

# 显微光子计数成像系统及其应用\*

王苏生

(北京理工大学光电工程系, 北京 100081)

**摘 要** 光子计数成像系统可以探测生物超微弱发光, 但是只能探测生物的宏观图像, 若要深入到细胞、分子水平, 必须有显微光子计数成像系统。二者的区别在于显微光子计数成像系统是噪声受限系统。本文报道的显微光子计数成像系统, 采用 $^{63}\text{Cu}$ 同位素光源来监测系统的状态, 保证实现极限探测。该系统可以用来研究痕量生物分子的分布和功能, 显示钙离子在细胞内外的分布, 活性氧、基因表达的监测等。由单光子到单分子、组织学图像到功能图像的转变, 将是重要的发展, 为生物学医学的应用提供了光明的前景。

**关键词** 显微光子计数成像, 同位素 $^{63}\text{Cu}$ , 活性氧。

## 1 引 言

80 年代后期日本发展了微通道板像增强器, 建立了光子计数成像系统, 国际上开始进行生物超微弱发光的二维探测及应用研究<sup>[1]</sup>。我们于 1995 年得到国家自然科学基金资助, 研究生物超微弱发光的二维探测。在自行研制的光子计数成像系统上获得了植物(绿豆芽、树叶)、动物(昆明鼠)及人手的光子图像, 并初步建立了用统计理论来检验和处理小样本光子图像的方法<sup>[2, 3]</sup>。随后华南师范大学和浙江大学也分别得到植物的光子图像。这些研究对生命科学、医学提供了新的方法, 但是这些都是生物体的宏观图像。

若要进入细胞水平、分子水平深入研究一些课题, 例如观测钙离子在细胞内外的分布、其在细胞凋亡中的作用、对活性氧自由基的观测、人脑缺血再灌注的研究等等, 就必须深入到微观领域, 必须借助显微光子计数成像系统才能探测细胞水平的光子图像。因此显微光子计数成像的研究对生命科学、医学具有更重要的意义。本文将讨论我们对显微光子计数成像系统的研究和初步应用。

## 2 显微光子计数成像系统

### 2.1 系统组成

系统原理如图 1 所示。以超高压汞灯组成的光源 1, 通过干涉滤光片 2、中性衰减片 3 调节光源的波长和强度用来激发样品台上的样品 5。样品中被激发的荧光或自身的超微弱发光

\* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1999-02-05

由显微物镜 6 接收, 样品被物镜放大 1040 倍, 经过系统的耦合镜 8 后又有 4 倍放大。在经过截止干涉滤光片 9 时, 激发光被截止, 允许信号光通过。可调双路分光镜 10 使样品的荧光或超微弱发光送到带致冷的微通道板像增强器 11 上, 使发光图像得到  $10^4 10^7$  倍的增强。中继透镜 12 将增强后的图像投射到高帧频 CCD13 上。CCD、图像采集板、微计算机 14 组成图像采集、处理系统, 实现多项处理功能。可调双路分光镜又可使样品在一般生物显微镜下的形态图像经过另一个 CCD15 输入计算机, 以备和发光图像融合处理使用。

在细胞水平上的超微弱发光或荧光都是极微弱的, 以至通过截止干涉滤光片后剩余的激发光也会对光子图像产生极大的影响。因此在激发光路中加入暗场照明器 4, 以便从光路上解决使激发光不能进入显微物镜中。虽然被样品散射的激发光仍然可能进入显微物镜, 但是这些微弱的散射光经过截止滤光片后, 将基本被消除。视场是全黑的, 上面的光子计数点十分清晰。

当计算机得到细胞的发光图像和细胞的形态图像后, 分别进行预处理、统计处理、角度调整, 并经过加权融合使细胞微弱的光子图像叠加在细胞的形态图像上。这样便可以得到细胞形态图像为背景的光子图像, 从而不但得到细胞的微弱发光分布, 而且能找到这些发光来自细胞内的什么部位。

## 2.2 受限噪声

当用显微光子计数成像系统进行细胞水平的发光探测时, 其信号强度要比用光子计数成像系统探测生物超微弱发光更微弱。一般的生物超微弱发光在  $110^4 \text{ photon/cm}^2 \cdot \text{s}$  量级, 而细胞的面积仅微米量级, 其发光极弱, 经显微镜物镜放大 10 到 40 倍, 耦合镜放大 4 倍后, 当发光光子图像投射到像增强器的阴极面上时, 其强度比光子计数成像系统中的生物光子图像弱好几个数量级。细胞本来就极微弱的发光变成更微弱的二维光子分布, 淹没在噪声中。可见显微光子计数成像系统的探测取决于噪声水平。因此系统必须克服背景噪声、暗噪声、热噪声等所有噪声, 使系统成为量子噪声受限系统。这就是显微光子计数成像系统的特点和难点。即使在理想的条件下也只能得到较少光子计数点的小样本光子图像。将这样的光子图像经过统计处理或图像融合后, 可以较好地提取有用的信息。

