

大鼠早期急性心肌缺血中的荧光成像和光谱分析

蔡吓妹^{1,2} 喻碧莺^{1,2} 吴淑莲^{1,2} 陈海宇³ 李 晖^{1,2} 谢文明^{1,2} 林 璇^{1,2}

¹福建师范大学物理与光电信息科技学院, 福建 福州 350007
²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
³福建医科大学省立临床医学院, 福建 福州 350007

摘要 采用结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法建立急性心肌缺血模型,通过双光子荧光显微成像技术(TPEF)获取左心室前壁不同缺血时间的图象,得到心肌在不同缺血时间情况下的双光子荧光图像及其光谱图像。从荧光图像中得到不同时刻形态学信息及心肌细胞代谢信息;从光谱图像中分析心肌缺血组织物质成分。

关键词 光谱学; 双光子荧光显微成像术; 荧光图像; 光谱图像

中图分类号 O436

OCIS 170.2520 180.2520

文献标识码 A

Evaluation of Myocardial Ischemia by Two-Photon Excited Fluorescence in Vivo

Cai Xiamei^{1,2} Yu Biying^{1,2} Wu Shulian^{1,2} Chen Haiyu³ Li Hui^{1,2}
Xie Wenming^{1,2} Lin Xuan^{1,2}

¹School of Physics and Opto-Electronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China
²Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China
³Provincial Clinical Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Due to the important application of left anterior descending coronary artery in pathology research of rat cute anoxemia of cardiac muscle, a cute anoxemia model of rat is established using ligation of the left anterior descending branch. Then the front wall fluorescence image and spectral imaging of left ventricle in different time are attained by two-photon excited fluorescence. It can be used to analyze intrinsic species of cardiac muscle and investigate metabolism of cardiac muscle cells. Furthermore, the causation is analyzed based on the pathology.

Key words spectroscopy; two-photon excited fluorescence; fluorescence image; spectral imaging

1 引 言

心血管系统疾病是对人类健康与生命威胁最大的一组疾病^[1,2],以冠状动脉粥样硬化性心脏病所致心肌缺血为例,自1967年R. G. Favaloro^[3]首次进行冠状动脉旁路移植术以来,目前该手术已在国内外广泛应用。虽然近年来不断涌现出多种新型、微创的治疗方法和理念,如:经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)及支架置入术、激光心肌血运重建术(TMR);在组织基因工程方面,冠心病和心肌梗死的治疗包括血管再生和心肌再生等;外科手术对心肌缺血的血运重建术仍然是治疗目前冠心病心肌缺血的重要手段。因此及早判定心肌缺血状态对冠心病患者有着重要的意义。

双光子显微成像技术(TPEF)是继共焦成像技术^[4~6]之后,发展起来的一项重要技术,在高强度激光激发下,利用物质本身的非线性光学效应实现的一种空间滤波。它不仅解决了普通共焦成像中空间滤波小孔

收稿日期: 2009-04-07; 收到修改稿日期: 2009-11-10

基金项目: 教育部高校优秀青年教师资助课题。

作者简介: 蔡吓妹(1983—),女,硕士研究生,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: yiping073@163.com

导师简介: 李 晖(1963—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: hli@fjnu.edu.cn
(通信联系人)

易堵、调节困难等问题,而且在生物医学领域中,近红外的激发波长还可以极大地减少对样品的漂白损伤和增加成像的层析深度。正因如此,双光子显微术已经开始在生物医学领域广泛应用^[7~9],涉及的范围从分子的研究到组织成像。双光子荧光显微成像技术具有较低的光漂白与光损伤、较佳的成像对比度、较深穿透深度等的优点,近年来在生物医学领域上已得到了广泛的应用,包括神经生物学、发育生物学、肿瘤学、免疫学、细胞生物学及厚组织成像等。2002年 Shaohui Huang 等^[10]曾用荧光来观测心肌中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。本文主要采用飞秒激光作为激发光,用双光子激光扫描共焦显微镜(TPLSCM)观察和分析样品。

