

大鼠早期急性心肌缺血的双光子荧光成像及分析

喻碧莺^{1,2,3} 蔡吓妹^{1,2,3} 李志芳^{1,2,3} 陈海宇⁴ 李晖^{1,2,3*}

(¹医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007; ²福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007)
(³福建师范大学物理与光电信息科技学院, 福建 福州 350007; ⁴福建省立医院心血管外科, 福建 福州 350007)

摘要 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、较深的穿透深度等优点。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获得不同结扎时间下大鼠左心室前壁心肌组织的双光子荧光图像。从中分析了不同结扎时间下心肌组织的形态学变化,实现对心肌组织损伤范围的确定;并对双光子荧光图像进行快速傅里叶变换(FFT),使用方向指数这一参数对心肌缺血的程度进行初步的量化评估。结果表明,双光子荧光显微成像技术结合FFT分析技术,有望在心肌缺血性疾病的诊断和治疗中实时、快速、准确地判断心肌缺血的范围和评估其损伤程度。

关键词 医用光学; 双光子荧光成像; 心肌缺血; 快速傅里叶变换

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP49.021703

Two-Photon Fluorescence Imaging and Its Analysis
for Early Acute Myocardial Ischemia of RatYu Biying^{1,2,3} Cai Xiamei^{1,2,3} Li Zhifang^{1,2,3} Chen Haiyu⁴ Li Hui^{1,2,3}

¹Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350007, China

²Fujian Provincial Key Laboratory of Photonic Technology, Fuzhou, Fujian 350007, China

³School of Physics and Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

⁴Department of Cardiovascular Surgery, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Two-photon fluorescence imaging technology has several outstanding characteristics, including lower photon-bleaching and photo-damaging, high contrast and longer penetrating distance. An acute myocardial ischemia model of rat is established by the ligation of the left anterior descending branch. Then fluorescence images of the front wall of left ventricle at different ligation time are attained by two-photon fluorescence imaging. The morphologic change of myocardial ischemia tissue was obtained and a primary evaluation of the damage degree of myocardial tissue is obtained by fast Fourier transform (FFT) with an orientation index. The result indicates that the two-photon fluorescence imaging technology combined with FFT has the potential to be used for the estimation of myocardial ischemia tissue range and assess of the damage degree of myocardial tissue rapidly and accurately in the diagnosis and therapy in real time.

Key words medical optics; two-photon fluorescence imaging; myocardial ischemia; fast Fourier transform

OCIS codes 170.2520; 180.2520; 070.2590

1 引言

近年来,心血管疾病的发病率呈明显上升趋势,已成为威胁人类健康和生命的重要疾病之一。心肌缺血性疾病是心血管疾病中的焦点,其病因多为冠状动脉粥样硬化所导致的心肌梗塞坏死。目前冠状动脉旁路移植术(CABG)和经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)加支架置入术等是冠状动脉粥样硬化性心脏病最重要的治疗手段^[1,2]。在术前、术中及术后能否快速准确地判断心肌缺血的范围及其损伤的程度对于手术方案

收稿日期: 2011-07-15; 收到修改稿日期: 2011-08-31; 网络出版日期: 2011-11-28

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(200803940001)和新世纪优秀人才计划(NCET-04-0615)资助课题。

作者简介: 喻碧莺(1980—),女,讲师,主要从事激光医学及组织光学等方面的研究。E-mail: byyu@fjnu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: hli@fjnu.edu.cn

的制定、手术的施行、术后处理方案的拟定和治疗效果的评估等有着重要的意义。

双光子荧光显微成像技术具有成像分辨率高、穿透深度深和光损伤小等优点,在生物医学组织学成像上都有广泛应用^[3~6]。本课题组已经使用该技术对大鼠早期急性心肌缺血组织进行实时、无损的三维双光子荧光显微成像,并获得细胞层次上的组织形态学分布及成分信息^[7],从而实现对心肌缺血范围的准确判断。但在心肌损伤程度的判断上尚存不足。为了能够准确地评估心肌损伤的程度,本文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,使用双光子激光扫描显微成像系统,获得不同结扎时间下心肌缺血组织的双光子显微图像。通过对双光子荧光图像进行快速傅里叶变换(FFT)^[8~11],并结合苏木素-伊红(HE)染色切片,尝试对心肌缺血的程度进行初步的量化评估。

