

文章编号: 0253-2239(2001)04-509-04

# 活体声荧光成像研究\*

何永红 邢 达 唐永红 谭石慈

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

**摘要:** 声荧光应用于生物组织成像研究是最近二年发展起来的新兴领域, 本文报道利用高灵敏度的致冷 CCD 探测系统获取了活体声荧光图像, 同时利用一种能在活体内增强声荧光的化学发光试剂 FCLA (Fluoresceinyl Cypridina Luminescent Analog, 海荧荧光素类似物), 成功地实现了动物在体成像。这种方法可望在医学影像诊断中得到广泛的实际应用。

**关键词:** 活体声荧光; 成像; 海荧荧光素类似物

中图分类号: Q63 文献标识码: A

## 1 引 言

1934 年, Frensel 等<sup>[1]</sup>第一次报道了超声在液体中产生声荧光现象, 后来的研究表明<sup>[2,3]</sup>, 声荧光源于声的空化效应, 在空化气泡破裂的瞬间辐射出强的等离子体荧光。Hilgenfeldt 等<sup>[4]</sup>提出气泡被压缩破裂的瞬间光辐射理论, 认为声荧光辐射是包括韧致辐射和电子-离子复合辐射的复杂过程。根据这一理论计算出气泡温度为 20000 K~30000 K, 辐射光谱集中在紫外区, 气泡破裂半径约为 5.5  $\mu\text{m}$ , 破裂瞬间声荧光辐射脉宽小于 50 ps, 这些都与实验结果很好地吻合。

有关声荧光研究应用于生物医学领域是近二年发展起来的<sup>[4,5]</sup>。1998 年 Wang 等<sup>[4]</sup>首次利用声荧光在模拟的高散射介质中成像, 实验中采用 Luminol 来增强声荧光, 并预示声荧光应用于医学诊断成像的可能性。但 Luminol 是一种工作在碱性环境下的脂溶性试剂, 不可能在体使用。

本文报道利用弱超声激发对活体(裸鼠)的声荧光成像实验, 同时发现一种能在体使用的水溶性化学发光试剂海荧荧光素类似物(FCLA), 可有效增强声荧光, 并利用它成功地实现了在体成像。

## 2 实验仪器与方法

实验装置如图 1 所示。其探测部分由背向照明

的致冷 CCD (Princeton Instruments, TE/CCD-512TKB,  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 和大数字孔径的照相镜头 (Nikon, 1:1.2) 组成, CCD 由 ST-130 控制器控制并将信号输入计算机, 由 Winview 软件处理。此系统具有量子效率高(峰值量子效率可达 80%)、本底噪声极为均匀、信噪比大等特点。其可探测极限达 0.09 Photon/s·pixel。超声信号经功率放大后驱动直径为 3 cm 的超声换能器, 超声功率为 50 W、频率为 40 kHz, 超声场为柱形, 到达鼠体的功率密度约为 0.18 W/cm<sup>2</sup>。

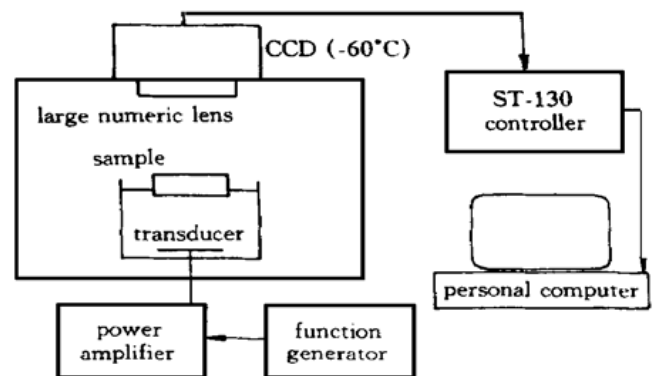


Fig. 1 A schematic diagram of experimental setup

海荧荧光素类似物购自日本东京化成工业株式会社, 用三蒸水配制成 5  $\mu\text{mol/L}$  溶液。利用吸收光谱仪测量其吸收谱, 再以其在 283 nm 的吸收峰激发, 用荧光分光光度计(岛津, RF-540 型)测量其荧光光谱, 再以一个典型体外产生单线态氧的化学反应体系<sup>[12]</sup>:  $\text{OH}^- + \text{NaClO} + \text{H}_2\text{O}_2$  体系检测海荧荧光素类似物的化学发光光谱。具体方法为: 配制 5  $\mu\text{mol/L}$  NaOH (pH = 8) 溶液, 再用此溶液分别配制 28  $\mu\text{mol/L}$  NaClO 溶液和 10  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,

