

超高灵敏度荧光显微镜及其 在生物学中的应用*

李 勤

(清华大学现代应用物理系, 北京 100084)

俞 信 胡新奇 马 瑜

张同存 曹恩华

(北京理工大学光电工程系, 北京 100081) (中国科学院生物物理所, 北京 100101)

摘 要 介绍了在原有数字化高灵敏度荧光显微镜的基础上研制的超高灵敏度荧光显微镜, 对荧光实现 10^6 数量级的增益, 可获得细胞的光子灵敏显微图像, 并结合图像融合技术, 实现极微弱荧光图像的定位显示。采用具有视频速率的图像采集系统, 可用于研究某区域荧光强度随时间变化的动力学过程。将该显微镜应用在生物医学领域的细胞凋亡的研究, 观察到 As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞凋亡中 Ca^{2+} 浓度升高, 预示着 Ca^{2+} 可能是由 As_2O_3 启动, 促发 MGC-803 细胞凋亡的又一重要机制。

关键词 超高灵敏度荧光显微镜, 光子灵敏显微图像, 图像融合, 细胞凋亡。

1 引 言

荧光显微镜作为生物学和医学研究的重要工具近年来已有很大进展, 与光电技术的结合使之获得了新的活力, 推动了生物、医学的发展。当前国际上细胞水平的光子灵敏显微成像已经成为细胞学研究的重要手段, 但我国在这方面的的工作由于仪器灵敏度不够, 对极微弱荧光的探测和研究受到很大限制。

本文介绍的超高灵敏度荧光显微镜是利用第二代像增强器——微通道板像增强器, 代替数字化高灵敏度荧光显微镜(II型)系统中的第一代像增强器, 使荧光得到 10^6 数量级的增益, 可获得细胞的光子灵敏显微图像, 并结合图像融合技术, 实现极微弱荧光图像的定位显示。同时, 采用具有视频速率的图像采集系统, 可用于研究某区域荧光强度随时间变化的动力学过程, 成为超高灵敏度荧光显微镜系统。将该显微镜应用于细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 浓度变化的研究, 体现了超高灵敏度荧光显微镜的实用性。

