

# 一种数字化高灵敏度荧光显微镜及其在竹红菌甲素研究中的应用\*

陈天明\*\* 王苏生 俞 信

(北京理工大学工程光学系, 北京 100081)

曹恩华 许娜飞 李景福

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘 要** 研制了一种可探测细胞微弱荧光图像的数字化高灵敏度荧光显微镜, 采用视频数字化增强型 CCD 系统作为高灵敏度的接收系统, 像增强器亮度增益为 41,000, 因而这种荧光显微镜可探测到普通荧光显微镜不能观察的微弱荧光图像, 并可减少荧光物质的浓度和激发光的强度, 减少对细胞自然生理环境的影响。数字化高灵敏度荧光显微镜在给出细胞微弱荧光图像的同时, 并可给出图像上每一像元的发光强度和细胞平均发光强度。使用此仪器已首次直接得到了: 1) 光敏竹红菌甲素(HA)在 HeLa 细胞(人体宫颈癌细胞)中的分布, 证实 HA 主要分布在 HeLa 的细胞膜中; 2) HeLa 细胞在有 HA 存在时受强光照后的光损伤现象; 3) 加入三种细胞抗氧化剂维生素 E、丁酰基甲苯(SF)和阿魏酸钠(BHT)后获得不同程度保护的细胞状态; 4) 一定浓度的 HA 在 HeLa 细胞随时间的摄取曲线; 5. 不同 HA 浓度一定时间内在 HeLa 细胞中被吸收量的曲线。

**关键词** 荧光显微镜, 像增强器, 光敏损伤, 细胞抗氧化剂。

## 1 引 言

生物荧光显微镜是研究生物荧光分析技术的重要工具, 为了使仪器具有探测更弱的生物发光现象能力, 要求生物荧光显微镜的探测部分具有更高的灵敏度。实时像增强型 CCD 是当前国际上广为采用的弱光图像探测系统。本世纪 70 年代末 Reynolds 等首次报道了利用像增强器耦合到光导摄像管摄像机作为生物荧光显微镜弱光成像探测器, 研究了生物发光组织及钙离子流动<sup>[1]</sup>。其它研究者利用类似系统进行了酶分析、荧光酶素报告基因研究等工作。

本文研制了一种利用像增强器耦合 CCD 系统作为光电探测部分的数字化高灵敏度生物荧光显微镜。像增强器阴极面可探测的最低照度(等效背景照度)为  $0.78 \times 10^{-6} \text{lx}$ , 比普通生物荧光显微镜高 4 个数量级, 因此荧光显微镜可采用较弱的光源作激发光, 避免了观察细胞过程中强光照的光损伤, 并降低了对荧光物质荧光效率的要求。数字化高灵敏度荧光显微

\* 国家自然科学基金资助项目。

\*\* 现在中国科学院上海技术物理研究所, 上海 200083。

收稿日期: 1995 年 2 月 24 日; 收到修改稿日期: 1995 年 5 月 2 日

镜采用 CCD 探测、图像采集电路和图像采集软件,因而在得到图像的同时,可以定量得到图像上每一像元的发光强度和图像的统计参数,满足了生物学定量分析的要求。

## 2 数字化高灵敏度荧光显微镜的结构

为提高荧光显微镜的灵敏度和满足数字化的要求,作者在普通国产倒置生物显微镜上,

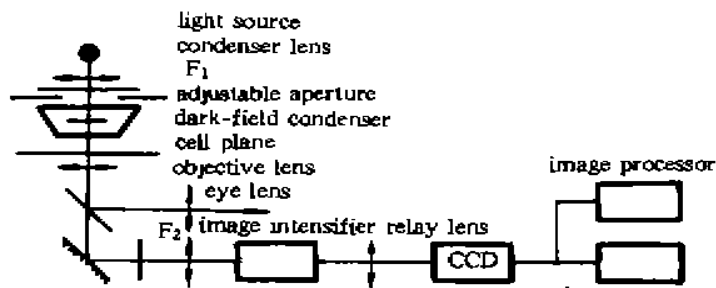


Fig. 1 Schematic diagram of ultra-sensitive fluorescence microscope

用高灵敏度弱光成像探测器件作为图像接收器,把它改进成新型数字化高灵敏度荧光显微镜,具体的方案如下:

以 75 W 超高压汞灯作光源,并用透过率为 1% 的中性衰减片以减少激发光强度,因而激发光强度只有普通荧光显微镜的 1/300 左右。集光镜使点光源出射光成为准直平行光,可调光阑可改变光束直径改变输出光能,以

得到最好的图像效果。 $F_1$  激发滤色镜为一带通滤波器,可透过汞灯中 410 nm 和 430 nm 波长的谱线,滤去不必要的长波部分,以减少图像中背景噪声。更换激发滤色镜可得到不同波长的激发光,适应多种荧光物质不同的吸收峰值。暗视场聚光镜将平行光的环形边缘部分会聚在观察的细胞上,挡掉平行光的中心部分,使图像叠加在暗的背景上,便于突出细胞的荧光图像。物镜收集细胞发出的荧光,并将图像放大。 $F_2$  高通吸收滤色镜透过波长 580 nm 以上的荧光图像,吸收杂散激发光和细胞产生的散射光,进一步降低背景噪声。光路中分束镜反射一路光输入目镜,供目视监测。另一路进入弱光探测器件-像增强器,它可将极弱的图像放大成 CCD 可接收的图像,由透镜耦合到 CCD 面上,再由图像采集板输入到计算机内,计算机可将图像存入磁盘供后续处理,也可显示在监视器上直接观察。

普通荧光显微镜一般仅能用于定性观察细胞内部荧光物质的空间分布和强度分布,不能定量地给出图像发光的强度数值,无法进行细胞荧光的定量研究。生物学和医学研究迫切需要一种能定量给出图像参数的荧光显微镜。为此在研制的探测系统中应用了透镜耦合 CCD 视频接收和数字图像处理技术,由 CCD 获得像增强器的荧光屏图像,A-D 采集电路将模拟信号量化为 8 位数字信号,因而在输出图像的同时,得到图像上每一像元的发光强度和图像平均发光强度,以满足定量分析的要求。

为提高输出图像的质量,实验中对图像采取了多种图像处理技术,包括多幅平均、平滑、滤波、边缘增强、伪彩色编码和彩色三维显示等技术,这样图像的观察效果有较大的提高。

## 3 数字化高灵敏度荧光显微镜定量化研究

为了使仪器能定量给出细胞图像上像元的发光强度,需要得到 CCD 图像采集数据和细胞平面上发光强度之间的转换系数。像增强器的阴极输入面的入射光强在  $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ lx}$  范围内,荧光屏面的输出光强在  $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{ lx}$  的范围内,因而选择 KZD-I 型宽量程光度计作光强探测器。光度计经中国计量科学院校检,测量误差小于 5%,光强探测范围在  $10^{-6} \sim 10^2 \text{ lx}$  内。

### 3.1 CCD 像面均匀性测试

高灵敏度荧光显微镜采用台湾敏通公司的 MTV-1801CB CCD 摄像机, 为修正 CCD 的成像面不均匀性, 需要得到 CCD 像面不均匀性数据。经测试 CCD 像面的不均匀性在 6% 的范围内, 对成像的影响很小, 如图 2 所示。

### 3.2 像增强器放大率的的像面均匀性

系统中的像增强器为 3XZ25/25F, 像增强器输出面的中心明显比边缘亮, 当耦合透镜将像增强器的输出像投射到 CCD 输入面时, 由于孔径限制引起像面渐晕。为消除像增强器的像面不均匀性和耦合透镜引起的渐晕, 经模拟实验看出像增强器的像面不均匀性在 25% 的范围内, 如图 3 所示。像面在中心的增益大于边缘增益, 因而图像数据采入计算机后, 可根据像面均匀性数据对图像进行修正, 经计算机软件修正后, 可基本消除像面不均匀性对图像数据的影响。

### 3.3 像增强器增益线性度

像增强器将微弱光图像放大成 CCD 可探测的图像时, 增益会随输入光强的变化而有小幅度的波动, 为得到像增强器的增益和输入光强的线性关系, 改变输入到像增强器阴极面的光强度, 同时记录像增强器的输入面和输出面的光照度, 线性度曲线如图 4 所示。在成像的光强范围内, 像增强器增益系数在 39,000~42,000 范围内。