\* 国家杰出青年科学基金和广东省自然科学基金资助项目。

将它们混合后,立即加入海荧荧光素类似物,用分光光度计测量其化学发光光谱。

取荷瘤(人神经胶质瘤细胞 SWO-38 移植肿瘤)裸鼠,用 0.5% 戊巴比妥钠 0.5 ml 腹腔注射麻醉后,皮下注射 0.5 ml 海荧荧光素类似物溶液。固定于网架上,放入样品箱焦面处,安装好超声激发装置,加水使超声池水面透过网架与裸鼠腹部全面接触,用循环水保证池内水温在 15 °C 左右以利于超声的传导。在微弱光照下记录好外形图后,开始超声实时激发,同时 CCD 开始记录 15 min,得到图像。实验后取出鼠,确认鼠呼吸正常,放回鼠笼内 30 min 内能苏醒,无异常。

### 3 实验结果与讨论

海荧荧光素类似物是近年来开发的新型高效的水溶性荧光分子<sup>[7,11]</sup>,可用于临床的血液白细胞功能状态检验。它能选择性地和单线态氧或超氧阴离子发生化学反应发光,一般认为,其与单线态氧反应发光的机理是形成一个激发态羰基中间产物,其退激发时发光。

图 2 给出了海荧荧光素类似物的吸收光谱、荧光光谱和化学反应发光光谱,由图可以看出,海荧荧光素类似物的化学发光光谱峰值在 532 nm 处,谱带也较窄,半高宽 40 nm 左右,是一种较合适的化学发光剂。

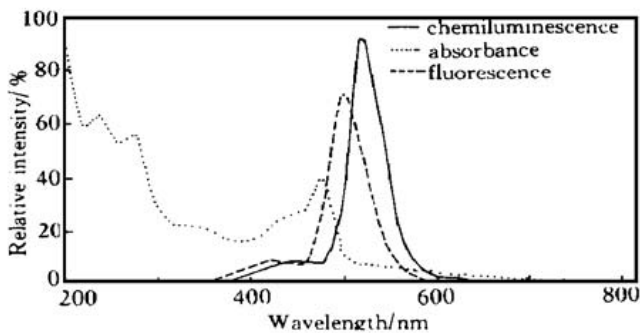


Fig. 2 Spectra of FCLA (the excitation of fluorescence spectrum is at 283 nm)

海荧荧光素类似物的化学发光效率在 pH7.0~pH8.3 时较高<sup>[11]</sup>,峰值在 pH7.5 处,而体内生理的 pH 环境正好满足这一条件。而其他工作中用到的 Luminol 是在碱性环境下工作的,最佳 pH 为 10,而在生理的 pH7 时几乎不发光<sup>[4]</sup>。另外,海荧荧光素类似物是水溶性分子,便于实际应用。

图 3(a) 为一裸鼠在微弱光照下的外形图,实验采用荷瘤小鼠是为了判别肿瘤组织的声荧光有无异常,图 3(b) 为得到的其声荧光图像。其 CCD 探测器

的曝光时间为 15 min。鉴于声荧光穿透能力的限制,这应该认为主要是鼠体表组织和浅层组织的发光图像,可以看出裸鼠身体比较清晰的轮廓,各处强度分布比较均匀,肿瘤组织处并未发现异常。鼠体区域平均光子计数约为 700 photon/cm<sup>2</sup>·s,这个强度要比体外体系声荧光强度(肉眼可见<sup>[6]</sup>)弱得多。生物组织内声荧光的减弱除了是由于声场经裸鼠身体到达体表的强度衰减之外,还因为生物组织的声荧光有它自己的特性。



