

斑马鱼肌肉结构的定量偏振成像

朱雨¹, 杨光², 李思颀², 王林波², 金鑫², 梁永², 赵唯初², 李辉^{2*}

¹中国科学技术大学精密机械与精密仪器系, 安徽 合肥 230026;

²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

摘要 偏振成像可用于表征各向异性肌肉组织,但是常规偏振成像方法只能给出定性的结构形态,无法对肌肉发育过程进行定量的比较。构建了一套定量偏振成像系统,采用两个互相垂直的偏振片同步旋转得到一系列图像,经过图像处理获取斑马鱼每个肌节定量的相位延迟量。该定量偏振图像与光源亮度、曝光时间等无关,可以用来比较不同时间拍摄的斑马鱼肌肉形态和分布。研究发现野生型和肌肉受损型斑马鱼肌肉生长变化过程不同。

关键词 医用光学; 定量偏振成像; 相位延迟量; 斑马鱼; 肌肉生长

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0811001

Quantitative Polarization Imaging of Zebrafish Muscle Structures

Zhu Yu¹, Yang Guang², Li Simin², Wang Linbo², Jin Xin²,

Liang Yong², Zhao Weichu², Li Hui^{2*}

¹Department of Precision Machinery and Precision Instrumentation, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract Polarization imaging can be used to characterize anisotropic muscle tissue, but the conventional methods can only give the qualitative structure and morphology of muscle development rather than quantitative comparison. In this paper, a quantitative polarization imaging system is constructed. Two perpendicular polarizers are rotated synchronously to get a set of images, and then the quantitative phase retardance of each zebrafish sarcomere is calculated through image processing. This quantitative polarization image is independent of the brightness of light source, the exposure time, etc., hence can be used to compare the morphology and distribution of zebrafish muscle taken at different time. The results revealed differences in the process of muscle growth between wild-type and muscle-damaged zebrafish.

Key words medical optics; quantitative polarization imaging; phase retardance; zebrafish; muscle growth

OCIS codes 110.4155; 120.5410; 170.0110

1 引 言

偏振成像是一种无损、非标记的显微成像技术^[1]。它利用不同方向的偏振光在透明生物样品中传播时的相位延迟特性不同来提取生物样品各向异性结构的信号,实现边缘增强的显微图像。偏振成像通常采用正交探测的成像方法,能够抑制样品表面散射光的影响。在成像过程中旋转偏振片可以获得不同的线偏振图像,通过计算穆勒矩阵元可以获

取样品双折射主轴的空间分布,从而为各向异性组织的量化特性提供一套定量偏振独立参数^[2-4]。使用不同波长的激光可获取不同生物组织的穆勒矩阵,以更全面检测样品的微观结构^[5]。随着光场偏振态调控及表征技术的逐渐完善,偏振成像逐渐成为研究具有双折射特性生物样本的重要方法,在细胞骨架、神经元生长锥、肌纤维发育、癌症诊断等领域得到广泛应用^[6-10]。

斑马鱼作为生物医学研究中常用的模式动物,

收稿日期: 2019-02-13; 修回日期: 2019-04-08; 录用日期: 2019-05-05

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0110100)、国家自然科学基金(61805272)、中国科学院科研装备研制项目(YZ201646)、王宽诚教育基金

* E-mail: hui.li@sibet.ac.cn

与人类基因同源性高达 87%，其实验结果对人体相关研究具有很强的指导价值^[11-12]，特别地，斑马鱼胚胎及幼体呈透明或半透明状^[13-14]，非常适合于光学成像研究。斑马鱼肌肉纤维排列规则且具有双折射特性，当发生肌纤维病变时，伴随的肌肉损伤会导致肌纤维发育不良，最终导致双折射特性显著改变^[15-16]。这使得人们可以使用偏振成像方法来研究肌肉损伤与相关疾病的关联^[17-19]。目前已有实验室利用偏振敏感光学相干层析对鸡肉组织两种变质过程进行表征^[20]，也有利用穆勒矩阵成像方法检测牛骨骼肌组织的微观结构变化^[21]。常规正交偏振探测方法可定性表征样本的双折射特性^[1,9]，但无法定量标定双折射相位差，这使得图像之间无法直接比较，也就无法用于定量研究肌肉损伤程度及其随时间演化的过程。而穆勒矩阵的偏振成像方法计算过程较为复杂，物理含义不完全明确，还不能被生物学研究广泛接受。

