

荧光寿命成像技术及其研究进展

刘超 周燕 王新伟 刘育梁

(中国科学院半导体研究所光电系统实验室, 北京 100083)

摘要 荧光寿命显微成像(FLIM)技术是一种新颖的荧光成像技术,具有其他荧光成像方法无法替代的优异性能,是生物医学工程领域的研究热点。频域调制、门控探测和时间相关单光子计数(TCSPC)是FLIM的几种主要实现方法。综述了这些技术的原理、研究现状和已取得的部分成果,比较了这三种方法的时间分辨率和成像速度等参数的优劣。宽场FLIM更适用于延时成像和实时成像。荧光偏振各相异性成像和内窥镜FLIM技术都是FLIM技术很有前景的应用方向。

关键词 测量;荧光寿命成像;单光子计数;门控探测;频域调制

中图分类号 O433 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP48.111102

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy and Its Research Progress

Liu Chao Zhou Yan Wang Xinwei Liu Yuliang

(*Optoelectronic System Laboratory, Institute of Semiconductors, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China*)

Abstract Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) technology has so many outstanding and unique advantages compared with other fluorescence imaging methods that it attracts more and more researchers in biomedicine engineering field. Frequency domain modulation method and time domain methods including time-gated detection and time correlated single photon counting (TCSPC), are the main ways to realize FLIM. Principles, current research situation and achievements of these methods are presented as well as the comparison of their main performance parameters. Wide-field FLIM is more suitable for delay imaging. Fluorescence lifetime polarization resolved imaging and endoscope FLIM are both promising research areas of FLIM.

Key words measurement; fluorescence lifetime imaging microscopy; time-correlated single photon counting; time-gated detection; frequency modulation

OCIS codes 110.0180; 170.2520; 260.2510

1 引言

荧光光谱技术等主要基于荧光强度的测量方法容易受激发光强度、样品猝灭和荧光染料的浓度分布等因素的影响,因此难以做到定量测量。荧光寿命一般来说是绝对的,不受激发光强度、荧光团浓度和光漂白等因素的影响,而仅与荧光团所处的微环境密切相关。因此,测量样品荧光寿命的荧光寿命成像显微术(FLIM),可以对目标分子所处微环境中的诸多生物物理参数,如氧压、溶液疏水性等及生物化学参数,如pH值、离子浓度等进行定量测量^[1]。本文概述频域及时域FLIM的主要技术方法,介绍一些与FLIM成像相关的技术。

2 FLIM技术的分类及总体进展

荧光发射后会以指数规律衰减。荧光寿命通常定义为荧光强度降至其最大值的 $1/e$ 时所需的时间,常用 τ 表示。由于荧光分子所处环境的不同,荧光发射可分为单组分和多组分两类,最简单的情况即单组分

收稿日期: 2011-04-08; 收到修改稿日期: 2011-05-29; 网络出版日期: 2011-08-27

作者简介: 刘超(1988—),男,硕士研究生,主要从事光电图像处理方面的研究。E-mail: lcphs820@gmail.com

导师简介: 刘育梁(1966—),男,研究员,博士生导师,主要从事光电图像处理,光纤传感等方面的研究。

E-mail: ylliu@semi.ac.cn(通信联系人)

下, 荧光信号的衰减可表示为

$$I = I_0 \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

式中 I 为 t 时刻荧光强度, I_0 为最大荧光强度。如果有大量处在相似环境里的荧光分子被激发, 那么发射荧光的衰减遵循单指数规律, 即单组分。典型的荧光信号通常都是多组分, 即多指数规律衰减^[2]。

FLIM 技术发展到现在, 形成了频域和时域两大类方法。其中门控探测 (Time-Gated Detection)、时间相关单光子计数 (TCSPC) 和扫描相机成像 (Streak-FLIM) 是三种主要的时域实现方法。