Fig. 3 (a) Photograph of a nude mouse, (b) SL image of the same mouse. The exposure time is 15 minutes

我们认为,生物组织的声荧光属于多泡声荧光,但其机制比声荧光更复杂。

生物体 70% 的成分是水,并且含有数以百万计的其他各种生物大分子,呼吸作用将氧(包括溶解的氧气)源源不断地输送到全身各处。弱超声的空化效应作用于生物组织时其气泡内充满了氧气和作为溶剂的水的蒸汽,被压缩时数千 K 的温度和 10<sup>7</sup> Pa (数百大气压)量级的压力环境构成了良好的化学反应微腔。从多泡荧光的光谱分析<sup>[6]</sup>可知溶剂的改变导致光谱的明显差异,并发现声荧光光谱峰值与溶剂分子本身的光谱有关。以水为溶剂而言,其谱峰为 310 nm<sup>[6]</sup>,这一峰值明显与羟自由基(OH·)的分子能级相联系。说明空化气泡腔内水蒸汽在高温、高压条件下被裂解生成 H·和 OH·活性自由基。这些自由基自身退激发时存在发光<sup>[8]</sup>,另外,还可以攻击积聚在气泡周围的含有发色团的生物大分子而产生发光<sup>[9]</sup>,也可以和泡内的氧分子反应生成单线态氧或超氧阴离子等其他自由基,再引发一系列其他

化学反应发光<sup>[10]</sup>。

实验中发现死亡裸鼠的声荧光明显弱于活鼠,这可能是由于死亡鼠停止呼吸,体内无法得到持续的氧供应有关。

图 4 给出了在弱超声场激发下含有海荧荧光素类似物增强效果的声荧光图像。图 4(a) 为一裸鼠的外形图, 0.5 ml 海荧荧光素类似物溶液在实验前 5 min 从图中的“十”字部位进行皮下注射, 图 4(b) 为其在弱声场作用下实时探测 15 min 得到的图像。从图 4(b) 中可以看出海荧荧光素类似物注射部位周围组织的发光光强明显大于远离注射部位的组织, 其光子计数约为  $1680 \text{ photon/cm}^2 \cdot \text{s}$ 。可以认为“十”字部位周围的发光为海荧荧光素类似物在体增强的声荧光, 而远离“十”字部位的发光可以认为是生物组织的活体声荧光。如前所述, 声空化效应产生了大量单线态氧或(和)超氧阴离子自由基, 它们和海荧荧光素类似物反应产生较强化学发光<sup>[14]</sup>。从图中可见, 由于目前 CCD 像面增益具有一定的不均匀性, 图像上半部分噪声较强, 这一点可通过进一步改善 CCD 面阵的冷却均匀性以及改进图像处理方法而得以解决。

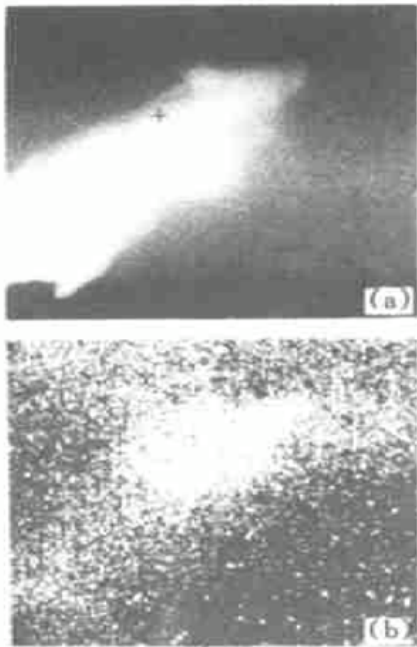


Fig. 4 (a) Photograph of a nude mouse, (b) FCLA-enhanced SL image of the same mouse. FCLA was injected subcutaneously at the cross position, and the exposure time is 15 min

目前成像光子可能主要来自于体表浅层组织, 但当前的实验结果仅演示了此种方法的可行性, 如果能够选用与海荧荧光素类似物具有类似性质但其发射光波长更长(680 nm~950 nm)的声荧光增强物质, 并结合共焦扫描成像技术<sup>[13]</sup>, 将有可能做到