针对上述问题，本文提出一种针对斑马鱼肌肉结构的定量偏振成像方法。通过旋转一对始终正交的偏振片采集多张偏振图像，利用调制度计算得到每个点的双折射相位延迟量。该定量相位延迟量与光源亮度、曝光时间等无关，可以定量比较不同时间拍摄的斑马鱼肌肉形态和分布，以表征肌肉受损的程度。通过比较正常和肌肉受损的斑马鱼受精后 3~7 d 的成像，发现相同时间的野生型斑马鱼肌节部位的相位延迟量远高于肌肉损伤斑马鱼的相位延迟量。

2 方 法

2.1 定量偏振成像系统

定量偏振成像系统如图 1 所示。采用单晶发光二极管(LED)光源，中心波长为 640 nm，LED 芯片发出的光线穿透样品，由显微物镜收集后成像到图像探测器上，其中物镜选用放大倍率为 4 的奥林巴斯平场消色差物镜(RMS4X, Olympus, Japan, 数值孔径 NA 为 0.1, 焦距为 45 mm)。在入射光部分设置起偏器，在透射光部分设置检偏器，起偏器和检偏器共轴安装在电动旋转架上，通过现场可编程门阵列(FPGA)控制偏振轴取向，同时进行相机曝光采图。当采集样品明场图像时，使起偏器和检偏器的偏振轴相互平行；当检测样品双折射特性时，使起偏器和检偏器的偏振轴相互垂直，并以 $\pi/18$ 为步进量同步旋转，旋转 1 周总共采集 36 张原始图像。采用 95% 量子效率的 sCMOS(Prime

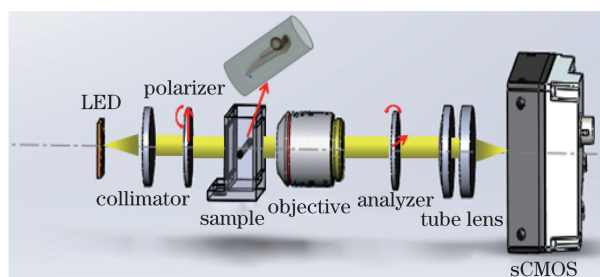


图 1 定量偏振成像装置示意图

Fig. 1 Schematic of quantitative polarization imaging setup 95BTM, PhotoMetrics, Germany) 相机拍摄。

实验进样时，样品池中的斑马鱼通过微流道进入成像系统，观测完成后可通过微流道再次进入样品池以备后续观测。为减小管道引入的像差，在探测区域采用内径为 0.8 mm 的石英玻璃管，并将玻璃管浸没在长方体水池中，在水池两侧开光学观察窗。

斑马鱼的受精卵养殖在 N-苯基硫脲溶液中(20 L 纯水, 1.2 g 海盐, 1.5 mL 0.2% 亚甲基蓝, 1.2 g N-苯基硫脲)。斑马鱼受精 10 h 后开始出现明显的形态变化，此后的 18 h 内陆续出现 30~34 对体节，配对产生的体节一半位于背侧，一半位于腹侧。体节内的部分细胞不断伸长分化为肌原细胞，肌原细胞中的肌原纤维产生各向异性的光学性质，第 3 天形态发育分化基本完成。此时测定体节内双折射参数，该参数可反映肌细胞生长发育状态^[22]。肌肉受损斑马鱼模型通过基因遗传操作的方法产生。

