

文章编号: 0253-2239(2005)06-835-6

拟威布尔分布密度函数在荧光寿命成像 数据分析中的应用*

周明华¹ 隋成华²

(¹ 浙江工业大学应用数学系, 杭州 310032)
(² 浙江工业大学应用物理系, 杭州 310032)

摘要: 荧光寿命法成像技术 (FLIM) 是一种非常有效、功能强大且能用来分析复杂生物组织和细胞分子的成像技术。传统的荧光寿命成像的数据分析, 按某些具有不同寿命、离散的单参量指数模型来描述荧光衰减过程。在生物组织这样既复杂又不均匀的样品中, 虽然多参量指数模型能提供比单参量指数模型对实验数据更好的拟合效果, 但是离散多参量的假定往往是随意的。提出了拟威布尔分布密度函数可能是生物荧光分子团衰减动力过程的真实再现, 并且通过计算证明, 对于某些生化感兴趣的荧光分子团的多槽基面效价测定样品的数据, 相对于单参量指数与多参量指数衰减函数有更好的一致性。同时讨论了将该荧光衰减模型应用于荧光寿命成像的前景。

关键词: 生物光学; 拟威布尔分布密度函数; 荧光寿命法成像技术; 荧光衰减过程

中图分类号: TN919.8 文献标识码: A

Application of the Quasi-Weibull Distribution Density Function to Data Analysis of Fluorescence Lifetime Imaging

Zhou Minghua¹ Sui Chenghua²

(¹ Department of Applied Mathematics, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)
(² Department of Applied Physics, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

Abstract: Fluorescence lifetime imaging is a rather effective and powerful method that can be used to analyze complex biological tissues and molecules. Conventional analyses of fluorescence lifetime data resolve the fluorescence decay profile in terms of discrete single exponential components with distinct lifetimes. In complex, heterogeneous biological samples such as tissue, multi-exponential decay functions can appear to provide a better fit to fluorescence decay data than the assumption of a single-exponential decay, but the assumption of multiple discrete components is essentially arbitrary. Quasi-Weibull distribution density function was likely to provide a truer representation of the underlying fluorescence dynamics. As comparing with those of single exponential and multi-exponential decay functions, the novel model can yield the better goodness of fit using data from multi-well plate assays of chemically and biologically interesting fluorophores. At the same time, the potential application of the quasi-Weibull distribution density function to fluorescence lifetime imaging was discussed.

Key words: biological optics; quasi-Weibull distribution density function; fluorescence lifetime imaging; fluorescence decay profile

1 引 言

荧光寿命法成像技术 (FLIM) 是利用合适的激发波长光对生物样品进行激励, 通过测量生物组织中的

自然荧光衰减过程的不同来获得荧光团分子内部的能级结构。同时可用来区分样品中不同分子种类。由于自发荧光发光强度衰减函数定量图能对荧光分

* 国家自然科学基金 (10371110) 资助课题。

作者简介: 周明华 (1959~), 男, 浙江杭州人, 副教授, 硕士, 主要从事计算机辅助几何设计、数学建模、计算、拟合等方面的研究。E-mail: mhzhou@zjut.edu.cn

收稿日期: 2004-09-28; 收到修改稿日期: 2004-11-11

子团及其周围的环境产生很高的区分度,故荧光成像技术具有特别的功能。对于医学成像,荧光法能从内在的自发荧光中获得功能对比,提供比以散射或吸收为基础的成像技术更大的区分能力。因而,该方法已被广泛地应用于细胞免疫学、癌症检测、DNA(脱氧核糖核酸)与 RNA(核糖核酸)分析,甚至能被用来比对角蛋白、软骨和动脉管等生物组织的类型和区分诸如胶原和弹性蛋白这样非常相似的生物组织^[1~3]。