2 超高灵敏度荧光显微镜结构

超高灵敏度荧光显微镜是在数字化高灵敏度荧光显微镜(II型)^[1]的基础上研制完成的。

* 国家科委863高科技项目和国家自然科学基金资助项目(69848001)。

收稿日期: 1998-11-05; 收到修改稿日期: 1999-01-04

其原理框图如图1所示。

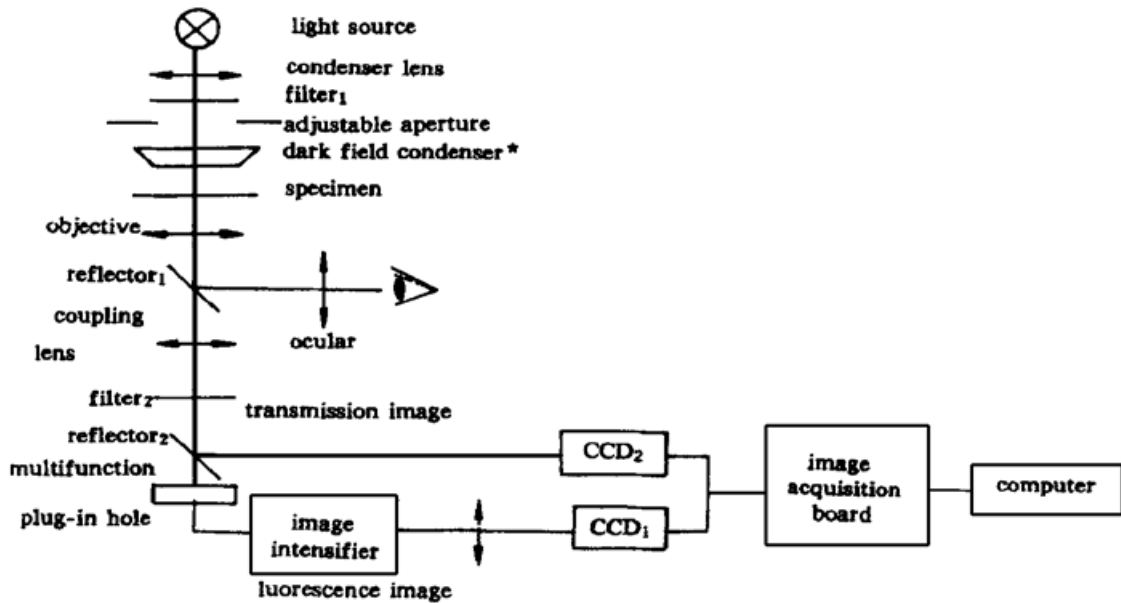


Fig. 1 Block diagram of ultra-high-sensitivity fluorescence microscope

利用日本滨松公司的 C2166-01 型微通道板像增强器替代原系统中的第一代像增强器, 其基本参数如表 1 所示。以微通道板像增强器为核心, 与 CCD 耦合构成超高灵敏度荧光显微镜的图像采集部分, 使该系统不仅具有极高的光放大能力, 还具有较好的空间和时间分辨力, 同时可实现光子计数成像, 完全满足研究极微弱荧光的条件。

Table 1. The primary parameters of Model C2166-01 microchannel plate intensifier (MCP)

sensitive spectral range	280~ 850 nm
phosphor screen decay time	0.1 ms max
limiting resolutions:	
multiphoton mode	18 lp/mm typ. at center
single photon mode	15 lp/mm typ. at center
maximum input light:	
multiphoton mode	10^{-2} lx at photocathode
single photon mode	10^4 photon/s \cdot mm ² at 550 nm
maximum MCP gain	10^6 typ
dark count at 20 $^{\circ}$ C	10 cp/mm ² max
at - 15 $^{\circ}$ C	0.5 cp/mm ²

由于该系统不仅可获得样品极微弱荧光图像, 而且可同时得到相应的透射图像, 采用图像融合技术^[2], 将荧光图像与其透射图像融合为一幅图像, 通过融合图像即可准确判断细胞中荧光的发光位置, 有助于进一步分析发光机理。有关图像融合的研究工作, 可参见文献[3, 4]。图像采集系统采用具有视频速率(25帧/秒)的图像采集板(科技嘉公司 MPE-1000), 并配以完善的图像采集和处理软件, 使该系统可用于观察样品的动态过程。

3 实验应用

通过将超高灵敏度荧光显微镜应用在生物医学中的细胞凋亡的研究, 充分证实了该显微镜的应用潜力。本文通过对凋亡细胞中 Ca^{2+} 变化的观察结果简要说明了超高灵敏度荧光显微镜对极微弱荧光的探测, 及通过图像融合处理后所获得的效果。

细胞凋亡是一种普遍的生物学现象^[5, 6], 近年来的研究发现它在正常生理调节和恶性病变过程中起着关键作用, 细胞凋亡是当前肿瘤研究的新热点。研究细胞凋亡的工作主要从它的形态学特征和生化机制两个方面进行, 但目前认为形态学观察仍是确定细胞凋亡最可靠的方法, 利用凋亡细胞特异性生化改变的特性, 使用不同的荧光探针, 直观地反映并从形态学上确定细胞凋亡, 是研究细胞凋亡及其生化机制的重要手段。

Ca^{2+} 在动、植物体内起着重要的作用, 具有多种细胞效应。细胞内的钙无论是结合态还是游离态都对维持细胞的生理过程有重要影响, 钙在各细胞器之间、细胞与细胞之间、细胞与组织液之间的转移和交换, 形成钙信号, 通过多种传递途径, 直接或间接地调控细胞的反应。了解 Ca^{2+} 是否参与细胞凋亡的过程, 研究凋亡作用机制及 Ca^{2+} 在细胞凋亡过程中的作用都具有重要意义。