2.2 定量偏振成像方法

按照 2.1 节中的偏振成像方法进行观察时，入射光沿 Z 轴方向传播，光强表示为 I_0 。起偏器与 X 轴的夹角为 θ ，检偏器与 X 轴的夹角为 $(\theta + \pi/2)$ 。调整斑马鱼的姿态使得其体长方向垂直于光轴，且鱼体侧面正对光线入射方向，如图 2(a) 所示。则相机采集的单帧原始图像光强可表示为^[23]

$$G = I_0 \cdot \frac{1 - \cos(4\theta - 4\alpha)}{8} (1 - \cos \delta), \quad (1)$$

式中： α 表示双折射主轴与 X 方向的夹角； δ 表示 Y 方向偏振光与 X 方向偏振光通过样品后的相位延迟量。由于斑马鱼样品接近透明，在(1)式中没有考虑样品吸收或散射的影响，其透射率设为 1。从(1)式可知，采集的原始图像包含了样品的双折射信息，对于没有双折射特性的区域($\delta=0$)，对应的透射光强一直保持为零($G=0$)。对于肌肉组织有双折射特性的区域($\delta \neq 0$)，随着 $(\theta - \alpha)$ 的变化，光强呈

周期性变化, 总共 4 个周期。不同的 δ 值对应的光强变化幅值显著不同, 图 2(b) 给出模拟结果。实验中改变 θ 的取值, 使其等于 $n\pi/18$ ($n=0, 1, \dots, 35$), 采集对应的图像 G_n , 再通过(1)式拟合出相位延迟量 δ 。

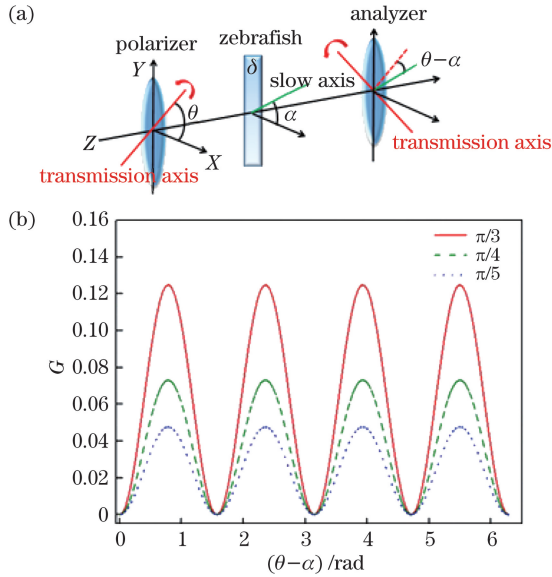


图 2 定量偏振成像方法。(a)偏振方向与光线取向示意图;(b)探测光强随正交偏振旋转角度变化的模拟计算结果

Fig. 2 Quantitative polarization imaging method. (a) Schematic of the polarization orientation and light propagation direction; (b) calculation results of detected light intensity dependent on the rotation angle of the orthogonal polarizer/analyzer

考虑到斑马鱼身体的不同部位具有不同的双折射主轴取向和等效折射率差, 因而 θ, δ 的取值均与坐标位置有关, 本文通过平均相位延迟量来评估肌肉受损程度, 定义每个肌节的相位延迟量 ϵ 为

$$\epsilon_i = \frac{1}{N} \sum_{m,n \in \Omega_i} \delta_{m,n}, \quad (2)$$

式中: Ω_i 表示第 i 个体节; m, n 表示 Ω_i 内的任意一点的坐标; N 表示 Ω_i 内的总数据点数。需要强调的是, 肌肉组织的双折射特性不仅取决于肌纤维自身的本征双折射特性, 还与肌纤维的密度有关。这里定义的肌节相位延迟量 ϵ 是二者共同作用结果的一种表象, 可反映肌肉生长发育的总体状态, 这对于发育生物学研究及药物高通量快速筛选具有一定的应用价值^[24]。