但是,在蛋白质中的荧光发光衰减常常表现为较复杂的过程。原因是基态的多重结构、蛋白质的动力过程、光谱的弛豫以及介于分子团与周围环境的相互作用^[4]。蛋白质的荧光衰减通常可用多参量指数衰减函数来描述,也就是通过一组半衰期为预先设定的指数因子的算术和来定义。这一理论的基础是基于每一指数因子均与一特定的蛋白质结构相关。然而,在许多情况下用离散的单参量指数函数来描述荧光衰减过程是没有物理意义的。例如,在取决于蛋白质之间相互转换的不均匀构造物内^[5]、经历了偶极松弛的荧光团^[6,7]以及化学性质不均匀系统都是如此^[8]。它们显示了复杂的荧光衰减过程,并且无法用旋转异构体假设来描述^[9]。甚至对于在溶液中的吡啶半族,要发现一个唯一的单参量指数来描述荧光衰减过程也是十分困难的^[8,10]。在这样的情况下,用多参量指数衰减函数来描述也许是武断与任意的,尽管多参量指数函数可能改善对数据的拟合,但是常常没有物理意义。对于复杂的不均匀系统,将该系统考虑为连续的荧光寿命分布比将其看作是一组离散的单参量指数函数之和可能更符合实际情况。必须找出一种与这种连续的荧光寿命分布相对应的新的衰减函数模型。由于维巴耳分布密度函数具有函数表达式明确,覆盖面广,拟合效果好和研究方便等优点,已被广泛应用于描述器件的连续寿命分布^[11]。本文提出了拟威布尔分布密度函数(Quasi-Weibull distribution density function)可能是生物荧光分子团衰减动力过程的真实再现,并且通过计算证明,这种新颖的荧光衰减模型函数对于某些生化感兴趣的荧光分子团的多槽基面效价测定样品的数据,相对于单参量指数与多参量指数衰减函数有更好的一致性。

2 理论分析

2.1 生物组织的荧光发光机理

当生物分子被入射光激发后,在荧光分子团中

一个受激的电子将发射一个光子后回到基态,产生荧光。处于受激发光的荧光发光强度 $I(t)$ 随时间 t 的变化规律可用下式来表述^[12]:

$$dI(t) = -\frac{1}{\tau(t)}I(t)dt, \quad (1)$$

其中 $\tau(t)$ 是被激发的分子数降到它的初始值的 $1/e$ 所需的时间,称为系统寿命。当 $\tau(t) = \tau_0$ 为一常数时,从(1)式可得到单参量指数衰减函数:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right), \quad (2)$$

这里 I_0 为 $t=0$ 时,最初处于受激状态的电子所发出的荧光强度。从统计的角度讲,以上寿命时间也可用求统计平均值的方法获得:

$$\tau = \langle t \rangle = \int_0^{\infty} t I(t) dt / \int_0^{\infty} I(t) dt, \quad (3)$$

实验中 τ 的测量是一个相对的测量,较易在实际情况下实现。只要想办法测出样品中每一个像素从起始的荧光强度降到 $1/e$ 所需的平均时间,利用样品中所有像素的 τ 值,即可得到具有生物组织及细胞内部功能信息的 $\tau(x, y)$ 分布图像。

生物组织往往是由多种荧光分子团组成,因而每一独立的荧光分子团显示了一个单参量指数衰减过程。显然,作为孤立的、非相互作用的荧光分子团的混合物的生物组织能以这样一组离散单参量指数函数之和,即多参量指数衰减函数来描述它的荧光强度衰减动力过程:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n I_0^i \exp\left(-\frac{t}{\tau_0^i}\right), \quad (4)$$