实验采用 As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞(一种胃癌细胞) 凋亡, 未经 As_2O_3 处理的样品为对照组, 经 As_2O_3 处理后的样品为处理组。 Ca^{2+} 的荧光标记物为 Indo-1, 激发峰为 338 nm, 在无 Ca^{2+} 介质中的发射峰位于 485 nm, Ca^{2+} 饱和时发射峰移至 405 nm。生化实验证实 Indo-1 仅与细胞内的游离 Ca^{2+} 结合, 图 2 为 Indo-1 随游离 Ca^{2+} 浓度变化时荧光强度的变化曲线^[7]。当 Ca^{2+} 为 0 时, Indo-1 的峰值荧光波长是 485 nm; 随着溶液中 Ca^{2+} 浓度的增加, 荧光峰值蓝移, 405 nm 荧光逐渐增强, 485 nm 荧光逐渐减弱; 当 Ca^{2+} 增加到 $39.8 \mu\text{M}$, Indo-1 的峰值荧光波长移至 405 nm。通过 Indo-1 的 405 nm 荧光与 485 nm 荧光的比值可以确定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化。实验前将钙指示剂 Indo-1 分别加入处理组和对照组, 终浓度均为 $5 \mu\text{M}$ 。由于 Indo-1 特异性地与细胞内游离 Ca^{2+} 结合, 本文以下论述中提到的 Ca^{2+} 特指游离 Ca^{2+} 。

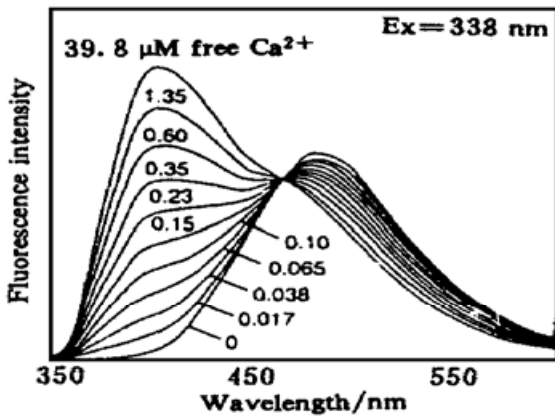


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of Indo-1 in solutions containing zero to $39.8 \mu\text{M}$ free Ca^{2+}

由于 Indo-1 产生的荧光很弱, 两组实验中超高灵敏度荧光显微镜像增强器的增益均选择最大, 约为 5.0×10^6 , 所获得的图像信号仍然很弱。图 3(a) 为对照组细胞的透射图像, 样品中游离的 Indo-1 分子受到激发产生 485 nm 的荧光, 如图 3(b) 所示, 可以看到单个的光点散布在图像中, 没有明显的轮廓。图 3(c) 为 Indo-1 与细胞内部的 Ca^{2+} 结合后发射 405 nm 荧光的图像。因正常状态下(未凋亡细胞) 细胞内 Ca^{2+} 的浓度一般只有 $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$, 与 Indo-1 结合后产生的荧光强度很弱, 所获得的图像是由彼此分离的光子组成的光子图像, 只有经过多幅累加才会有通常意义的图像。对比图 3(b) 和 3(c) 发现, 405 nm 的荧光强度明显比 485 nm 的荧光强度弱。图 4(a) 为处理组凋亡细胞的透射图像, 图 4(b) 为游离的 Indo-1 发射的荧光。当 Indo-1 与凋亡细胞中的 Ca^{2+} 结合后发射出较强的 405 nm 荧光, 仅单幅图像就已经可以看出荧光的分布趋势, 如图 4(c) 所示, 经 30 幅叠加后视觉效果更加明显, 如图 4(d) 所示。

通过对比处理组与对照组中 Indo-1 荧光强度的变化, 并以 Indo-1 发射波长 405 nm 荧光与 485 nm 荧光的比值, 来确定细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度(参照图 2), 发现凋亡细胞中 Indo-1 的荧光比值比对照组明显增强(定性), 说明在 As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 的浓度增

通过对比处理组与对照组中 Indo-1 荧光强度的变化, 并以 Indo-1 发射波长 405 nm 荧光与 485 nm 荧光的比值, 来确定细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度(参照图 2), 发现凋亡细胞中 Indo-1 的荧光比值比对照组明显增强(定性), 说明在 As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 的浓度增

通过对比处理组与对照组中 Indo-1 荧光强度的变化, 并以 Indo-1 发射波长 405 nm 荧光与 485 nm 荧光的比值, 来确定细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度(参照图 2), 发现凋亡细胞中 Indo-1 的荧光比值比对照组明显增强(定性), 说明在 As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 的浓度增