2 材料和方法

2.1 材料准备

- 1) 实验动物:连续观察3天的心电图正常健康清洁级别 wistar 大鼠5只,雄性,体重300~350 g;
- 2) 术前准备:大鼠在术前12 h 禁食,自由饮水;
- 3) 麻醉:腹腔注射质量分数为10%的水合氯醛,4 mL/kg,麻醉固定;
- 4) 备皮:颈胸部剪毛备皮;
- 5) 连接心电图机:针行电极刺入大鼠脚掌;
- 6) 消毒:颈胸部常规消毒铺巾;
- 7) 手术过程:对照组与处理组均沿胸骨正中线左侧旁开1~2 mm,3~5肋间处剪开皮肤,按照肌肉的纹路分离肌肉露出肋骨,胸骨正中线左侧旁开1~2 mm 剪开胸肌及3~5肋,进胸后用止血钳将剪断的肋骨夹住掰开,放入开睑器,充分暴露心脏。钝性分离左锁骨下静脉,湿纱覆盖,备用采血。切开心包,以左冠状静脉主干为标志于左心耳根部下1~2 mm 处进针,以0/6滑线穿过心肌表层在肺动脉圆锥旁出针,对照组只穿线不结扎左冠状动脉前降支。以结扎后远端供血区心肌组织颜色苍白,心电图标准II导联ST段持续抬高(波动不小于0.1 mV)作为结扎成功的标志;
- 8) 心电图机(型号:6511)上海光电医用电子仪器公司;
- 9) DH-140呼吸机浙江医科大学医学仪器实验厂,参数为呼吸频率每分钟70次,呼吸比1:1,PEEP为0,潮气量为8~10 mL/300 g,FiO₂的质量分数为21%。

2.2 观察以及扫描测量

首先结扎大鼠冠状动脉左前降支,心电图是判断急性心肌缺血模型是否成功的,目前广泛采用,但是不能作为判断心肌损伤程度的指标。取下缺血区域切片,并且把每片切片夹于载玻片与盖玻片之间。在整个成像过程,为了避免样品脱水和收缩,PBS溶液(pH7.4)喷洒于样品表面上。其中大鼠心肌缺血的时间依次在0, 60, 180 min。由于心肌细胞本身的成分比较单一,且绝大部分是由梭状的心肌细胞组成,内部含有NADH及FAD,只有极少的弹力纤维和胶原。鉴于此,选用对NADH及FAD激发极为有利的波长750 nm和对胶原成像有利的波长810 nm分别进行成像。双光子在750 nm的波段有较强的荧光信号,而由于心肌组织包含的胶原极少,故810 nm激发信号中与胶原相关的二次谐波信号强度明显小于荧光信号强度。因此实验选取在750 nm作为激发波长。最后将心肌组织脱水、浸蜡并石蜡包埋,连续切片,常规HE染色。其中标本取自大鼠左心室游离壁双光子荧光成像区域中部心肌,厚约为3 mm,并在激光扫描共焦显微镜下对急性心肌缺血进行成像。

3 结果和讨论

3.1 心电图

大鼠开胸及结扎(LAD)后描记的心电图(ECG)如图1所示。结扎后的心电图说明心肌梗建模成功。以结扎后标准的II导联ST段持续偏移不小于0.1 mV为结扎成功的标志。



图1 结扎后心电图

Fig.1 ECG after ligatting LAD

3.2 组织学观察

1) 正常心肌组织细胞的 HE 染色均匀,细胞核等大,横纹明显,细胞核清晰,无浆液性渗出,淋巴细胞游走等病理学变化,如图 2 所示。

2) 结扎冠状左前支实验组:获取左心室前壁缺血区域内出现了细胞核固缩,心肌细胞肿胀,血管内大量淋巴细胞向外游走,心肌细胞空泡样变性,心肌细胞浆液性渗出,血管内有多个单核细胞等病理学病变。多光子显微镜成像图如图 3 所示。

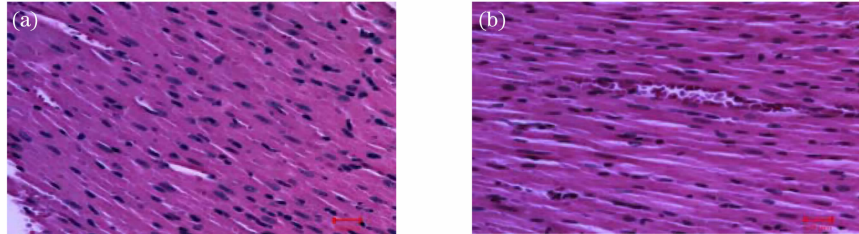


图 2 正常心肌组织。(a) 正常心肌组织横纹明显,无浆液性渗出,(b) 细胞核清晰,血管内未见淋巴细胞
Fig.2 Normal cardiac muscle. (a) cardiac muscle transverse striation in evidence and no serous effusion,
(b) cardiac muscle nucleus in focus and no lymphocyte in blood vessel