### 3.4 CCD 成像系统的线性度测试

为将 CCD 采样得到的数据还原成像面每一像素的发光强度, 需要求得 CCD 的输入光强和 CCD 数据的线性关系, 用均匀光照明像增强器的阴极面, 改变输入光强的大小, 记录像增强器输出光的照度和 CCD 的采集数据。由于 CCD 以及后处理电路存在本底暗噪声, 降低工作温度可减小本底的影响。图 5 的数据分析显示 CCD 成像系统偏离线性度的范围在 15% 内, 软件根据测量点拟合线性度曲线, 得到不同的输出光强对应不同的转换系数, 从而可消除线性度误差对系统的影响。

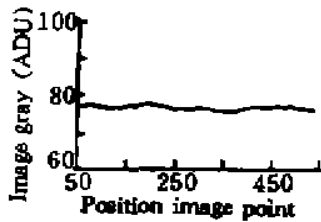


Fig 2. Plane uniformity of CCD and A-D circuit

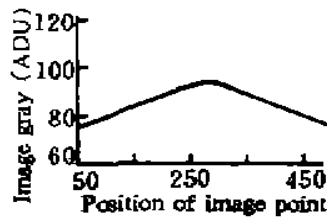


Fig 3. Plane uniformity of image intensifier

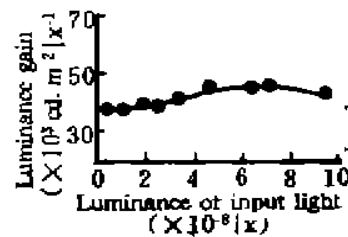


Fig 4. Linearity of amplify of image intensifier

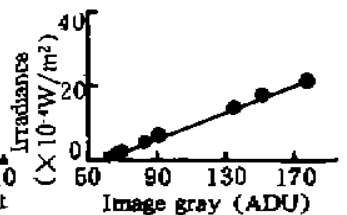


Fig 5. Linearity of image intensifier output and CCD data

定量测试的荧光显微系统在得到 CCD 数据后, 经图 2 和图 3 的曲线修正, 并由图 4 和图 5 的曲线换算成细胞平面上的辐射照度, 得到细胞荧光图像的定量数据, 经计算得到 ADU (图像数据单位) 和物平面辐射出射度的关系为  $1.13 \times 10^{-3} \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{ADU}^{-1}$ 。

## 4 HA 在 HeLa 细胞中分布和光敏损伤实验

竹红菌甲素(HA)是我国科学家发现的一种新型光敏剂及光疗药物, 临床上用于治疗阴道白斑和疤痕等疾病, 对动物肿瘤有明显的杀伤抑制作用。HA 在可见光的照射下发生自敏光氧化, 并在光敏氧化过程中产生单线态氧及多种活性氧自由基, 活性氧自由基具有高的反应活性, 引起脂质过氧化, 导致细胞膜的损伤<sup>[3~7]</sup>。维生素 E 是已知的有效抗氧化剂, 具有脂

溶性, 在生物膜中可作为自由基清除剂, 阻断脂质过氧化反应, 达到保护细胞膜的作用。SF (阿魏酸钠) 是中药当归的有效成份, 可能与抑制脂质过氧化有关, 对细胞的光敏化损伤有一定的保护作用, 其效果较维生素 E 差。BHT (丁羟基甲苯) 对细胞光敏损伤也有一定的保护作用, 其作用机理不清。以往对 HA 研究只能用生物化学仪器进行群体细胞的研究, 得到了 HA 主要分布在细胞膜的结论, 对 HA 光敏损伤的研究也只能得到多数细胞的统计结论, 而无法得到单个细胞的直接结果。应用数字化高灵敏度荧光显微镜首次观察了竹红菌甲素在 HeLa 细胞内的分布, 进行了 HeLa (人体子宫癌细胞) 细胞受光照损伤的实验及三种抗氧化剂维生素 E、BHT 和 SF 对 HeLa 细胞光损伤的保护研究, 以及 HA 在 HeLa 细胞中的吸收量与时间和 HA 浓度的曲线关系。