其中 I_0^i 和 τ_0^i 是第 i 种荧光分子团的荧光强度衰减动力过程的本征值。

激发态的衰减过程必须考虑生物组织内的荧光分子团与它们周围环境的相互作用。这样一个混合结构出现在蛋白质内。在其内部,激发态分裂成许多亚能级结构。在其内部激发与基态能级之间存在连续的跃迁分布^[5,12],在室温下,与不同构造相关的不同能级之间的跃迁时间尺度具有与激发态的衰减时间相同的数量级^[5]。荧光强度衰减动力过程是一个连续分布,而用 $I_0(\tau)$ 作为 τ 的函数来描述最初处于受激状态的电子所发出的荧光强度也比用 I_0^i 更合理。从而处于受激发光的荧光发光强度 $I(t)$ 随时间 t 的变化规律可用下式来表述^[13]:

$$I(t) = \int_0^{\infty} I_0(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau, \quad (5)$$

(5)式表示了生物组织内受外来激发后荧光强度衰

减动力过程的普遍情况,这也是用拟威布尔分布密度函数作为模型来描述该动力过程的依据。

2.2 拟威布尔分布密度函数模型的导入

单参量指数模型描述荧光强度衰减动力过程,仅仅在能级结构较为简单的单种荧光分子团场合下才具有较好的拟合效果,而在大多数情况下拟合效果不好。多参量指数模型又因为指数参量的选择是武断与任意的,常常没有物理意义。而威布尔分布密度函数在用于描述器件的连续寿命分布时^[11],已表现出了函数表达式明确,覆盖面广,拟合效果好和研究方便等优点。威布尔分布密度函数为^[14]:

$$I(t) = \begin{cases} \frac{\gamma}{\beta} \left(\frac{t-\delta}{\beta} \right)^{\gamma-1} \exp \left[- \left(\frac{t-\delta}{\beta} \right)^\gamma \right], & t > \delta \\ 0 & t \leq \delta \end{cases}, \quad (6)$$

其中 δ 为位置参量(location parameter), $\beta > 0$ 为尺度参量(scale parameter), $\gamma > 0$ 为形状参量(form parameter)。

为使威布尔分布密度函数模型拟合效果更好,并考虑到实验中的本底噪声等因素,可对公式(6)进行变形,得到荧光寿命分布规律为

$$I(t) = I_0(t-\delta)^{a-1} \exp \left[- \frac{(t-\delta)^b}{\tau} \right] + c, \quad (7)$$

(7) 式称为拟威布尔分布密度函数,其中 $I_0, \delta, a, b, \tau, c$ 为待定常数。从(7)式的表达式可知:当 $\delta = 0, a = 1, b = 1, c = 0$ 时,可得(2)式。因此(7)式具有广泛性,适应面更广。

3 实验与计算

3.1 实验

用于获取实验数据的时间域荧光寿命法成像技术装置如图1所示(该装置是由英国帝国理工学院物理系 Paul French 教授所领导的生物信息光学组建立的,作者之一作为访问学者在该组参加其研究工作)。通过该装置,分别获得四溴萤光素(Eosin), 2-(对二甲氨基苯乙基)-N-乙基吡啶碘化物(DASPI), 四溴萤光素与甘油混合剂(Eosin and DASPI 60glycerol)这三种荧光分子团材料多槽基面效价测定样品的单像素荧光寿命数据,具体试验数据见图2。其中纵轴表示荧光的相对强度,横轴是以 ps 为单位的时间。

脉冲宽度 10 ps, 重复频率 20 kHz, 而输出波长 415 nm 和脉冲功率 1 mJ 数量级的超快速的激发光进入样品,样品所发出的受激发射荧光由高速、并行

微弱光信号探测系统测量。利用时间门控光学图像增强器(gated optical image intensifiers)检测器技术来完成荧光信号的测量。时间门控光学图像增强器(GOI)是一种基于微通道平板型图像增强器的超快微弱光信号检测器^[15]。通过调节产生激发入射光的超短脉冲激光器相关联的触发信号控制光学图像增强器的采样时刻与采样宽度,就能够在样品发出荧光衰减过程中,以采样宽度 $\Delta t = 100$ ps 等间隔对荧光发光强度进行采样。这样沿衰减过程可得到一系列的荧光发光强度图,而对视场中每个像素,通过对这些采样点的拟合,即可得到它的荧光寿命 τ ,从而完成 $\tau(x, y)$ 分布图像的测量。