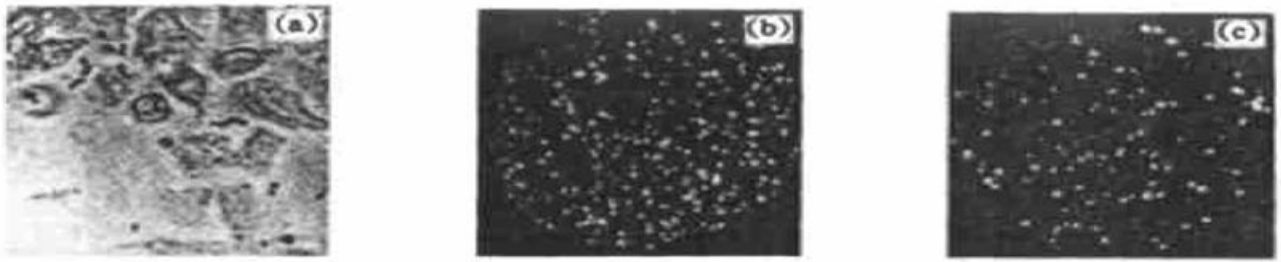


Fig. 3 The distribution of Indo-1 in the MGC-803 cell (check group), objective magnification: $\times 10$, intensifier gain: 5.0×10^6 . (a) Transmission image; (b) Fluorescence image of free Indo-1, 485 nm, 1 frame; (c) Fluorescence image of Indo-1 saturated with Ca^{2+} , 405 nm, 1 frame

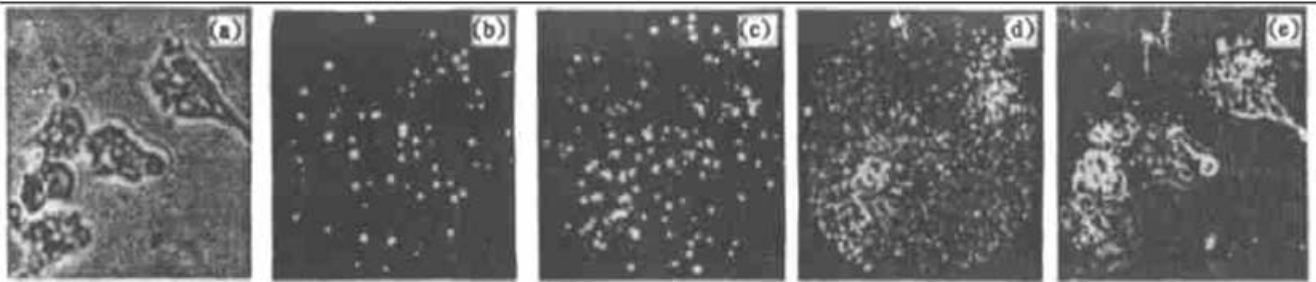


Fig. 4 The distribution of Indo-1 in the MGC-803 cell (treated group), objective magnification: $\times 10$, intensifier gain: 5.0×10^6 . (a) Transmission image; (b) Fluorescence image of free Indo-1, 485 nm, 1 frame; (c) Fluorescence image of Indo-1 saturated with Ca^{2+} , 405 nm, 1 frame; (d) 30 frames of Fig. 4(c); (e) Fusion image of Fig. 4(a) and Fig. 4(d)

加, 胞浆内 Ca^{2+} 增加与细胞凋亡有关。这些结果与激光共聚焦荧光显微镜和流式细胞仪测定的结果一致。Kaiser 和 Edelman 最早观察到糖皮质激素诱导的淋巴细胞凋亡伴有 Ca^{2+} 内流增加^[8], 并由此提出胞内 Ca^{2+} 增加可促进凋亡, 这种观点再次被本实验直接证实。目前研究认为, 凋亡细胞内 Ca^{2+} 增加既可能是通过胞外介质中 Ca^{2+} 跨膜内流增加, 也可能是胞内 Ca^{2+} 库释放增加所致, 或者两者兼而有之。此项研究正在进行之中。