2 材料与方法

2.1 实验仪器

实验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,其中 AOM 为声光调制器,MDBS 为主二色分光镜(HFT KP650, Zeiss),IR 为近红外滤光片(KP685, Zeiss),PMT 为光电倍增管。飞秒脉冲激光经 AOM 后通过 MDBS 进入双光子荧光显微镜的扫描系统(由 xy 扫描器及步进电机组成),然后由 63×油镜(Plan-Apochromat, 数值孔 $NA=1.4$, Zeiss)聚焦到样品上,反射回的双光子激发荧光经 63×油镜,并经过滤光片进入 PMT,从而获得心肌缺血组织的双光子显微荧光图像。

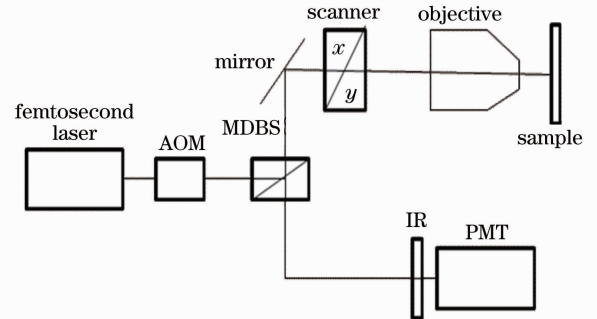


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

2.2 材料准备

连续观察 3 天的心电图正常健康清洁级别 Wistar 大鼠(雄性,体重 300~350 g),术前 12 h 禁食,自由饮水。经麻醉(腹腔注射质量分数为 10%的水合氯醛,4 mL/kg)后,颈胸部剪毛备皮,常规消毒铺巾,连接心电图机。正中开胸,切开皮肤,分离肌肉,剪开胸骨后用开睑器撑开胸骨,仔细止血。分离心包,充分暴露心脏。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。待心电图稳定后,结扎冠状动脉左前降支。以结扎后心脏表面相应区域颜色苍白、心电图标准 II 导联 ST 段持续抬高(波动大于等于 0.1 mV)作为结扎成功的标志。在结扎过程中连接动物人工呼吸机进行人工呼吸[呼吸频率每分钟 70~80 次,呼吸比 1:1.5,呼气末正压(PEEP)为 0,潮气量 8~10 mL/300 g,吸氧浓度(FiO_2 , 体积分数)21%]。结扎时间分别为 0, 60 和 120 min。在各时间点剪下大鼠左心室前壁缺血心肌,一部分浸入质量分数为 10%的甲醛液中固定,用于制作 HE 染色切片;另一部分夹于载玻片与盖玻片之间,并马上用于双光子荧光显微成像。为了避免在实验过程中样品脱水和收缩,在样品表面滴少许磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)。

3 结果与讨论

心肌组织的成分比较单一,其双光子荧光显微成像的信号绝大部分来自心肌细胞中包含的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)及黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)^[12]。为了获得强的荧光信号,此处通过比较不同波长激发下的心肌组织的双光子荧光图像,选用波长为 750 nm 的光作为激发光源。图 2(a)~(i)为心肌组织在结扎时间分别为 0, 60, 120 min 下的双光子荧光图、FFT 频谱图和 HE 染色切片图。从双光子荧光图中可获得不同结扎时间下的心肌缺血组织形态结构的变化情况,从而区分正常心肌及缺血心肌。通过对双光子荧光图像做 FFT 变换,可得到其频谱图。由于条形光栅的傅里叶频谱是与其方向垂直的一系列频谱点,任何一幅图像都可看成是不同方向光栅的组合。因此,若图像只包含某些方向的光栅,则其频谱为椭圆形,若包含所有方向的光栅,则其频谱为圆形。换言之,当图中包含的信息,方向性越强,即方向越单一时,其频谱图就