3 实验结果

斑马鱼受精后第 3 天主要形态分化已经完成,

体节、头部、胸部等在明场成像中清晰可见, 如图 3(a)所示, 其中头部和胸部透光率低, 在图像中颜色较深, 而体节部分透光率高, 且透光率在每一个体节内均匀分布。部分黑点为微流道的管壁和液体中的颗粒状杂质。图 3(b)展示了相同样品在正交偏振片旋转到不同角度 θ 时的图像。与图 3(a)对比可知仅体节部分的结构信息出现在成像结果中, 而头部、胸部、管壁、杂质等不具备双折射性质, 对成像结果无影响, 这些现象表明本文构建的成像方法对反映肌节肌肉的生长状态具有较高特异性。当改变 θ 时, 采集的图像呈周期性明暗变化。在图 3(a)中选择 2 个具有相同亮度的点 P_1 和 P_2 , 它们对应相同的透光率, 在偏振成像模式中的亮度值如图 3(c)所示, 表现出显著差异, 变化周期为旋转周期的 4 倍, 变化规律与(1)式相符。通过对(1)式进行拟合发现 P_1 和 P_2 具有相同的波动周期, 但 P_1 点的相位延迟量大于 P_2 点, 大约是后者的 3 倍, 出现这种显著差异的内在原因是尾部肌肉不如前部肌肉发达, 这表明相位延迟量 δ 可量化表示肌肉生长发育程度。通过拟合图中每个点的强度变化得到定量的相位延迟量图像, 如图 3(d)伪彩色图所示。为方便起见, 在图 3(d)中用虚线标出斑马鱼和管壁的轮廓。从图中可以明显看出, 相位延迟量图可以反映出斑马鱼的肌节结构, 不反映其他形态特征。由于肌纤维细胞的结构和排列方式是引起肌肉组织双折射特性的主要原因, 因而测定肌肉组织的双折射参数可以反映肌纤维组织的生长发育状况。严格说来, 生物组织的多次散射及光吸收也会导致光场偏振度发生改变, 但探测器接收范围对应的散射角较小, 由散射导致的偏振度降低也较小^[25]。从实验结果也可以看出, 斑马鱼头部、胸部、尾部等组织对光场偏振态的影响可以忽略, 多次散射的影响主要是使透射率降低。

对实验培育的肌肉受损型斑马鱼和同源野生型斑马鱼作对比实验, 如图 4(a)和 4(c)所示, 对应定量相位延迟量图像如图 4(b)和 4(d)所示。参考明场图像沿体节分布将被测样本划分出 25 对区域, 并分别编号。采用本文提出的定量偏振成像方法, 统计每个肌节的平均相位延迟量 ϵ , 结果如 4(e)所示。野生型斑马鱼和肌肉损伤型斑马鱼探测相位延迟量都呈现出从头部到尾部先增加再降低的趋势, 这符合斑马鱼肌肉生长发育的一般规律, 在中间肌节的肌肉含量最多。野生型斑马鱼背部在编号为 7 的体节处出现异常取值, 通过对局部延迟量分布图和高