## 2.3 系统状态监测

为了克服噪声, 需要采用很多措施, 例如必须有严格的光屏蔽以屏蔽外界的背景光; 合理的措施消除剩余的激发光; 避免系统光路中光学元件发出的荧光; 采用高帧频 CCD; 对微通道板像增强器实施制冷, 并要保持冷端的恒温等等。其中良好的制冷是必须的, 在整个实验中要保持零下  $15^\circ\text{C}$  的状态, 使微通道板像增强器保证暗计数达到  $0.5 \text{ photon}/(\text{mm}^2 \cdot \text{s})$ , 以降低所采集的每一帧图像中噪声计数点出现的概率, 使信噪比得到很大提高。但是低温也给系统带来一些不利。首先在这样的低温下, 像增强器光电阴极的量子效率会有所降低, 这将

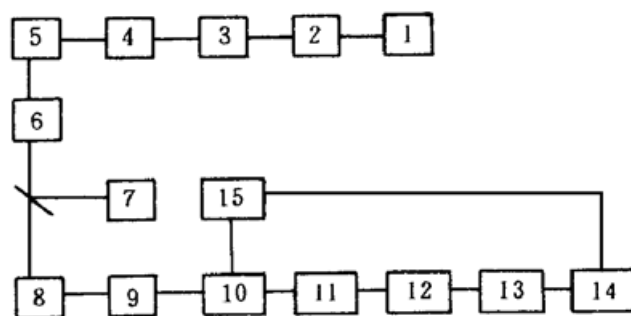


Fig. 1 Schematic diagram of the micro photon counting image system. 1. light source, 2. interference filter, 3. neutral attenuation, 4. dark field condenser, 5. specimen, 6. objective, 7. ocular, 8. coupling lens, 9. cut off filter, 10.  $45^\circ$  reflective mirror, 11. image intensifier, 12. relay lens, 13. CCD<sub>1</sub>, 14. computer, 15. CCD<sub>2</sub>

影响系统灵敏度。其次在低温下通光窗口结雾,影响透过率,亦将影响探测灵敏度。这种在极限状态下的探测,对系统的稳定性要求较高。因此需要监测系统的状态,以确保探测结果的可靠性。

引入稳定性极高的放射性同位素光源 $^{14}\text{C}$ 来监测系统状态。 $^{14}\text{C}$ 同位素放射 $\beta$ 射线使塑料

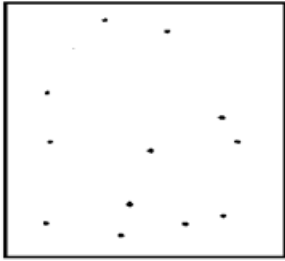


Fig. 2 The photon image of radioisotope  $^{14}\text{C}$

闪烁体发光。其中心波长为 423 nm; 强度极弱, 和生物微弱发光相当; 半衰期为 5730 年, 在时间有限的实验中它是极稳定的。将此光源放在显微镜的样品架上, 显微光子计数成像系统可以探测到它的光子图像, 如图 2 所示。光点位置有随机性, 服从其概率分布。每次探测光子计数点平均为 11 个左右。光源直径 10 mm。此光源均匀性很好, 将其上、中、下、左、右、移动, 分别对准显微镜, 均取得一致结果, 说明其在样品架上的位置不影响它的光子图像。因此该光源可以用来监测系统的状态。在实验之前除了检查噪声之外, 还可以用此光源检查系统, 使系统处于正常状态, 保证实验数据可信。

#### 2.4 双路探测

有了显微光子计数成像系统, 可以得到细胞水平、分子水平上的超微弱发光的二维分布。这些发光极其微弱, 在所探测到的一帧图像上, 通常只有少量零星光子, 通过积累可以增加光子图像的信息量。这些发光通常来自细胞的局部, 例如和探针结合的某些细胞器, 由于使用了暗场照明器并经严格的光屏蔽, 因此得到的是某些细胞器发出的荧光分布而没有通常显微镜下的细胞形态图像。一般不能判断光子是从细胞的哪个部位、哪个细胞器发出的。为此增加了双路探测系统。一路通过像增强器、CCD 探测荧光分布; 另一路按显微镜常规观测方法, 直接由 CCD 得到细胞形态图像。在得到二路图像后通过图像预处理、图像融合<sup>[4]</sup>, 使二维光子分布叠加在细胞形态图像上, 这样便可以对荧光进行精确的定位分析。