越接近于直线,方向性越差,就越接近于圆。一般情况下,图像的频谱图都表现为椭圆。此处使用方向指数(OD)来表征心肌组织排列的规则程度,即 $IO = 1 - (S/L)^{[9,11]}$,其中 S 为椭圆的短轴长, L 为椭圆的长轴长。 IO 越大,则表明组织的排列越规则,反之,则表明组织的排列越混乱;其数值介于 1 和 0 之间。另外,通过相同时刻心肌组织的 HE 染色切片图为心肌组织的双光子荧光图像提供佐证。

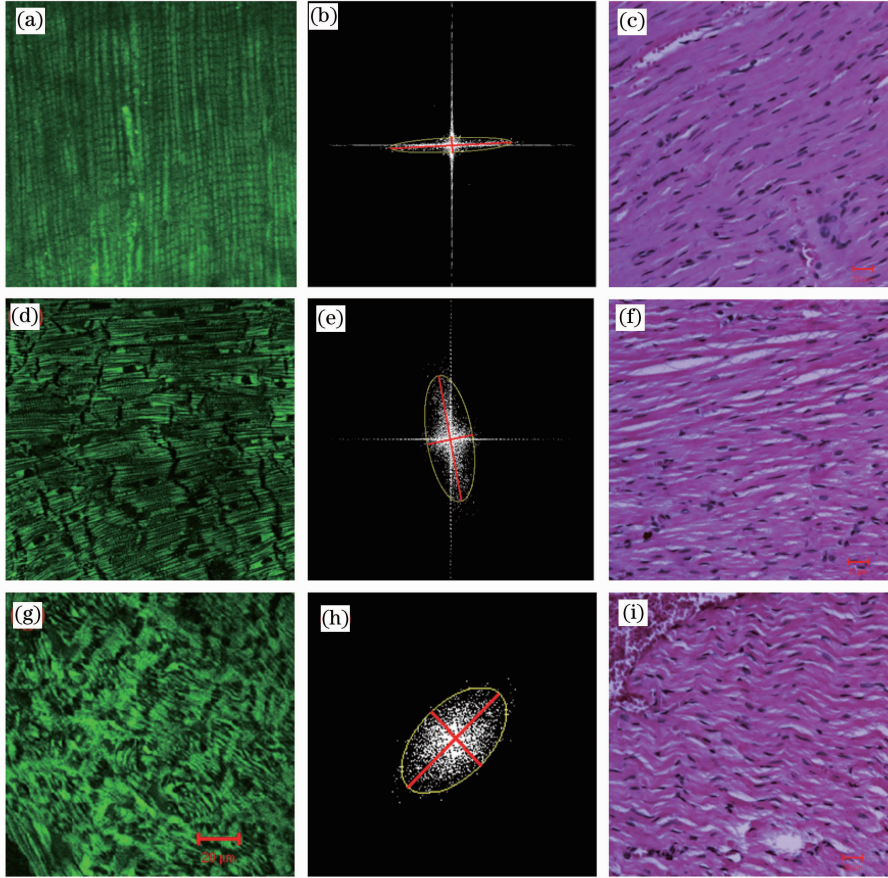


图 2 大鼠心肌组织在冠状动脉左前降支结扎时间分别为 0, 60 和 120 min 下的双光子荧光图、FFT 频谱图和 HE 染色切片图。(a)~(c) 结扎时间为 0; (d)~(f) 结扎时间为 60 min; (g)~(i) 结扎时间为 120 min

Fig. 2 Two-photon fluorescence imaging, FFT frequency spectrogram and HE stained section at (a)~(c) 0; (d)~(f) 60 min; (g)~(i) 120 min with ligation of the left anterior descending branch in myocardial tissue of rat

