南结构心脏病省级重点实验室, 广东省心血管病研究所, 广东 广州 510080;

<sup>5</sup>广东省人民医院广东省医学科学院医学研究部, 广东 广州 510080

**摘要** 采用光谱和时间分辨的多光子显微技术对 8 例未染色的人体冠状动脉组织进行研究, 根据荧光光谱分离出冠状动脉内膜中的弹性纤维和胶原纤维, 并计算粥样硬化病变与非病变冠状动脉内膜中两种纤维信号的比值, 从而获得胶原纤维和弹性纤维相对含量的变化。采用荧光寿命评估了冠状动脉粥样硬化组织中弹性纤维生化特性的变化, 结果显示, 冠状动脉粥样硬化斑块区域具有较短的平均荧光寿命。光谱和时间分辨的多光子显微技术能有效识别冠状动脉粥样硬化斑块, 有望成为研究冠状动脉粥样硬化病变的新方法。

**关键词** 医用光学; 二次谐波; 双光子激发荧光; 荧光寿命; 荧光光谱; 动脉粥样硬化斑块; 纤维

中图分类号 Q631

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207025

## Identification of Human Coronary Atherosclerotic Plaques using Spectrum- and Time-Resolved Multiphoton Microscopy

Zhang Rongli<sup>1,2,3</sup>, Li Hui<sup>3</sup>, Wu Yueheng<sup>4</sup>, Yu Jia<sup>3</sup>, Liu Shangmin<sup>5</sup>,  
Zheng Wei<sup>3\*\*</sup>, Lin Zhanyi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

<sup>2</sup>Guangdong Provincial People's Hospital, South China University of Technology,  
Guangzhou, Guangdong 510080, China;

<sup>3</sup>Research Laboratory for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institutes of Advanced Technology,  
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

<sup>4</sup>Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of South China Structural Heart Disease,  
Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences,  
Guangzhou, Guangdong 510080, China;

<sup>5</sup>Research Department of Medical Sciences, Guangdong Academy of Medical Sciences,  
Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China

**Abstract** This study evaluated 8 unstained human coronary tissues *ex vivo* using spectrum- and time-resolved multiphoton microscopy. First, according to the spectra, the elastin fibers and collagen fibers in the coronary arterial intima can be separated clearly. Second, the ratios of the two types of fiber signals were calculated to assess changes in the relative content of the collagen and elastin fibers in the coronary arterial wall caused by an atherosclerotic lesion. Third, we assessed biochemical variations of the elastin fibers in the coronary atherosclerotic tissues by measuring fluorescence lifetime and found that the coronary atherosclerotic plaque has a lower mean

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-27; 录用日期: 2019-12-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81701744, 81822023)、深圳市基础研究 (JCYJ20170818164343304, JCYJ20170818155006471, JCYJ20180507182432303)、广东省科技计划项目 (2016B070701007)

\* E-mail: linzhanyi@hotmail.com; \*\* E-mail: zhengwei@siat.ac.cn

fluorescence lifetime than a normal tissue. This study demonstrates that spectrum- and time-resolved multiphoton microscopy can effectively identify coronary atherosclerotic plaques, thus indicating its potential as a novel research tool for studying coronary arteriosclerotic lesions in the future.

**Key words** medical optics; second harmonic generation; two-photon excitation fluorescence; fluorescence lifetime; fluorescence spectrum; coronary atherosclerotic plaque; fibers

**OCIS codes** 170.6920; 170.6935; 100.2960

## 1 引 言

动脉粥样硬化病变引起的冠心病(CHD)已成为人类因病致死的主要原因。冠状动脉粥样硬化是一种渐进性疾病。脂肪类物质在动脉内膜下壁长期积累,形成了冠状动脉粥样硬化斑块(CAP),导致冠状动脉狭窄,甚至完全闭塞,从而引起心脏供血障碍。易损性CAP的破裂可导致急性冠脉综合征和心肌梗死等致命性事件的发生<sup>[1-3]</sup>。因此,需要对CAP进行早期识别及易损性评估,进而及早实施干预,以降低冠心病的死亡率。