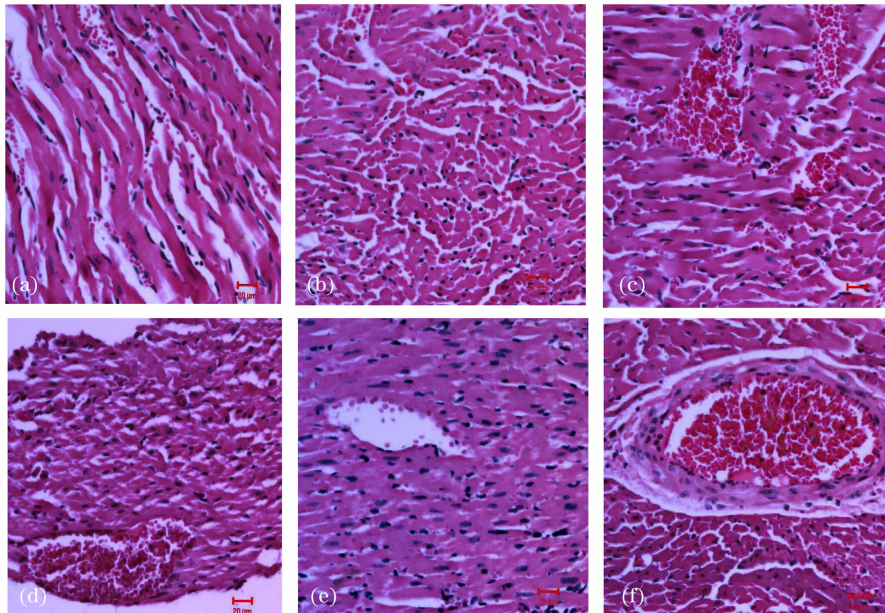


图 3 心肌组织在心肌缺血后的多光子显微镜成像图。(a)心肌细胞肿胀,(b)细胞核固缩,(c)血管内大量淋巴细胞向外游走,
(d)心肌细胞空泡样变性图,(e)心肌细胞少量浆液性渗出,(f)血管内有多个单核细胞

Fig.3 Image of cardiac muscle after ligating LAD. (a) cardiac muscle cell swelling, (b) cardiac muscle cell pycnosis, (c) bulk lymphocyte transmigration in blood vessel, (d) cardiac muscle cell vacuole denaturalization, (e) cardiac muscle cell jot serous effusion, (f) many monocyte in blood vessel

3.3 光谱分析

在光谱成像模式下,实验获得了正常大鼠心肌组织的光谱分辨 TPEF 及感兴趣区域(ROI)的光谱,分别如图 4(a),(b)所示。由于心肌细胞本身的成分比较单一,且绝大部分是由梭状的心肌细胞组成的,内部含有 NADH 及 FAD,只有极少的弹力纤维和胶原。鉴于此,选用对 NADH 及 FAD 激发极为有利的波长 750 nm 和对胶原成像有利的波长 810 nm 分别进行成像。双光子在 750 nm 的波段有较强的荧光信号,而由于心肌组织包含的胶原极少,故 810 nm 激发信号中与胶原相关的二次谐波信号强度明显小于荧光信号强度,因此实验采用 750 nm 的激发光源。从光谱图像中可以看出,有两个峰值 470 nm 和 530 nm,由于心肌组织含有丰富 NAD(P)H 和 FAD,所以其中 470 nm 波峰的为 NAD(P)H,530 nm 波峰的为 FAD 的自体荧光,上述光谱

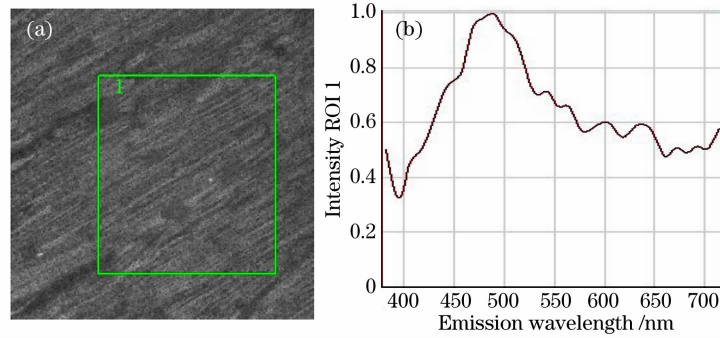


图4 心肌缺血组织的 TPEF 光谱分辨图像(a)及感兴趣区域的光谱(b)