图 2(a)~(c) 为结扎时间为 0 的图片。从中可知,对于正常的心肌组织,其双光子荧光图像中可清晰地观察到排列整齐紧密的心肌细胞,组织形态结构和 HE 染色切片符合得很好。从相应的双光子荧光图像的 FFT 频谱中可知,该心肌组织的 IO 的数值为 0.88,其组织排列规则,方向性很好。图 2(d)~(f) 为结扎时间为 60 min 的图片。从双光子荧光图中可知,在心肌缺血造模 60 min 后,缺血心肌组织的排列虽然仍具有方向性,但是出现了断裂,且比较疏松。反映在 FFT 频谱图上,就可看到椭圆的短轴方向出现了较大的拓展, IO 的数值为 0.65。图 2(g)~(i) 为结扎时间为 120 min 的图片。无论是从双光子荧光图像还是 HE 染色切片上都可见到,心肌组织的排列较之 60 min 时更为混乱,且心肌组织出现了扭曲变形。此时 IO 的数值为 0.44。综上,随着心肌缺血时间的延长, IO 的数值逐渐减小,心肌组织的排列规则程度随之降低。因此, IO 数值的逐渐减小也意味着心肌缺血的程度越发严重。

4 结 论

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。使用双光子荧光显微成像技术获得结扎时间为 0, 60 和 120 min 时大鼠左心室前壁心肌组织的双光子荧光图像。从中可清晰地观察到心肌组织的形态学分布,能够区分正常心肌和缺血心肌。心肌缺血越严重,其心肌组织的排列就越混乱,相应的方向

指数 IO 的数值就越小,因此,双光子荧光显微成像技术结合 FFT 分析技术可用于评估心肌缺血的程度,在心肌缺血性疾病的诊断和治疗中,能实时、快速、准确地判断心肌缺血的范围及评估其损伤的程度。

参 考 文 献

- 1 R. G. Favaloro. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique [J]. *Ann. Thorac. Surg.*, 1968, **5**(4): 334~339
- 2 Hiroshi Ito. Optimal treatment for coronary artery disease in patients with diabetes: percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass graft, and medications[J]. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2011, **59**(1): 6~13
- 3 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 4 Shuangmu Zhuo, Jianxin Chen, Biying Yu *et al.*. Nonlinear optical microscopy of the bronchus[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(5): 054024
- 5 Li Zuanfang, Huang Zufang, Chen Rong *et al.*. Two-photon fluorescence imaging of thyroid tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(3): 765~768
李钻芳,黄祖芳,陈荣等. 甲状腺组织的双光子荧光成像[J]. *中国激光*, 2009, **36**(3): 765~768
- 6 Wang Li, Qiu Jianrong. Applications of femtosecond laser in biology[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, **47**(1): 011701
王丽,邱建荣. 飞秒激光在生物学领域的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2010, **47**(1): 011701
- 7 Cai Xiamei, Yu Biying, Wu Shulian *et al.*. Evaluation of myocardial ischemia by two-photon excited fluorescence in vivo[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, **47**(6): 061701
蔡吓妹,喻碧莹,吴淑莲等. 大鼠早期急性心肌缺血中的荧光成像和光谱分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2010, **47**(6): 061701
- 8 J. W. Cooley, J. W. Tukey. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series[J]. *Mathematics of Computation*, 1965, **19**(90): 297~301
- 9 Kecheng Lu, Jianxin Chen, Shuangmu Zhuo *et al.*. Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma[J]. *Skin Research and Technology*, 2009, **15**(4): 489~495
- 10 R. A. Rao, M. R. Methhta, K. C. Toussaint. Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues [J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(17): 14534~14542
- 11 Shulian Wu, Hui Li, Hongqin Yang *et al.*. Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2010, **16**(4): 040502
- 12 Shaohui Huang, Ahmed A. Heikal, Watt W. Webb. Two-photon florescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein[J]. *Biophysical J.*, 2002, **82**(5): 2811~2825