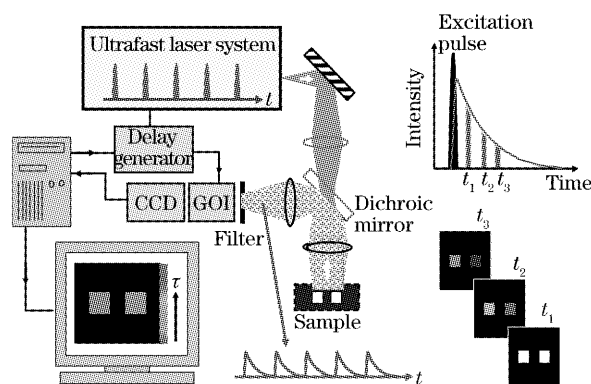


图1 宽场时域荧光寿命法成像装置原理图

Fig. 1 Schematic diagram of wide-field time-domain FLIM

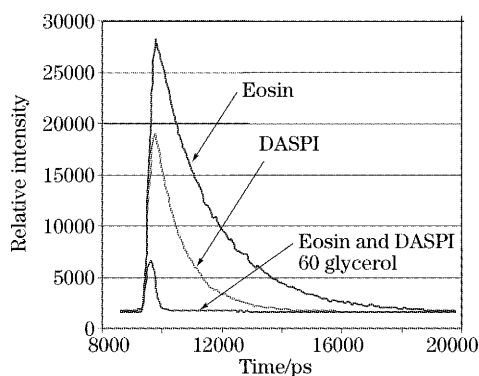


图2 单个像素不同荧光分子的荧光寿命试验数据

Fig. 2 The experimental data with fluorescence lifetime of different molecular species in one pixel

3.2 数据计算

在实际测量时随着测量时间的增加,衰减光强度变得不易测量,而背景噪声对测量结果的影响也越来越大,这也可从图2中看出。为了消除本底的影响,需对背景噪声本底进行扣除。根据经验,仅把与数据最小值 $(I_i)_{\min}$ 的相对误差大于 5%,即满足

$$\left| \frac{I_i - (I_i)_{\min}}{I_i} \right| > 5\%, \quad (8)$$

的数据保留下来进行拟合,这样在计算衰减常量时更为合理。

为获得尽可能真实的衰减寿命规律,需要计算出拟威布尔分布密度函数(7)式中各参量的值。拟威布尔分布密度函数是非线性函数,因此采用非线性最小二乘拟合,用高斯-牛顿迭代法求出各参量,使 χ^2 为最小。其中:

表 1 用拟威布尔函数拟合 Wosin, DASPI, Eosin 和 DASPI 60 glycerol 衰减寿命规律数据拟合参量

Table 1 Fit parameters of quasi-Weibull distribution density function to Eosin, DASPI, Eosin and DASPI 60 glycerol data sets

| | c | I_0 | δ | a | b | τ |
|-----------------------------|--------|----------------------|----------|--------|--------|--------|
| Eosin | 1353.8 | 8953.6 | 9639.1 | 1.2099 | 0.7626 | 114.60 |
| DASPI | 1729.4 | 3368.1 | 9610.4 | 1.1498 | 1.4704 | 1938.6 |
| Eosin and DASPI 60 glycerol | 1600 | 4.0547×10^8 | 4597.4 | 0.0703 | 1.1906 | 15939 |