较深层组织的层析成像。此方法可进一步结合内窥镜技术很有可能成为一种实用的临床诊断技术。

**结论** 通过上述实验, 可以得到如下结论:

1) 生物组织内存在声荧光现象, 并具有它自身的特性。本文直接利用生物组织的声荧光实现了动物在体成像。

2) 水溶性的化学发光分子海荧荧光素类似物对机体无毒性, 生理 pH 值下发光效率高, 其化学发光峰值波长为 532 nm, 是一种较好的能在体使用的声敏荧光增强试剂。

3) 实验观察到了海荧荧光素类似物增强的声荧光在体图像。鉴于低强度(小于  $10 \text{ W/cm}^2$ ) 超声对生物组织基本无害<sup>[5]</sup>, 这一方法可望在医学影像诊断中得到广泛的应用。

### 参 考 文 献

- [1] Frenzel H, Schultes H. Luminescenz im ultraschallbeschikten Wasser. *Z. Phys. Chem. Abt.*, 1934, **27B**(6): 421~424
- [2] Moss W C, Clarke D B, Young D A. Calculated pulse widths and spectra of a single sonoluminescing bubble. *Science*, 1997, **276**(5317): 1398~1401
- [3] Hilgenfeldt S, Grossmann S, Lohse D. A simple explanation of light emission in sonoluminescence. *Nature*, 1999, **398**(6726): 402~405
- [4] Wang L V, Shen Q. Sonoluminescent tomography of strong scattering media. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(7): 561~563
- [5] Shen Q, Wang L V. Two-dimensional imaging of dense tissue-simulating turbid media by use of Sonoluminescence. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(1): 246~252
- [6] Crum L A. Sonoluminescence. *Physics Today*, 1994, **47**(9): 22~29
- [7] Nakano M, Sugioka K, Ushuima Y *et al.*. Chemiluminescence probe with cypridina luciferin analog estimating the ability of human granulocytes to generate  $\text{O}_2^-$ . *Analytical Biochemistry*, 1996, **159**(4): 363~369
- [8] 王维江, 邢 达, 谭石慈等. 生物超弱发光图像的探测与分析. *生物物理学报*, 1997, **13**(4): 677~682
- [9] 谭石慈, 邢 达. 生物超微弱发光图像的观测. *科学通报*, 1997, **42**(6): 643~645
- [10] 邢 达, 唐永红, 谭石慈等. 植物体应激反应中生物光子发射的实验观测. *科学通报*, 1999, **44**(21): 2299~2302
- [11] 陈季武, 胡天喜. 一种新的测量单线态氧的化学发光体系. *发光学报*, 1995, **16**(3): 273~277
- [12] 胡天喜. 测量活性氧、自由基及脂质过氧化物的化学发光技术. *自由基生命科学进展*, 第 5 集, 北京: 原子能出版社, 1997. 65~73
- [13] 邢 达, 于彦华, 周俊初等. 利用激光共聚焦扫描显微镜的 GFP 荧光成像. *光学学报*, 1999, **19**(10): 1439~1440

- [ 14] He Yonghong, Xing Da, Tang Yonghong *et al.*. FCLA-enhanced sonoluminescence imaging in vivo. *Proc. SPIE*, 1999, **3863**: 129~ 133

## Study on Sonoluminescence Imaging of Living Body

He Yonghong Xing Da Tang Yonghong Tan Shici

(*Laser Life Science Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631*)

(Received 20 October 1999; revised 16 December 1999)

**Abstract:** Imaging biological tissues using sonoluminescence (SL) is a new research field developing in the latest two years. Sonoluminescence image of living body (nude mouse) was obtained by the high quantum efficiency imaging system. Fluoresceinyl Cypridina Luminescent Analog (FCLA), a chemiluminescent analytic agent, is used in vivo for the first time to enhance biological SL. An image of FCLA enhanced SL in vivo was observed too. This technique has potential application in clinics for imaging diagnosis.

**Key words:** sonoluminescence of living body; imaging; fluoresceingy cypridina luminescent analog