国际上从 20 世纪 80 年代开始荧光寿命成像方面的研究工作。较早从事荧光寿命成像技术方面研究工作的是日本大阪大学, 他们提出了频率调制法来进行荧光寿命测量^[3]。频率调制法原理清晰, 设备要求低, 系统简单且造价低, 技术也日趋成熟。随着生物医学测量的需要, 可进行纳秒、皮秒甚至飞秒量级荧光寿命成像的实时时域 FLIM 技术随后兴起, 相对于频域调制法具有成像速度快, 时间分辨率高等优点。TCSPC 是一种经典的光子测量技术, 在目前时域 FLIM 中应用最广泛, 技术也很成熟。TCSPC 最早在 1975 年被美国 PTI 公司商品化。20 世纪 90 年代, 大阪大学也开始了 TCSPC-FLIM 的研究。现在有很多科技公司从事这方面的研究, 德国 Becker & Hickl GmbH 公司是国际上知名的 TCSPC 设备供货商, 并在该领域拥有领先的技术。与此同时, 时间分辨率不及 TCSPC, 但成像速度更快的门控 FLIM 技术逐渐成为 FLIM 领域的研究热点。目前国际上门控 FLIM 技术主要的研究单位有伦敦帝国大学^[4]、荷兰乌特勒支大学^[5]、伊利诺伊州立大学香槟分校^[6]及加州大学戴维斯分校^[7]等, 研究领域几乎都集中在泛光照明下生物样本荧光强度图像的获取和荧光寿命探测的理论及实验研究等方面。

国内关于 FLIM 技术的研究才刚刚开始, 开展的单位较少。深圳大学光电子研究所牛憨笨院士研究小组开展了基于扫描相机技术的 FLIM 研究, 取得了基于 TCSPC 的 FLIM 的相关中国专利^[8,9], 并将其应用到了眼部疾病的早期诊断。中国科学院半导体所目前正在开展门控荧光寿命成像的研究工作。

3 频域 FLIM 技术

图 1 为频域 FLIM 原理^[10]。频域 FLIM 使用正弦调制的激光器或发光二极管 (LED) (调制频率典型值为 10~100 MHz) 作为光源对样品进行激发, 样品会产生与激发光同频率但相位差为 $\Delta\phi$ 的荧光信号; 然后使用同频调制的 CCD 或者 PMT 作为探测器解调并接收荧光信号; 通过测量相移 ϕ 和解调系数 M , 即可计算相应的荧光寿命 τ_ϕ 和 τ_M ^[10]:

$$\tau_\phi = \frac{1}{\omega} \tan \Delta\phi, \quad (2)$$

$$\tau_M = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{M^2} - 1}, \quad (3)$$

式中 ω 为调制频率, 调制系数 M 可表示为

$$M = \frac{AC_{em}/DC_{em}}{AC_{ex}/DC_{ex}}. \quad (4)$$

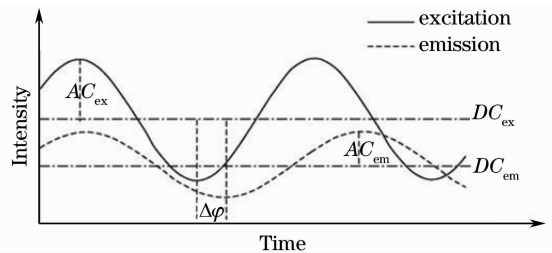


图 1 频域 FLIM 原理

Fig. 1 Principles of frequency domain FLIM

国际上对频域 FLIM 的研究开展较早。日趋成熟的技术让研究者对频域 FLIM 在医学诊断领域的应用产生了浓厚的兴趣。如何提高成像速率成为频域 FLIM 应用首先需要解决的问题。1999 年, 瑞士环境工程研究所的 Mizeret 等^[11]实现了视频速率的内窥镜频域 FLIM 成像, 将其应用到了医疗诊断领域。2000 年, 伊利诺伊大学厄本那一香槟分校的 Holub 等^[6]实现了帧频 55 Hz 的频域 FLIM, 是当时 FLIM 技术的最快帧频。时域 FLIM 技术可提供更快的成像速度和更好的分辨率, 但频域 FLIM 由于原理明晰, 设备简单仍不失为重要的 FLIM 实现方法。2004 年, 新加坡南洋理工大学的 Seah 等^[10]使用频域 FLIM 完成了对潜在指纹的识别。在某些对成像速率要求不高的场合, 频域 FLIM 还有很高的应用价值。