实验条件: HA 浓度为  $15 \mu\text{mol/l}$ , 维生素 E 浓度为  $0.25 \mu\text{mol/l}$ , BHT 浓度为  $5 \mu\text{mol/l}$ , SF 浓度为  $0.43 \mu\text{mol/l}$ , 光照强度  $600 \text{ lx}$ , 光照时间 1 分钟。

实验首先观察了 HeLa 细胞加入 HA 在数字化高灵敏度荧光显微镜下的荧光图像, 可看到 HA 主要分布在细胞膜和胞浆中, 如图 6 所示, 细胞的边缘亮而中间暗。图 7 是 HA 在 HeLa 细胞中分布的三维显示。图 8 为 HeLa 细胞加入 HA, 用  $600 \text{ lx}$  的强光照射 1 分钟后的图像, HA 使细胞膜受到破坏, 因而四周发荧光的部分消失。该图像是提高图像的增益使得中间较暗的部分成像而得到的。图 9, 图 10 和图 11 是 HeLa 细胞加入 HA, 再分别加入细胞保护剂维生素 E、SF 和 BHT, 经  $600 \text{ lx}$  的强光照射 1 分钟后, 细胞受到不同程度保护的图像, 可以看到维生素 E 的保护效果最好, 细胞膜完整, SF 和 BHT 有一定的保护效果, 但细胞膜有残缺, 效果不及维生素 E。上述结果表明 HA 主要分布在细胞膜和胞浆中, 光照后细胞受到明显损伤, 维生素 E 的保护效果最佳。图 12 是单个 HeLa 细胞在浓度为  $75 \mu\text{g/ml}$  溶液中温育不同时间, 用图像荧光发光量表示的 HA 摄取量曲线。图 13 是单个 HeLa 细胞在含不同浓度的 HA 培养液中温育相同的 16 小时, 用图像总的荧光发光量表示的 HA 摄取量和 HA 浓度的曲线。用数字化高灵敏度荧光显微镜得到的实验结论和用生物化学仪器得到的结论是相符的, 上述实验为进一步研究光动力作用机理, 寻找更好的抗氧化剂提供了科学依据。

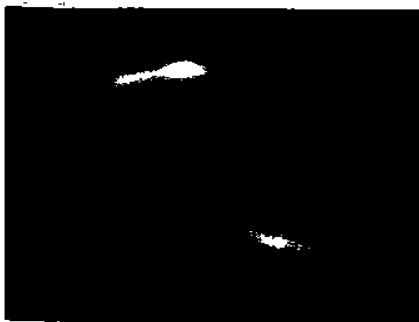


Fig. 6 HeLa cell after added HA



Fig. 7 3-D display of HA distribution in HeLa cell



Fig. 8 HeLa damaged by strong light (without protective reagent)

**结 论** 数字化高灵敏度荧光显微镜具有结构简单, 灵敏度高的特点, 避免了细胞受到强激发光照射引起的光损伤现象, 同时降低了对荧光物质荧光效率的要求。在给出细胞荧光图像的同时, 可以给出细胞图像上任意部分的发光强度值, 作为判断细胞细微的生理变化过程的依据。因而仪器在细胞生理过程的定量研究方面有普通荧光显微镜无法相比的优点。