CAP常发生于冠状动脉内膜上,正常的动脉内膜主要由内皮细胞、弹性纤维、胶原纤维等构成。发生CAP病变的动脉内膜区域主要含有以弹性纤维、胶原纤维为主的细胞外基质成分,以内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞和淋巴细胞为主的细胞成分,以及以胆固醇为主的脂质成分<sup>[4]</sup>。已有研究表明,CAP的发生发展会导致这些微米/亚微米尺度级别组织成分的形态结构和生化特性发生改变<sup>[5-8]</sup>。通过检测这些变化有望实现CAP的早期识别和易损性评估。组织学病理检测能够揭示组织在细胞水平上的形态结构和成分,是临床上进行CAP早期识别的“金标准”。但这种方法不仅具有侵入性,而且耗时耗力,过程复杂<sup>[9]</sup>。采用包括磁共振、计算机断层扫描在内的无创实时成像技术可以实现对CAP形态学的量化,从而进行斑块的识别<sup>[10-11]</sup>,但是受限于空间分辨率,通过这些技术目前还无法获取动脉内膜在亚细胞尺度上的生物成分信息和结构特征,因而难以实现CAP的早期识别。因此,迫切需要一种具有亚细胞分辨率且能够同时探测组织形态特征和生化特性的技术。

多光子显微技术包括二次谐波(SHG)成像、双光子激发荧光(TPEF)成像,具有光漂白性较低、成像深度深、无标记成像等优势,其分辨率可达亚细胞水平,能够基于组织的内源性荧光标志物实现非侵入成像。多光子显微技术与光谱和时间分辨探测技术相结合,能够揭示生物组织在亚细胞水平分辨率下的三维结构和生化成分信息,为病变的识别提供

多维度的量化信息<sup>[12-13]</sup>。其中:二次谐波信号由具有非中心对称结构的可极化材料或组织产生,在生物组织中,二次谐波信号主要来自胶原纤维;双光子激发荧光信号主要来自内源性荧光团,例如弹性纤维<sup>[14]</sup>;基于光谱和时间分辨的探测系统可以获得生物组织的荧光光谱和荧光寿命信息。因此,光谱和时间分辨多光子显微技术可以为解析生物组织的精细结构及生化成分提供强大的支持<sup>[15-17]</sup>。尽管光谱和时间分辨的多光子显微成像技术已表现出了强大的优势,但其在冠状动脉粥样硬化研究中的潜力尚未被广泛评估,尤其是对人冠状动脉粥样硬化病变的研究还未见报道。

本研究采用具有光谱和时间分辨探测功能的多光子显微成像技术,对离体未染色的8例人体冠状动脉粥样硬化组织中的斑块区域进行特征识别。基于冠状动脉组织非斑块和斑块区域中内源性荧光物质的荧光光谱和荧光寿命信息,提取出有潜力识别冠状动脉粥样硬化病变的多种定量、定性指标。本课题组首次将光谱和时间分辨的多光子显微成像技术用于人冠状动脉粥样硬化病变组织的研究,有望为人体冠状动脉粥样硬化斑块发病机理和早期诊断的进一步研究提供新思路。

## 2 材 料 和 方 法

### 2.1 人体冠状动脉样品的准备

本文以8例临床进行心脏移植患者的冠状动脉样本作为研究对象,将获取的样本切成两块。其中的一块切片沿管腔纵向剖开,用于光谱和时间分辨多光子显微成像,另一块切片进行苏木精-伊红(HE)病理染色,最终判断粥样硬化斑块区域和非斑块区域(non-CAP)。该研究是在广东省人类科学研究伦理委员会的监督和批准下进行的,并且已得到患者的同意(广东省人民医院伦理批准号:No. GDREC2018225H(R1))。在所有的成像实验中,均对冠状动脉内腔的纵切面进行研究。

### 2.2 成像设备

本研究使用的是中国科学院深圳先进技术研究院生物光学与分子影像中心自主搭建的光谱和时间

分辨多光子显微镜,之前的研究工作已经对该设备进行了详细介绍<sup>[12,18]</sup>。以钛蓝宝石飞秒激光器作为激发光源,将波长调至 810 nm。光源发出的激光经扩束之后,先经过一对检流计振镜(TSH8310),然后通过扫描透镜、筒镜,透过二向色镜(FF685-Di02),最终由放大倍数为 20 倍、数值孔径为 1.0 的物镜聚焦。其中,振镜提供二维方向上的扫描,最终在物镜焦面上形成面积为 300 μm×300 μm、分辨率为 128 pixel×128 pixel 的成像区域。激发产生的信号经由上述物镜收集,被二向色镜反射至 680 nm 的短通滤光片(FF01-680/SP-25)以过滤掉激发光。使用光纤束将信号收集并导入光谱仪。利用线性阵列光电倍增管(PMT, PML-16-C)对光谱仪输出的信号进行探测,探测的波长范围为 404.58~592.08 nm。同时,连接光电倍增管的时间相关单光子计数模块(SPC-150)能够将每个光谱带的荧光衰减曲线记录到 256 个时间通道中。使用步进电机控制物镜在轴向以 3 μm 为步长移动,进行三维成像。