4 时域 FLIM 技术

时域 FLIM 通过脉冲激光器激发荧光团, 利用探测器 (如 ICCD、PMT 等) 直接探测荧光衰减信号成像。

时域设备与频域相比,通常拥有更快的成像速度和更高的时间分辨率,因此对设备的要求更高。TCSPC 有理想的光子计数率和超高的时间分辨率,与门控探测相比,可测量更短的荧光寿命(皮秒量级)。门控法的荧光寿命分辨率虽不及 TCSPC,但图像获取速度通常很快,是实现非稳态过程探测的有力技术手段。在几种时域方法中,本文着重介绍门控 FLIM。

4.1 时间相关单光子计数

由于某一段时间内检测到发射光子的概率与此时段内的荧光强度成正比,那么通过探测荧光强度的衰减即可实现荧光寿命的探测。TCSPC 即基于上述原理实现。如图 2 所示^[2],每一次激发脉冲为一个测量周期,每个周期最多记录一个荧光发射光子;记录该光子出现的时间,并在坐标上记录频次;经过大量的累计,即可构建出荧光发射光子在时间轴上的概率分布曲线,即荧光衰减曲线^[2,13]。由于每个周期只记录一个光子,成像速度较慢便成为 TCSPC 无法回避的最大缺点。TCSPC 的时间分辨率很高,通常只受探测器[如光电倍增管(PMT)、雪崩二极管(APD)]的渡越时间限制。Becker 等^[12]报道使用基于快速卷积 PMT 的 TCSPC 可分辨 150 ps 的寿命,而基于微通道板 PMT 的设备可分辨 25~30 ps 的荧光寿命。

4.2 门控探测

图 3 为理想的单指数荧光衰减曲线,在激发光 $E(t)$ 作用下,荧光团发射荧光,其荧光强度 $F(t)$ 与时间 t 的关系可表示为

$$F(t) = F_0 \exp(-t/\tau), \quad (5)$$

式中 F_0 为最大荧光强度。在荧光激发经 t_G 时间的延迟后,开启一个宽度为 Δt 的时间门,在此时间段内对荧光强度进行积分,经过一定推导后,可以通过两个不同的 t_G 求得 τ

$$\tau = \frac{t_{G_2} - t_{G_1}}{\ln[H(t_{G_1})/H(t_{G_2})]}, \quad (6)$$

即荧光寿命可通过在两个不同延迟时刻开启的相同宽度的门内记录的荧光强度信息求得。因此理论上,使用双门控进行时域荧光寿命成像是可行的。但是光源(激光器、LED 等)的不稳定和探测器图像增强器的增益随机性限制了双门控探测法的精确度。故而在条件允许的情况下,通常采用多门控探测,即选取多个窗口获取多幅图像(通常为 5~10 幅)来反演寿命图像^[14]。一个典型的设置为:取三个不同的延迟时刻(即三个时间门),每个门记录 1~5 幅图像^[15]。