根据(3)式、(8)式,衰减常量的计算可由(10)式、(11)式给出:

$$\langle \tau_1 \rangle = \frac{\int_{T_1}^{T_2} t \{ I(t) - \min_{T_1 \leq t \leq T_2} [I(t)] \} dt}{\int_{T_1}^{T_2} \{ I(t) - \min_{T_1 \leq t \leq T_2} [I(t)] \} dt} = \frac{\int_{T_1}^{T_2} t I(t) dt - \frac{1}{2} \min_{T_1 \leq t \leq T_2} [I(t)] (T_2^2 - T_1^2)}{\int_{T_1}^{T_2} I(t) dt - \min_{T_1 \leq t \leq T_2} [I(t)] (T_2 - T_1)}, \quad (10)$$

$$\langle \tau \rangle = \langle \tau_1 \rangle - T_1, \quad (11)$$

其中 T_1 为 $(I_i)_{\min}$ 所对应的 t 值, T_2 为按 $\left| \frac{I_i - (I_i)_{\min}}{I_i} \right| > 5\%$ 截取数据后最后一个 I_i 值所对应的 t 值。由此计算出的衰减常量如表 2 所示。

表 2 平均衰减常量

Table 2 Mean decay lifetime

| | Eosin | DASPI | Eosin and DASPI 60 glycerol |
|-----------------------------|-------|-------|-----------------------------|
| $\langle \tau \rangle$ / ps | 913 | 122 | 1727 |

表 3 用单参量指数衰减函数、双参量指数衰减函数以及拟威布尔分布函数拟合后优度 χ_r^2 比较

Table 3 χ_r^2 of single parameter exponential decay function, double parameter exponential decay function and quasi-Weibull distribution density function

| | Single parameter Exp. | Double parameters Exp. | Quasi-Weibull |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|---------------|
| Eosin | 1.4346 | 1.2833 | 0.8404 |
| DASPI | 13.5122 | 2.3972 | 1.5497 |
| Eosin and DASPI 60 glycerol | 2.067 | 1.7564 | 1.7424 |

从图 3(a)、图 3(b)可以看出,对于单原子荧光分子团 Eosin,由于实际模型与用单参量指数模型较为接近,因此用单参量指数模型、双参量指数模型以及拟威布尔布密度函数拟合效果均不错。但是从表 3 可知,用拟威布尔布密度函数拟合时的拟合优度指标明显比前两者的都好;观测图 3(c)、图 3(d)可知,对于单原子荧光分子团 DASPI,用单参量指数模型来拟合效果很差,用双参量指数模型拟合效果尚可,而用拟威布尔布密度函数模型则效果很好,

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N [I(t_i) - y_i]^2, \quad (9)$$

式中 y_i 是实验数据值, $I(t_i)$ 是拟合函数在 t_i 处的值, N 是参加拟合的数据个数。

表 1 是利用拟威布尔分布密度函数计算 Eosin, DASPI, Eosin 和 DASPI 60 glycerol 三种荧光分子团衰减寿命规律的拟合参量。

3.3 结果比较与分析

根据拟合优度指标公式^[14]

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \frac{[I(t_i) - y_i]^2}{y_i}, \quad (12)$$

进行比较。其中 y_i 是实验数据值, $I(t_i)$ 是拟合函数在 t_i 处的值, N 是参加拟合的数据个数, p 为拟合函数中参量个数。表 3 为各种荧光物质用以上三种函数模型拟合后的拟合优度值。图 3 为结果比较图。

拟合优度指标也明显改善;再观测图 3(e)、图 3(f)可看出,对于混合原子荧光分子团 Eosin 和 DASPI 60 glycerol,由于原子荧光分子团数目的增加,反映的是几个荧光分子团的综合衰减规律, DASPI 衰减得较快,所占比重较小,而 Eosin、60 glycerol 所占比重较大,因而呈现的衰减规律与 Eosin、60 glycerol 的大致相同,拟合时用三种模型拟合均可,但以拟威布尔布密度函数拟合效果最佳。