### 2.3 荧光光谱和荧光寿命分析

为了揭示人体冠状动脉内膜的光谱特征,本研究创建了光谱编码的彩色图像。首先将特定的 RGB 色彩(从紫色到黄色)分配到给定的 16 通道光谱中,再将每一个像素点的强度乘以其相应光谱通道的 RGB 色彩值,获得每个通道的颜色加权图像,将 16 通道的色彩加权图像叠加到一起便可形成彩色光谱编码图。

在荧光光谱的定量分析中,本研究通过 SHG 通道(404.58~429.58 nm)和 TPEF 通道(442.08~592.08 nm)将冠状动脉内膜的主要成分清晰地分开。一方面,将非病变组和病变组的 TPEF 信号强度进行归一化,然后对比两者的差异;另一方面,对非病变组和病变组的 TPEF/SHG 参数进行比较分析。TPEF/SHG 参数是指 TPEF 最强信号通道(479.58 nm±6.25 nm)与 SHG 最强信号通道(404.58 nm±6.25 nm)的强度之比。每个样品的 TPEF 光谱和 TPEF/SHG 参数都是对该样品每个深度采集的 TPEF 光谱和 TPEF/SHG 参数进行平均得到的。对荧光光谱的分析通过 MATLAB 编程实现。

在荧光寿命定量分析中,使用双指数衰减函数模型—— $\alpha_1 \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2 \exp(-t/\tau_2)$  拟合荧光衰减曲线。在双指数衰减模型中,参数  $\tau$  和  $\alpha$  分别表示时间衰减常数和衰减项的幅值, $t$  为采集光子数的时刻<sup>[11,15]</sup>。基于 TPEF 衰减曲线计算了每个像素的平均荧光寿命—— $\tau_{\text{mean}} = (\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2) / (\alpha_1 + \alpha_2)$ ,并用

它揭示冠状动脉粥样硬化病变区域和非病变区域之间的差异。本研究选取了包括 19 个非病变组和 24 个病变组的 TPEF 信号进行荧光寿命分析,每一个三维区域均选取 4 个相同的扫描深度(到内膜表面的距离分别为 9,30,45,66 μm)。将非病变区域和病变区域荧光寿命参数  $\tau_{\text{mean}}$  在 4 个深度下的平均值作为最终的荧光寿命。利用 SPCImage 软件获得荧光寿命参数和荧光寿命编码图像。荧光寿命统计分析通过 MATLAB 编程实现。