Ca^{2+} 在调节凋亡过程中的作用, 即与凋亡有关的信号传递之间的相互作用, 是众多实验室研究的重点, 现在认为胞浆 Ca^{2+} 浓度持续升高本身可作为一种凋亡信号, 或者还可通过激活蛋白水解酶、蛋白激酶及谷氨酰胺转移酶、钙酶依赖式核酸内切酶等促进凋亡^[9]。另一方面, 胞内 Ca^{2+} 库的排空也可诱发凋亡, 通过细胞内结构破坏, 使凋亡机制中的关键酶与底物接近, 促进细胞凋亡。还有报道认为, 钙与调节凋亡基因的相互作用, 如 bcl-2, 可能也是 Ca^{2+} 促进凋亡的机制之一。尽管有关 Ca^{2+} 在细胞凋亡中的作用机制至今仍未定论, 但是, 本实验的结果表明, As_2O_3 诱导 MGC-803 细胞凋亡使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 预示着 Ca^{2+} 可能是由 As_2O_3 启动、促发 MGC-803 细胞凋亡的又一重要机制。

为了更加准确地显示荧光在细胞内部的分布, 利用图像融合技术将荧光图像与对应的透射图像融合, 可以更加清楚地突出其发光位置。图 4(e) 为图 4(a) 与图 4(d) 的融合图像, 从图中荧光的分布可以清楚地显示其在细胞内部的位置。通过不同的图像融合算法, 可以获得不同显示效果的融合图像, 经伪彩色显示效果会更加明显。

结 论 通过实验充分体现了将图像融合技术与高灵敏度探测技术相结合在生物医学研究中的实用价值, 具有图像融合处理功能的超高灵敏度荧光显微镜系统可探测到极微弱的荧光图

像, 减小荧光标记物对细胞生理状态的影响, 提高了实验结果的可靠性, 它们将成为研究细胞凋亡、荧光免疫等重要课题的有力工具, 促进我国细胞水平微弱光信息的研究和发展。

参 考 文 献

- [1] 李 勤, 代彩虹, 俞 信等. 新型数字化高灵敏度荧光显微镜及其在生物学中的应用. 生物物理学报, 1998, **14**(3) ·565~ 572
- [2] Li H, Manjunath B S, Mitra S K. Multisensor image fusion using the wavelet transform. *Graphical Models and Image Processing*, 1995, **57**(3) ·235~ 245
- [3] 李 勤, 代彩虹, 俞 信等. 图像融合方法在细胞图像处理中的应用. 光学学报, 1998, **18**(12) ·1658~ 1662
- [4] Li Qin, Dai Caihong, Yu Xin *et al.*. Study of image fusion methods suitable for biomedical image. *Proc. SPIE*, 1998, **3548** ·158~ 165
- [5] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, **267** ·1456~ 1462
- [6] Wright S C, Larrick J W. 24 Kilodalton cytoplasmic protease activating DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechnology Advances*, 1997, **15**(3, 4) ·747~ 757
- [7] Haugland R P. *Handbook of Fluorescent Probe and Research Chemicals*. USA: Molecular Probe Inc., 1996.
- [8] Kaiser N, Edelman R S. Calcium dependence of glucorticoid induced by lymphocytolysis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1977, **74** ·638~ 642
- [9] Mcconkey D J, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukocyte Biology*, 1996, **59**(6) ·775~ 781

Ultra-High Sensitivity Fluorescence Microscope and Its Application in Biology

Li Qin

(Department of Modern Applied Physics, Tsinghua University, Beijing 100084)

Yu Xin Hu Xinqi Ma Yu

(Opto-Electronic Department, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

Zhang Tongcun Cao Enhua

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

(Received 5 November 1998; revised 4 January 1999)

Abstract Based on the digital high-sensitivity fluorescence microscope, the ultra-high-sensitivity fluorescence microscope is developed. The system can enhance the fluorescence intensity more than 10^6 and get the photon sensitive image of ultra-weak fluorescence. The accurate position of ultra-weak fluorescence can be confirmed by image fusion methods. Because the speed of image acquired system is 25 frame/s, the dynamic characters of fluorescence intensity can be investigated. Using the novel microscope to study the apoptosis of MGC-803 cells induced by As_2O_3 , the density of Ca^{2+} in apoptotic cells obviously increased. Ca^{2+} is probably one of important roles in the process of MGC-803 apoptosis induced by As_2O_3 .

Key words ultra-high-sensitivity fluorescence microscope, photon sensitive image, image fusion, apoptosis.