Fig.4 Spectrally resolved TPEF image of cardiac muscle (a) and the corresponding spectra from regions of interest (ROI) (b). They were simultaneously obtained by using the Lambda mode for 750 nm. The excitation power is 5 mW. The image is 135 pixel \times 315 pixel

以最大峰值进行归一化。由于细胞的 NADH 和 FAD 不仅传递细胞的信息还与组织病理情况相关^[11~13], 所以该方法可以评价组织的病理情况和细胞的新陈代谢情况。计算得大鼠正常心肌组织代谢率约为 0.4 (其中在同一组织里面取 5 个不同部位的平均值)。

心梗后组织内部的心肌细胞荧光信号逐渐减慢的趋势如图 5 所示。对应的心梗后组织内部的心肌细胞代谢会变慢,说明应用双光子显微术可测定其心肌缺血的变化。只是不知荧光减弱的速度与心梗的时间之间的关系,若荧光减弱速度很快,实验需更多的时间,那意味着所取时间点要更密集。

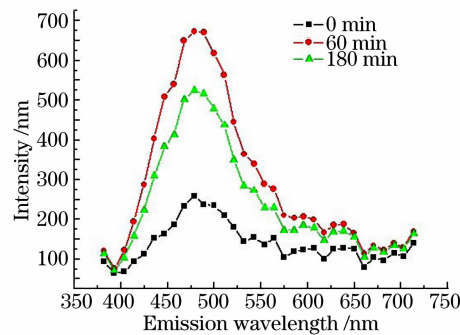


图5 缺血心肌组织光谱

Fig.5 Emission spectra obtained from cardiac muscle

4 结 论

心肌缺血的主要矛盾是心肌对氧气的供需失调,缺血时大量自由基聚集,引起心肌细胞膜脂质过氧化,可使细胞膜的流动性、通透性增加,完整性丧失,同时脂质过氧化物丙醛等生成增多,心肌损伤加剧^[14]。心梗后组织内部的心肌细胞代谢会变慢,得到的双光子荧光信号逐渐减弱。组织的变化使得由双光子荧光测出的 NADH 和 FAD 的荧光强度和代谢率有变化。说明双光子荧光显微术对于心肌缺血的程度的判定有很大的潜力,并且对急性心肌缺血临床提供重要的指导意义。本文只是对心肌缺血并发症进行初步的讨论,对于新陈代谢率的变化引起心肌组织的何种改变等有待进一步的研究。

参 考 文 献

- Huo Yong, Gao Wei, Ding Wenhui. Myocardial Infarction[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2003. 1
霍 勇,高 炜,丁文惠. 心肌梗死[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2003. 1
- Li Gandi, Lai Maode. Pathology[M]. Beijing: People's Medical Press, 2001
李甘地,来茂德. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001
- R. G. Favaloro. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique

- [J]. *Ann. Thorac. Surg.*, 1968, **5**(4): 334~339
- 4 M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope[J]. *Scanning*, 1998, **10**(11): 128~136
- 5 P. D. Avidovitz, M. D. Egger. Scanning laser microscope[J]. *Nature*, 1969, **223**(5208): 83~88
- 6 M. Petran, M. Hadravsky. Tandem-scanning reflected-light microscope[J]. *J. Opt. Soc. Am.*, 1968, **58**(5): 661~669
- 7 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 8 W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(1): 1369~1377
- 9 W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie *et al.*. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**(12): 7075~7080
- 10 Shaohui Huang, Ahmed A. Heikal, Watt W. Webb. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein[J]. *Biophysical J.*, 2002, **82**(5): 2811~2825
- 11 A. Zoumi, X. Lu, G. S. Kassab *et al.*. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy[J]. *Biophysical J.*, 2004, **87**(4): 2778~2786
- 12 R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis[J]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1996, **47**(5): 555~606
- 13 I. Georgakoudi, B. C. Jacobson, M. G. Muller *et al.*. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes[J]. *Cancer Res.*, 2002, **62**(3): 682~687
- 14 Chen Xiu, Chen Weizhou, Zeng Guiyu *et al.*. Cardiovascular Pharmacology[M]. 2nd ed., Beijing: People's Medical Press, 1998. 400~402
- 陈修,陈维洲,曾贵云等. 心血管药理学[M]. 第2版,北京:人民卫生出版社,1998. 400~402