## 3 结果和讨论

### 3.1 人体冠状动脉内膜多成分光谱的定量分析

采用光谱和时间分辨多光子显微技术对人冠状动脉内膜粥样斑块区域与非病变区域进行研究,所得光谱编码图像如图 1 所示。图 1 中左边两列和右边

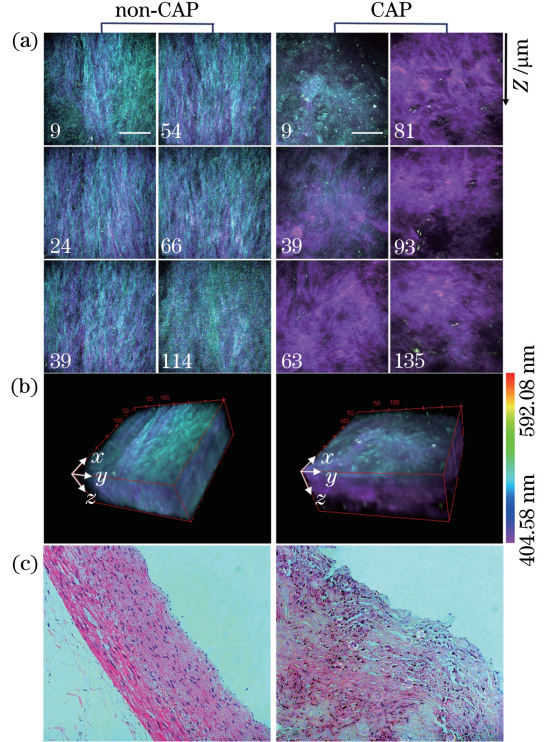


图 1 人冠状动脉内膜粥样硬化斑块区域和非斑块区域的光谱编码图和相应的三维结构图像以及病理图。(a)光谱编码图;(b)三维结构图;(c)病理图(右侧彩色带代表光谱范围 404.58~592.08 nm)

Fig. 1 Spectrum-coded images with different depths and the corresponding 3D images and histology of CAP and non-CAP regions in human coronary arterial intima. (a) Spectrum-coded images; (b) 3D structure images; (c) pathological images. The right color band represents the range of spectral: 404.58–592.08 nm

两列分别展示了非斑块和斑块区域不同深度的光谱编码图像及其相应的三维结构图,以及 HE 病理染色图,每幅图左下角的数值是距离内膜表面的深度,显示在第一幅图右下角的比例尺为  $100\ \mu\text{m}$ 。其中,代表胶原纤维的 SHG 信号在图中显示为紫色,而 TPEF 信号描绘的弹性纤维显示为蓝绿色。

在非斑块区域的组织结构中,胶原纤维和弹性纤维均沿着血管腔(垂直于血流的方向)以有序的波浪状排列,并且两种类型的纤维排列方向相同;在斑块区域,可以观察到胶原纤维和弹性纤维的排列被破坏,呈现出紊乱的分布状态。成像结果直观地显示了胶原纤维和弹性纤维信号的相对强度,从而反映出两种纤维在动脉内膜上的相对含量。

进一步探索人冠状动脉内膜病变区域和非病变区域的多个荧光光谱参数,包括 TPEF 光谱以及 TPEF/SHG 参数,对斑块区域和非斑块区域的多参数之间的差异进行定量分析,结果如图 2 所示。观

察图 2(a)所示的 TPEF 光谱可以看出,相对于非斑块区域的冠状动脉内壁,斑块区域在  $500\sim 598\ \text{nm}$  光谱范围内出现了明显的红移,并表现出更高的信号强度,其中误差线表示标准误差 SEM。根据图 2(b)所示的统计结果可以看出,斑块区域的 TPEF/SHG 参数比非病变区域低。出现这种现象的可能原因为,在动脉粥样硬化斑块形成过程中,平滑肌细胞从中膜跨越内弹力层迁移到内膜,并在内膜分泌大量的胶原蛋白,这些胶原蛋白在内膜上重塑成大量的胶原纤维<sup>[1-3,9]</sup>。利用统计学单侧配对  $t$  检验方法对 8 个样品的动脉内壁斑块和非斑块区域的 TPEF/SHG 参数进行显著性差异评估,结果显示具有统计学差异(显著性水平  $P=0.0048$ )。

利用光谱分析技术可以将冠状动脉内壁上的多种成分清楚地分离开,例如弹性纤维和胶原纤维,TPEF/SHG 等光谱参数可以作为冠状动脉粥样硬化斑块病变区域识别和诊断的新指标。

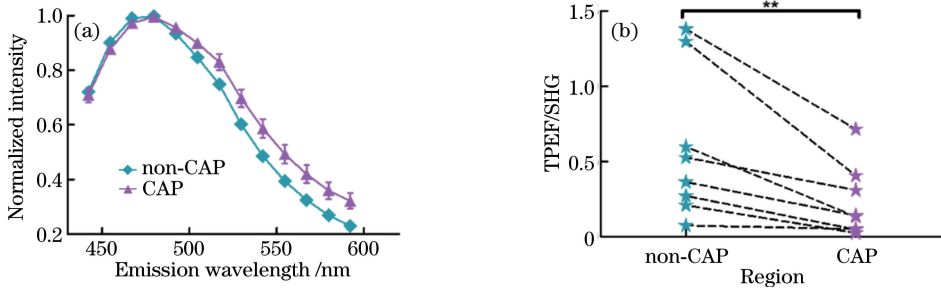


图 2 人冠状动脉内膜非斑块和斑块区域多成分的光谱特征。(a)非斑块和斑块区域的 TPEF 光谱; (b) 8 个样品的非斑块和斑块区域的 TPEF/SHG 参数( \*\* 表示  $0.001 < P < 0.01$ ,  $P$  为显著性水平)