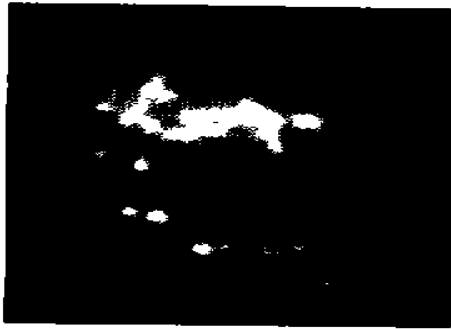


Fig. 9 HeLa cell protected by Vit. E



Fig. 10 HeLa cell protected by SF

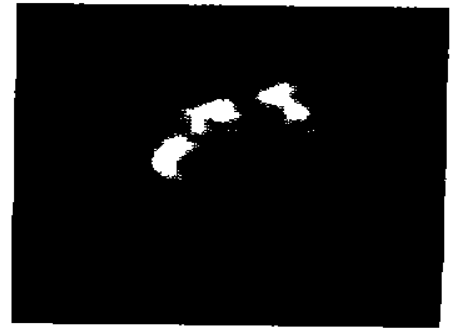


Fig. 11 HeLa cell protected by BHT

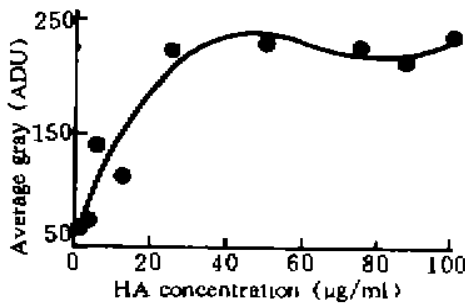


Fig. 12 HA absorbed by HeLa cell in different time

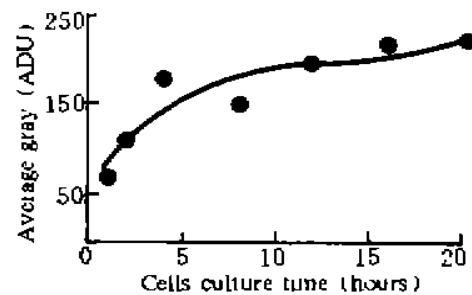


Fig. 13 HA absorbed by HeLa in HA solution of different concentration

### 参 考 文 献

- [1] Reynolds G. T, Application of photosensitive devices to bioluminescence studies, *Photochem & Photobiology*, 1978, 78: 405~421
- [2] 程龙生, 王家珍, 竹红菌甲素对红细胞膜的光损伤. *实验生物学报*, 1985, 18(1): 89~97
- [3] 乐加昌, 秦静芬, 竹红菌乙素对人红细胞膜蛋白荧光猝灭机理的研究. *感光科学与光化学*, 1993, 11(3): 228~235
- [4] 陈建文, 张兰萍, 脂质过氧化对人红细胞膜脂流动性的影响. *生物物理学报*, 1992, 8(3): 502~506
- [5] 程龙生, 刘 萱, 类脂过氧化对竹红菌甲素引起膜蛋白光敏交联的影响. *实验生物学报*, 1987, 20(3): 374~379
- [6] Cheng L, Wang J, Effect of hypocrellin a sensitization on the lateral mobility of cell membrane proteins. *J. Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 1988, 2: 395~398
- [7] Carlos Pascual, Cheyla Romay, Effect of antioxidants on chemiluminescence produced by reactive oxygen species. *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1992, 7: 123~132

## A Digitalized Ultra-Sensitive Fluorescence Microscope and It's Application in Hypocrellin

Chen Tianming      Wang Susheng      Yu Xin

(*Department of Optical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081*)

Cao Enhua      Xu Nafei      Li Jingfu

(*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

(Received 24 February 1995; revised 2 May 1995)

**Abstract** A digitalized ultra-sensitive fluorescence microscope has been developed, in which an intensifier CCD is used as high sensitive image detector with luminance gain of 41,000. It can detect ultra-weak fluorescence image and decrease the concentration of fluorescence label and emitting light intensity in order to keep natural situation of the detected cell. This digitalized microscope can be used not only to obtain the fluorescence image, but also get the light luminance at every point of the image and the average light luminance of the whole image quantitatively. With this instrument, we have obtained: 1. The image of hypocrellin-A distribution in HeLa cell, it shows that HA is mainly absorbed by cell membrane; 2. The image of HeLa cell be oxidated by strong light after adding HA; 3. Images of HeLa cell being protected by three antioxidant reagent Vit. E, sodium ferulate (SF) and butylated hydroxytoluene (BHT), from which it has been shown that anti-oxidated effect of Vit E is the best; 4. The curve of absorbed quantity of HA in a HeLa cell with time versus culture time; 5. The curve of absorbed quantity of HA in Hela cell versus concentration of HA solution.

**Key words** fluorescence microscope, image intensifier, photo-sensitized effect, antioxidant reagent.