### 3 在生物学医学中的应用前景

显微光子计数成像系统可以探测到细胞水平、分子水平的微弱发光分布, 这对在生物学、医学中的应用开辟了光明的前景。例如, 活性氧、自由基在正常氧化代谢过程中会不断形成, 它们参与机体的呼吸摄氧和 ATP 的储能、排除代谢的废物和药物的毒性, 并在肌体的防御中具有重要作用。但是活性氧对机体的各种大分子具有不同程度的损害作用。它们氧化破坏脂质、损害核酸、破坏蛋白质等, 机体对活性氧需要调控和清除。脂质过氧化随年龄老化而逐渐增高, 线粒体膨胀变形, 内膜自由基含量增加, 自由基等活性氧释放的光子, 可以从器官、组织、血清的化学发光表现出来, 也可从体表超微弱发光检测。活性氧的发光可以检验人体的衰老, 同时还可以研究清除活性氧自由基的抗衰老药物的机理, 及药物的筛选。又如炎症反应时, 由于活性氧的增加, 血清自发化学发光增高, 急性炎症比慢性更高, 检查这些发光可以用于炎症的病理研究和药理研究, 还可以用于诊断。另外, 对活性氧发光的观测可以和组织缺血再灌注损伤研究很好结合。在缺血缺氧再灌注后产生大量活性氧, 导致组织损伤, 同时大量活性氧使发光增强。这对心肌梗塞、脑血栓方面的研究有积极的作用。

$\text{Ca}^{2+}$  在人体中有重要作用, 可以通过水母发光蛋白或者钙标记物来测定细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  的分布, 从而对心肌、神经细胞的功能、血小板的聚集、细胞内钙泵的功能以及再灌注后钙超负荷引起的损伤的研究、防治很有好处。

如果对细胞内的大分子进行荧光标记,便可以探测到单个分子的位置信息,并可以跟踪分子的路径,了解分子在细胞内的分布和功能。是否能对分子进行探测,主要取决于系统的噪声水平。

利用显微光子计数成像系统不但可以探测到这些样品的发光的图像(光子二维分布),还能观测到发光的强度,实时观测活细胞的代谢过程,这比只能通过生化方法测量发光光子总数有无可比拟的优点。

系统实现从单光子到单分子的转变或从组织学图像到功能图像的转变将是重要的发展,在生物学医学的研究中具有光明的前景。国际上对羟基爆发活性的实时显示、基因表达的监测、钙离子波通过受精卵的连续观测等已经有了初步尝试<sup>[5]</sup>。

本课题在该系统上进行了凋亡细胞形态及生理状态、凋亡细胞中线粒体的变化以及  $\text{Ca}^{2+}$  在凋亡细胞中的分布变化的研究<sup>[6]</sup>。图 3 是凋亡细胞中钙离子的分布,其中图 3(a) 为细胞形态图像,图 3(b) 为钙离子的荧光图像,图 3(c) 为经过图像融合处理后的图像。



Fig. 3 The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cell, (a) The image of cell, (b) Fluorescence image of  $\text{Ca}^{2+}$ , (c) Fused image of (a) and (b)

**结束语** 利用自行研制的显微光子计数系统进行了初步的生物学实验,得到了肯定的结果。如果再改进实验条件并且应用已讨论过的光子图像的统计检验、统计处理技术,可望取得更好的效果。

### 参 考 文 献

- [1] Tsuchiya Y, Inuzuka E, Kurono T *et al.*. Phototr-counting image acquisition system and its applications. *J. Imag. Technol.*, 1985, **11**(5): 215220
- [2] 陈天明, 俞 信, 王苏生. 超微弱生物发光图像中的统计检验. *光学学报*, 1996, **16**(6): 806811
- [3] 陈天明, 俞 信, 王苏生. 超微弱发光图像的统计处理方法. *光学学报*, 1996, **16**(8): 11521156
- [4] Li Qin, Dai Caihong, Yu Xin *et al.*. Study of image fusion methods suitable for biomedical image. *Proc. SPIE*, 1998, **3548**: 158165
- [5] Langridge W, Escher A, Baga M *et al.*. Use of low light image microscopy to monitor genetically engineered bacterial luciferase gene expression in living cells and gene activation throughout the development of a transgenic organism. *Proc. SPIE*, 1989, **1161**: 216229
- [6] 李 勤. 单细胞微弱荧光图像探测及其融合处理研究. 北京理工大学博士论文, 1998.

## Microscopic Photon Counting Image System and Its Application

Wang Susheng

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

(Received 5 February 1999)

**Abstract** The photon counting image system is able to detect the ultra-weak bioluminescence of the macro image of organisms. To study the luminescence of cell or molecules, the microscopic photon counting image system is necessary. The difference of two systems is that the microscopic photon counting image system is a noise limited system. The light source of radioisotope  $^{14}\text{C}$  is used for examination the state to ensure the limit detect of microscopic photon counting image system. The fundamental capability of the system is to measure the distribution and function of extremely small amounts of biomolecules, to realise real time visualisation of oxyradical burst activities, continuous observation of the calcium ion wave moving, and monitoring of gene expression etc. It will be an important development of transform from photon to molecule and from image of histology to image of function, promising for applications in the field of biology and medical science.

**Key words** microscopic photon counting image, radioisotope  $^{14}\text{C}$ , active oxygen.