Fig. 2 Spectral characteristics of the multiple components of the normal and diseased human intima of coronary artery. (a) TPEF spectra of non-CAP and CAP regions; (b) ratio of TPEF to SHG signal from non-CAP and CAP regions of eight samples( \*\* means  $0.001 < P < 0.01$ ,  $P$  represents significance level)

### 3.2 人冠状动脉内膜生化成分荧光寿命的定量分析

利用获得的 TPEF 信号计算斑块区域和非斑块区域冠状动脉组织的平均荧光寿命参数,结果如图 3 所示。荧光寿命这一指标可以用来区分多种生化成分,并进一步揭示人冠状动脉生理病理状态。图 3 左边两列和右边两列分别显示了冠状动脉内壁非病变区域和病变区域不同深度处的荧光寿命编码图像,平均荧光寿命范围为  $0.5\sim 2.5\ \text{ns}$ 。每幅图左下角为距内膜表面的深度,显示在第一幅图右下角的比例尺为  $100\ \mu\text{m}$ 。从图 3 所示的人冠状动脉内膜非斑块区域和粥样硬化斑块区域的荧光寿命编码图可以看出,非斑块区域的荧光寿命编码图像显示为代表较长荧光寿命的蓝绿色,而斑块区域则显示为代表较短荧光寿命的淡黄色,这意味着冠状动脉内膜组织从正常发展到斑块病变,其荧光寿命会相

应地变短。

利用荧光寿命双指数衰减模型计算了所有样品 43 个区域在不同深度处的平均荧光寿命参数  $\tau_{\text{mean}}$ ,统计结果如图 4 所示。利用统计学单侧配对  $t$  检验方法对 8 个样品的非病变和病变区域的平均荧光寿命  $\tau_{\text{mean}}$ 进行显著性差异评估,统计结果显示荧光寿命参数  $\tau_{\text{mean}}$  具有非常高的显著性差异 ( $P=0.0004$ )。

荧光寿命的分析和统计结果证明用荧光寿命这一指标来区分冠状动脉内壁非动脉粥样硬化斑块和斑块组织具有可行性,尤其是平均荧光寿命参数  $\tau_{\text{mean}}$ 在斑块区域和非斑块区域有显著差异。因此,平均荧光寿命参数  $\tau_{\text{mean}}$ 有望作为识别冠状动脉粥样硬化斑块的定量指标。

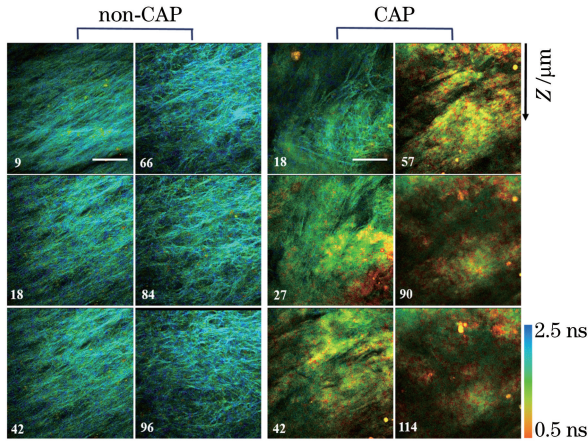


图 3 人冠状动脉内膜非斑块区域和粥样硬化斑块区域的荧光寿命编码图(右侧彩色带代表荧光寿命范围:0.5~2.5 ns)

Fig. 3 Fluorescence lifetime-code images with different depths of the non-CAP and CAP lesion human coronary arterial intima. The right color band represents the range of spectral fluorescence lifetime: 0.5–2.5 ns

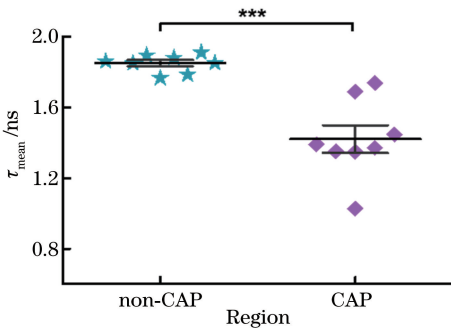


图 4 人冠状动脉内膜非斑块和斑块区域荧光寿命的定量分析(\*\*\*代表  $P < 0.001$ )