图 4 是一个典型的门控荧光寿命成像系统简图。生物荧光寿命成像装置通常由激发光源、光电探测器

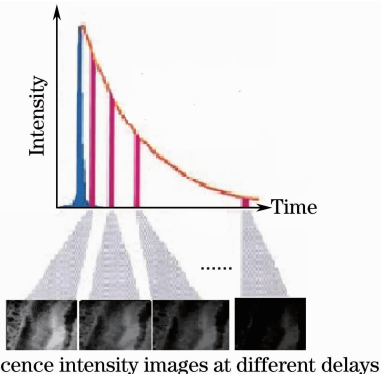


图 3 门控 FLIM

Fig. 3 Time-gated FLIM

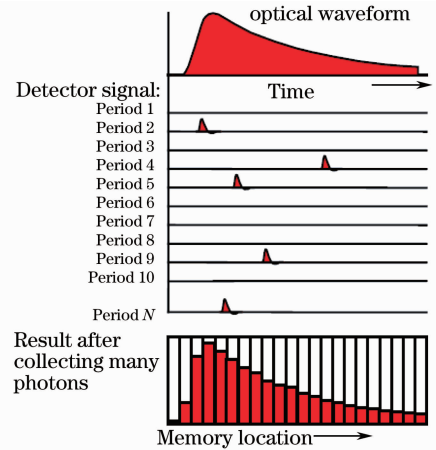


图 2 单光子计数原理

Fig. 2 Principles of TCSPC

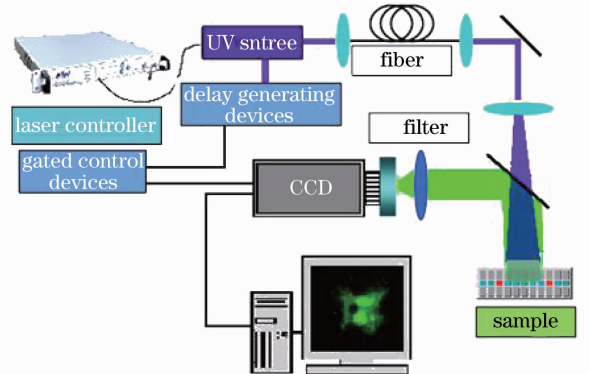


图 4 典型门控荧光寿命成像系统框图

Fig. 4 Typical system of time-gated FLIM

(成像器件)、延迟装置及图像处理设备组成。门控装置的光源通常为短脉宽超快激光器,以提高生物样品成像的寿命分辨率。CCD是常见的成像设备,CCD门宽对成像精度的影响还需要深入的研究。延迟装置提供FLIM的控制信号,可由光纤产生的光延迟及光学鉴相器,延迟产生器及延迟线等延迟装置产生的电延迟提供^[4]。由于光电探测器及CCD等成像器件输出的都是光强度信息,需要利用强度信息图像反演出荧光寿命图像。由荧光强度图像生成寿命图像的方法主要有两种:Rapid Lifetime Determination (RLD)和Weighted Nonlinear Least Square (WNLLS)^[16]。前者利用单组衰减规律即(6)式直接逐点计算两幅图像各像素的强度比,进而得到荧光寿命,因此也可称为比率法^[5]。由于初始数据只有两幅图像,数据量小,该方法的特点是计算速度快。后者可用最小二乘法拟合各像素点的强度衰减规律,由荧光寿命的定义求得各像素的荧光寿命。测量精度高的代价是计算速度相对较慢。门控控制装置保持整个系统信号的同步。

如何提高门控方法的性能是研究的重点,为此硬件和软件方面的进步都推动了门控方法的进步,使其成为当前FLIM研究中最引人入胜的领域。

门控系统图像获取帧频较快,但是荧光寿命分辨率不及TCSPC。光源激发脉冲越短,门控探测的精确度越高。由于短脉冲激光器的成本高、设备复杂,门控方法成像速度快的优势一度表现不明显。但是随着半导体激光器的发展,获取短脉冲激光的成本大大降低,门控探测的研究也越来越受到重视。1999年,伦敦帝国大学的Jones等^[17]首次使用全固态二极管抽运激光器(波长820~850 nm,脉宽40 fs)实现了门控FLIM。相对TCSPC法,门控FLIM的特点是成像速度快。2004年,荷兰乌特勒支大学的Agronskaia等^[5]在活体细胞钙离子成像实验中获得了100 Hz的帧频(即每秒100幅图像),这一速度是目前FLIM领域的记录。使用宽场显微系统和基于两幅强度图像的比率算法是取得这一速度的技术关键。近年来,基于拉盖尔多项式的指数衰减规律拟合方法因具有更高的精确度而受到研究者欢迎,这一方法被广泛用以实现门控FLIM寿命图像计算^[18]。此外,这种方法因其更快的计算速度,更适用于医疗诊断情境下的寿命反演^[7]。

5 宽场 FLIM 系统

宽场 FLIM 是宽视场的荧光寿命成像显微镜,图 5 给出了宽场显微镜与扫描显微镜的对比^[2]。与扫描显微镜相比,宽场 FLIM 技术的优势在于较弱的荧光团光漂白效应和较快的系统成像速度。在相同探测率下探测相同数量的光子,宽场成像与扫描成像所需的总激发量是相等的。但是由于宽场系统的激发光束是未经聚焦的(图 5),所需的激发光强要小得多,则样品受到光漂白的影 响会小于扫描系统。此外,相对于逐点成像的扫描系统,宽场系统拥有更快的成像速度,适用于要求实时成像的情境。由于光束未聚焦的本征属性,宽场系统的缺点在于其成像深度小于扫描系统,无法获得样本深层的图像。这一缺点也可通过其他手段得到改善,如伦敦帝国大学的 Neil 等^[19]运用宽场 FLIM 获取了三维荧光图像。