拟威布尔分布密度函数拟合效果明显优于单参

量指数函数模型,同时也好于多参量指数函数模型。拟威布尔分布密度函数模型具有良好的拟合效果,

同时从结果中也可看出该模型对各种生物荧光分子团具有广泛的适应性,并且处理结果稳定。

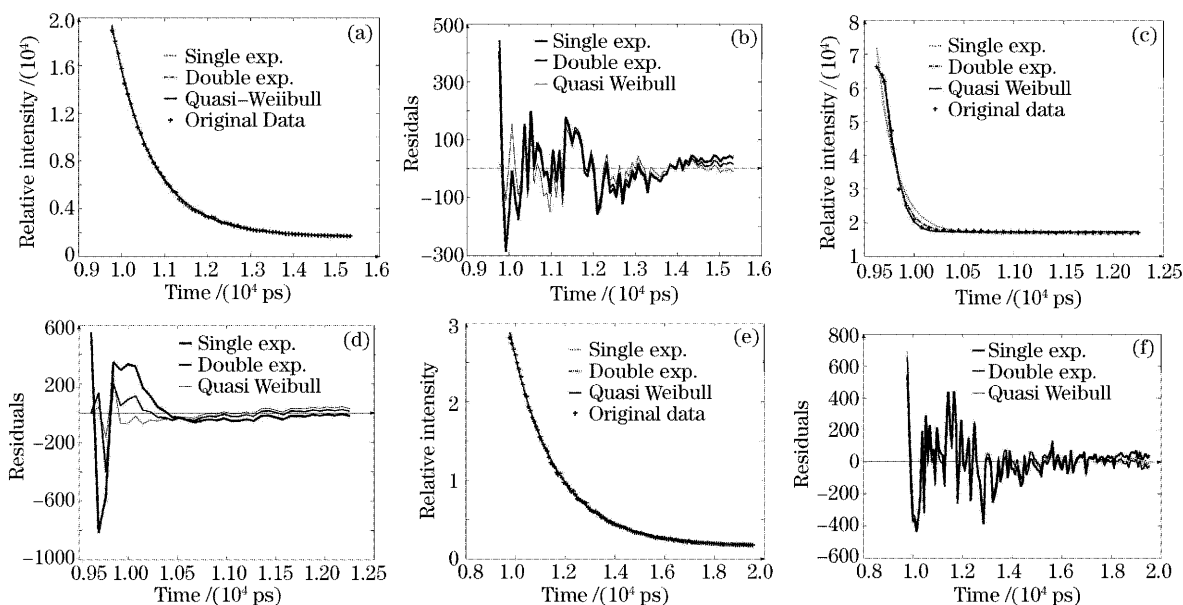


图3 单参量数据衰减函数、双参量指数衰减函数以及拟威布尔分布函数拟合曲线比较。(a) Eosin 数据拟合,(b) Eosin 数据残差,(c) DASPI 数据的拟合,(d) DASPI 数据的残差,(e) Eosin 和 DASPI 60 glycerol 数据拟合,(f) Eosin 和 DASPI 60 glycerol 数据拟合残差

Fig. 3 Fit curves of single parameter exponential decay function, double parameter exponential decay function and quasi-Weibull distribution density function to (a) Eosin data set, (b) fit residuals to Eosin data set, (c) DASPI data set, (d) fit residuals to DASPI data set, (e) DASPI 60 glycerol data set, (f) fit residuals Eosin and DASPI glycerol data set

4 结 论

由于荧光寿命法成像技术能对复杂的生物组织、细胞结构在分子尺度进行功能性成像,为细胞和生物组织的功能研究提供一种强大的手段。而在该成像过程中,对生物组织中荧光分子团受激后荧光强度衰减动力过程的描述,即对荧光衰减模型函数的研究十分重要。传统的荧光衰减模型函数采用单参量指数模型描述荧光强度衰减动力过程,仅仅在能级结构较为简单的单种荧光分子团场合下才具有较好的拟合效果,而在大多数情况下拟合效果不好。多参量指数模型又因为指数参量的选择是武断与任意的,尽管多参量指数可能改善对数据的拟合,但是常常是没有物理意义。由于拟威布尔分布密度函数具有函数表达式明确,覆盖面广,拟合效果好和研究方便等优点,已被广泛应用于描述器件的连续寿命分布。该荧光衰减模型函数有可能为复杂的生物组织、细胞结构在分子尺度进行荧光寿命法成像提供一种新颖的荧光衰减模型函数,从而使得该技术能更好地应用于生物医学、分子生物学和基因结构探究等领域。