Fig. 4 Quantitative fluorescence lifetime of the biochemical components of normal and AP regions from human coronary arterial wall (\*\*\*) means  $P < 0.001$

## 4 结 论

基于光谱和时间分辨的多光子显微技术的光谱和荧光寿命分析方法,能够区分冠状动脉内壁的粥样硬化病变和非病变组织,实现对人冠状动脉粥样硬化病变的识别。该技术具有高分辨以及快速的形态学和生化学成像特点,有希望直接应用于冠心病的临床诊断。本研究所用设备是在光学平台上搭建的,体积比较庞大,尚无法直接用于临床标本的检测。但是,随着光子学和微细加工技术的进一步发展,有望将本项目的研究成果应用于临床。

## 参 考 文 献

- [1] Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, et al. Global burden of cardiovascular diseases: part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies [J]. *Circulation*, 2001, 104(23): 2855-2864.
- [2] Steinberg D, Gotto A M, Jr. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside[J]. *JAMA*, 1999, 282(21): 2043-2050.
- [3] Virmani R, Burke A P, Farb A, et al. Pathology of the vulnerable plaque[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(8): C13-C18.
- [4] Mao D B. Non-invasive assessment of coronary atherosclerotic plaques by MSCT [J]. *Shanghai Medical Imaging*, 2004, 13(1): 69-70, 75. 毛定飏. 冠状动脉粥样斑块的 MSCT 无创性评价 [J]. *上海医学影像*, 2004, 13(1): 69-70, 75.
- [5] Hansson G K, Robertson A K L, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2006, 1(1): 297-329.
- [6] Rekhter M D, Hicks G W, Brammer D W, et al. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma[J]. *Circulation Research*, 2000, 86(1): 101-108.
- [7] Burke A P, Farb A, Malcom G T, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly[J]. *New England Journal of Medicine*, 1997, 336(18): 1276-1282.
- [8] Lowe H C, Narula J, Fujimoto J G, et al. Intracoronary optical diagnostics [J]. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2011, 4(12): 1257-1270.
- [9] Sobenin I A, Sazonova M A, Postnov A Y, et al. Changes of mitochondria in atherosclerosis: possible determinant in the pathogenesis of the disease [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 283-288.
- [10] Jaffer F A, Libby P, Weissleder R. Optical and multimodality molecular imaging [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29(7): 1017-1024.
- [11] O'Donnell M, McVeigh E R, Strauss H W, et al. Multimodality cardiovascular molecular imaging technology[J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2010, 51(S1): 38S-50S.
- [12] Li X, Li H, He X Z, et al. Spectrum- and time-resolved endogenous multiphoton signals reveal quantitative differentiation of premalignant and malignant gastric mucosa [J]. *Biomedical Optics*

- Express, 2018, 9(2): 453-471.
- [13] Li H, Xia X Y, Chen T, et al. Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207010.  
李慧, 夏先园, 陈廷爱, 等. 双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用 [J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207010.
- [14] Zoumi A, Lu X, Kassab G S, et al. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy [J]. Biophysical Journal, 2004, 87(4): 2778-2786.
- [15] Marcu L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2012, 40(2): 304-331.
- [16] Chorvat D, Jr, Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues [J]. Laser Physics Letters, 2009, 6(3): 175-193.
- [17] Fan S P, Peng X, Lu Y, et al. Diagnosis of basal cell carcinoma based on two-photon induced fluorescence and fluorescence lifetime imaging [C] // Proceedings of 2013 academic symposium of Guangdong biophysical society. Guangzhou: Guangdong Provincial Association for Science and Technology, 2013: 97-98.  
范顺萍, 彭晓, 陆原, 等. 基于双光子激发荧光与荧光寿命成像的基底细胞癌诊断 [C] // 广东省生物物理学会 2013 年学术研讨会论文集. 广州: 广东省科学技术协会, 2013: 97-98.
- [18] Teh S K, Zheng W, Li S X, et al. Multimodal nonlinear optical microscopy improves the accuracy of early diagnosis of squamous intraepithelial neoplasia [J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(3): 036001.