6 荧光偏振各相异性成像

偏振也是荧光的特征,包含着用来计算荧光寿命的信息,这些信息有时是寿命、强度等荧光特征里不包含的,因此荧光偏振成像可作为 FLIM 技术的补充。各相异性测量的原理是:若样品被偏振光激发,由于荧光的发射具有各向异性特征,则其偏振方向取决于激发光的偏振方向以及荧光团的分子极化方向。但随之产生的荧光团旋转扩散,将会导致其解偏振。因此,经过一段时间后,荧光的偏振度或各向异性性将降低,降低量取决于荧光团的构像及其所处微环境的变化。通过测量荧光各向异性的衰减时间,就有可能了解更多有关荧光团及其所处微环境的信息^[20]。

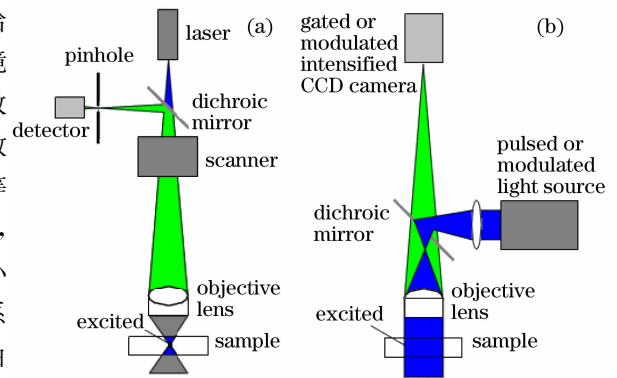


图 5 (a)激光扫描荧光显微镜;(b)宽场荧光显微镜
Fig. 5 (a) Laser scanning; (b) wide-field
fluorescence microscope

图 6 为一个基于 TCPSC 的时间相关荧光各相异性成像系统^[21]。该装置与普通 TCSPC 装置的区别在于,此装置将正交偏振光的平行光与垂直光成分分开探测以达到记录荧光偏振信息的目的。线偏振脉冲激光器用以激发样品荧光,荧光通过偏振分光镜(PBS)后,两个探测器(D1、D2)分别同步探测被分光镜分开的正交偏振光,探测器输出进入多通道路由和 TCPSC 卡进行处理。荧光的平行光和垂直光成分的衰减规律分别通过逐像素计算获得。两幅偏振分辨图像同时生成,进一步合成各相异性图像^[21]。

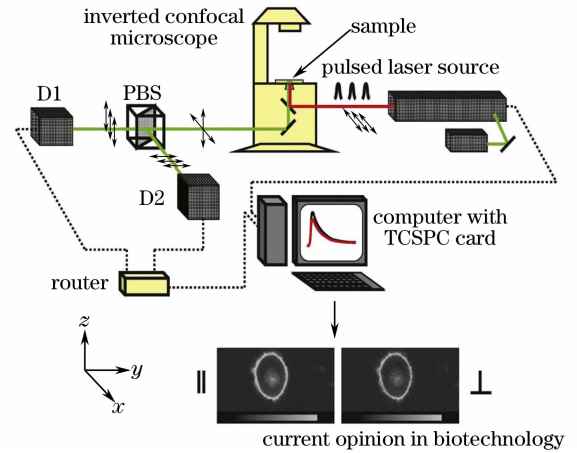


图 6 基于 TCPSC 的时间相关荧光各相异性成像系统框图
Fig. 6 System of time resolved fluorescence polarization imaging microscope