致谢 对英国帝国理工学院物理系 Paul French 教授,以及他所领导的生物信息光学组的其他同事,为作者在该校做访问研究工作期间,提供了必要的实验与研究条件,以及对课题的研究给予的热心的指导和富有成效的建议,表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- 1 R, Cubeddu, D. Comelli, C. D. Andrea *et al.*. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine[J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2002, **35**(2): 61~76
- 2 Jan Siegel, Daniel S. Elson, Stephen E. D. *et al.*. Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(16): 2995~3004
- 3 Zheng Wei, Huang Zhiwei, Xie Shusen *et al.*. Intrinsic microscopic fluorescence and imaging of human lung tissues[J]. *Chin. J. Lasers*, 2001, **A28**(7): 587~590 (in Chinese)
郑蔚,黄志伟,谢树森等. 人肺组织内源性显微荧光特性研究[J]. *中国激光*, 2001, **A28**(7): 587~590
- 4 Joseph R. Lakowicz. On spectral relaxation in proteins[J]. *American Society for Photobiology J.*, 2000, **72**(4): 421~437
- 5 J. R. Alcalá, E. Gratton, F. G. Prendergast. Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions[J]. *Biophys. J.*, 1987, **51**(6): 925~936
- 6 Alexey S. Ladokhin. Red-edge excitation study of nonexponential

- fluorescence decay of indole in solution and in a protein[J]. *J. Fluorescence*, 1999, **9**(1): 1~9
- 7 Gao Shumei, Liu Ying, Lan Xiufeng *et al.*. Investigation of visible laser-induced hemoglobin fluorescence spectra characteristics[J]. *Chin. J. Lasers*, 2004, **31**(7): 893~896 (in Chinese)
高淑梅,刘莹,兰秀凤等. 可见波段 Ar⁺ 激光诱导血红蛋白荧光光谱特性研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(7): 893~896
- 8 Ignacy Gryczynski, W. Wiczak, M. L. Johnson *et al.*. Lifetime distributions and anisotropy decays of indole fluorescence in cyclohexane/ethanol mixtures by frequency-domain fluorometry [J]. *Biophys. Chem.*, 1988, **32**(2~3): 173~185
- 9 A. S. Ladokhin, S. H. White. Alphas and taus of tryptophan fluorescence in membranes [J]. *Biophys. J.*, 2001, **81**(3): 1825~1827
- 10 A. G. Szabo, T. M. Stepanik, D. M. Wayner *et al.*. Conformational heterogeneity of the cooper binding site in azurin [J]. *Biophys. J.*, 1983, **41**(1): 233~244
- 11 Michael A. Bean. *Probability: The Science of Uncertainty with Applications to Investments, Insurance, and Engineering* [M]. Beijing: China Machine Press, 2000. 235~245
- 12 J. Ricardo Alcala. The effect of harmonic conformational trajectories on protein fluorescence and lifetime distributions[J]. *J. Chem. Phys.*, 1994, **101**(6): 4578~4584
- 13 Benny K. C. Lee, J. Siegel J, S. E. D. Webb *et al.*. Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging[J]. *Biophysical J.*, 2001, **81**(3): 1265~1274
- 14 Lothar Sachs. *Applied Statistics: A Handbook of Techniques* [M]. Second Edition. New York, Berlin: Springer-Verlag, 1978. 234~325
- 15 K. Dowling, M. J. Dayel, M. J. Lever *et al.*. Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications[J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(10): 810~812