7 FLIM 技术与癌症诊断

癌细胞的自荧光特征与正常组织有较大差异,同时也可用于区分癌细胞的不同生长周期^[22]。其自荧光特征之一的荧光寿命提供了癌症诊断的新依据。伦敦帝国大学的 Galletly 等^[23]证明在体外,FLIM 可分辨基底细胞癌与正常皮肤组织。如图 7 皮肤癌组织荧光寿命照片中,癌组织与正常组织的寿命值相差很大,极易分辨^[14]。这样,应用 FLIM 技术可实现癌组织的精确定位,为手术治疗提供更准确的依据。近年来,国际 FLIM 的研究热点纷纷集中在 FLIM 对癌症的辅助诊断上。研究的方向也逐渐从体外病理检验向体内诊断治疗发展。

内窥镜是临床诊疗,特别是胃癌、食道癌诊断中非常重要的手段。直接在体内成像的优势使其可分辨体外诊疗方法(如 X 射线成像、核磁共振成像等)无法辨识的病变。因此,FLIM 与内窥镜的结合,将极大发挥其对癌症组织精确定位的优势。实时成像在内窥镜诊断中是非常必要的。早期瑞士国立环境工程研究所等机构的频域 FLIM 研究是实时内窥镜 FLIM 方面的有益探索^[11]。2010 年,加州大学戴维斯分校的研究小组成功利用实时内窥镜 FLIM 进行了脑部恶性肿瘤手术^[7]。该研究利用基于门控方法的 FLIM 内窥镜成像,采用拉盖尔多项式拟合算法获取了寿命图像(成像时间约 60 s)。这一鼓舞人心的成果大大推进了内窥镜 FLIM 的临床化进程。

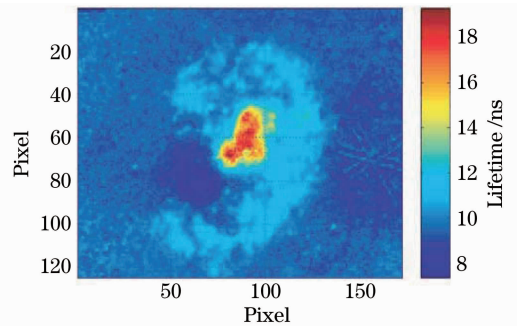


图 7 皮肤癌细胞荧光寿命图像
Fig. 7 Fluorescence lifetime image of skin tumor

8 结 论

在各种 FLIM 方法中,TCSPC 的时间分辨率最高,文献报道可达 25 ps,门控 FLIM 仅次于 TCSPC,可进行纳秒量级的寿命测试。但在成像速度上,门控 FLIM 是最快的,文献报道帧频可达 100 Hz。频域 FLIM 的成本最低,应用最广泛,但其性能指标均不及 TCSPC 和门控 FLIM 为主的时域方法。宽场 FLIM 可实现更快的帧频,更适合应用于门控 FLIM。荧光偏振各相异性成像可与 FLIM 技术相结合,以取得更佳的测量效果。内窥镜 FLIM 有广阔的医疗应用前景,可用于癌症等疾病的早期诊断。

参 考 文 献

- Li Dongxu, Xu Xiao, Li Na *et al.*. Time resolution fluorescence technology and fluorescence lifetime measurement[J]. *University Chemistry*, 2008, **23**(4): 2~11
李东旭, 许 潇, 李 娜 等. 时间分辨荧光技术与荧光寿命测量[J]. *大学化学*, 2008, **23**(4): 2~11
- W. Becker, A. Bergmann. Lifetime imaging techniques for optical microscopy[J]. [http://www.spx.ari.20na.edu/BME630/lecture%20Public/FLIM/TCSPC for Microscopy. pdf](http://www.spx.ari.20na.edu/BME630/lecture%20Public/FLIM/TCSPC%20for%20Microscopy.pdf)

- 3 X. F. Wang, T. Uchida, D. Coleman *et al.*. A two-dimensional fluorescence lifetime imaging system using a gated image intensifier[J]. *Applied Spectroscopy*, 1991, **45**(3): 360~366
- 4 D. Elson, J. Requejo-Isidro, I. Munro *et al.*. Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004, **3**(8): 795~801
- 5 A. Agronskaia, L. Tertoolen, H. Gerritsen. High frame rate fluorescence lifetime imaging[J]. *Appl. Phys.*, 2003, **36**: 1655~1662
- 6 O. Holub, M. Seufferheld, C. Gohlke *et al.*. Fluorescence lifetime imaging (FLI) in real-time-a new technique in photosynthesis reseach[J]. *Photosynthetica*. 2000, **38**(4): 581~599
- 7 Y. Sun, N. Hatami, M. Yee *et al.*. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery[J]. *J. Biomedical Optics*, 2010, **15**(5): 056022
- 8 Shenzhen University. Time resolution fluorescence spectrum measurement and imaging methods and implements[P]. China Patent, CN200510092520.0
深圳大学. 时间分辨荧光光谱测量和成像方法及其装置[P]. 中国专利: 国家发明专利, 专利公开号: CN200510092520.0
- 9 Wang Yan, Zhao Lingling, Chen Tongsheng *et al.*. Study on cell cycle using fluorescence lifetime imaging microscopic system based on a streak camera[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(3): 304002
王 岩, 赵聆伶, 陈同生 等. 利用基于扫描相机的荧光寿命成像显微技术研究细胞周期[J]. 中国激光, 2011, **38**(3): 304002
- 10 L. Seah, P. Wang, V. Murukeshan *et al.*. Application of fluorescence lifetime imaging (FLIM) in latent finger mark detection[J]. *Forensic Science International*, 2006, **160**(2-3): 109~114
- 11 J. Mizeret, T. Stepinac, M. Hansroul *et al.*. Instrumentation for real-time fluorescence lifetime imaging in endoscopy[J]. *Review of Scientific Instruments*. 1999, **70**(12): 4689~4701
- 12 W. Becker, A. Bergmann, M. Hink *et al.*. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting[J]. *Microscopy Reseach and Technique*, 2004, **63**(1): 58~66
- 13 Pingqiao Ruan, Feng Gao, Fang Yang *et al.*. An experimental investigation on two-dimensional shape based diffuse optical tomography[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2010, **8**(8): 787~790
- 14 R. Cubeddu R, D. Comelli, C. D'Andrea *et al.*. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine[J]. *J. Physics D: Appl. Phys.*, 2002, **35**(9): R61~R76
- 15 P. Urayama, W. Zhong, J. Beamish *et al.*. A UV-Visible-NIR fluorescence lifetime imaging microscope for laser-based biological sensing with picoseconds resolution[J]. *Appl. Phys.*, 2003, **76**(5): 483~496
- 16 J. Requejo-Isidro, J. Mcginty, D. Elson *et al.*. High speed wide field time-gated endoscope fluorescence lifetime imaging [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(19): 2249~2251
- 17 R. Jones, K. Dowling, M. J. Cole *et al.*. Fluorescence lifetime imaging for biomedicine using all-solid state ultrafast laser technology[J]. *SPIE*, 1999. 86~91
- 18 P. Paritosh, A. Jo Javier. Automated analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) data based on the laguerre deconvolution method[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2011, **58**(1): 172~181
- 19 M. Neil, A. Squire, R. Juskaitas *et al.*. Wide-field fluorescence microscopy with laser illumination[J]. *J. Microscopy*, 2000, **197**: 1~4
- 20 Liu Lixin, Qu Junle, Lin Ziyang *et al.*. Fluorescence lifetime imaging and its biomedical applications[J]. *J. Shenzhen University Science and Engineering*, 2005, **22**(2): 133~141
刘立新, 屈军乐, 林子扬 等. 荧光寿命成像及其在生物医学中的应用[J]. 深圳大学学报理工版, 2005, **22**(2): 133~141
- 21 J. Levitt, D. Matthews, S. Ameer-Beg *et al.*. Fluorescence lifetime and polarization resolved imaging in cell biology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, **20**(1): 28~36
- 22 Lin Xiaogang, Pan Yingjun, Guo Yongcai. The study of cervical cancer cells model based on UV absorption spectrum[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(5): 1328~1331
林晓钢, 潘英俊, 郭永彩. 癌细胞细胞周期自体荧光光谱特征[J]. 光学学报, 2009, **29**(5): 1328~1331
- 23 N. Galletly, J. McGinty, C. Dunsby *et al.*. Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin[J]. *The British J. Dermatology*, 2008, **159**(1): 152~161