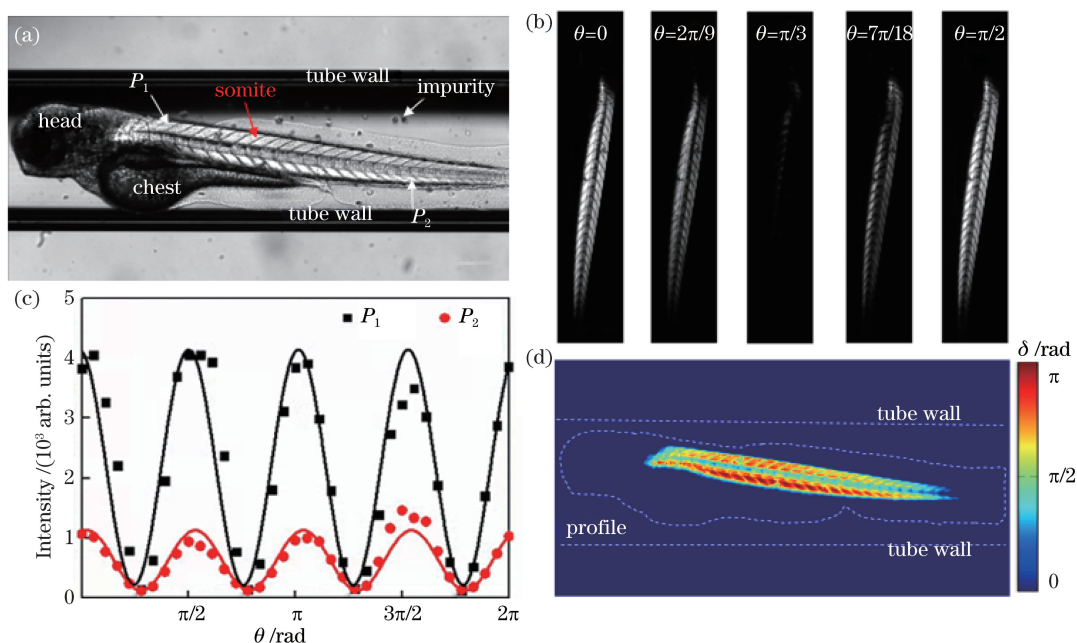


图3 斑马鱼肌肉组织定量偏振成像。(a)受精后第3天野生型斑马鱼明场图像(侧面图);(b)不同正交偏振片起偏角度下的系列斑马鱼偏振图像;(c) P_1, P_2 位置偏振图上的光强强度随着角度变化曲线及其拟合;(d)定量相位延迟量图像

Fig. 3 Quantitative polarization imaging of zebrafish muscle tissue. (a) Bright-field image of wild-type zebrafish at 3 days post-fertilization (lateral view); (b) polarization images at a serial rotating angles for the orthogonal polarizer/analyzer; (c) optical intensity at position 1 and position 2 from the serial polarization images, and the corresponding fitting curves; (d) image of quantitative phase retardance

分辨率明场成像仔细辨认发现,这一斑马鱼背部的7号体节存在轻微肌肉缺陷,这印证了参数 ϵ 可正确反映肌肉发育状态。对于肌肉受损型斑马鱼,相位延迟量 ϵ 整体取值显著低于正常斑马鱼。图4(b)和图4(d)中所有肌节的相位延迟量统计分布如图4(f)所示,野生型斑马鱼相位延迟量取值较大,且较为分散,而肌肉受损斑马鱼相位延迟量分布明显向左移动,且更加集中。野生型斑马鱼相位延迟量平均值为0.567,肌肉受损型斑马鱼相位延迟量平均值为0.2187,野生型斑马鱼延迟量平均值与肌肉受损型斑马鱼之比约为2.59,因此可用相位延迟量 δ 来定量表征斑马鱼肌肉受损的严重性。

基于本文提出的定量偏振成像方法,还可以记录斑马鱼胚胎生长过程中不同时间点的肌肉发育动态过程。图5(a)为斑马鱼第10肌节(如图4(a)、(c)中所示)相位延迟量随时间的变化,图5(c)展示了一组肌肉受损型斑马鱼胚胎,在受精后第3至7天肌肉双折射特性变化情况,作为对照,同时给出了野生型斑马鱼的变化过程,如图5(b)所示。从测试结果可以看出,实验组和对照组斑马鱼体型都随时间增长明显,野生型斑马鱼的肌肉延迟量始终稳定

保持在较高值,表明肌纤维密度基本保持不变。而肌肉受损型斑马鱼的平均相位延迟量明显低于对照组,且随时间呈下降趋势,说明随着时间的推移,肌肉损伤程度变得更加严重,肌纤维密度逐步下降。

4 结 论

针对建立斑马鱼肌肉损伤动物模型的光学成像需求,提出一种基于偏振暗场成像的双折射相位延迟量定量检测方法。在微流道系统中采用偏振暗场成像方法,可有效排除管壁、杂质、非肌肉组织等对检测结果的影响。利用正交偏振成像数据可以拟合出单个像素点的相位延迟量,统计得到的各分区延迟量平均值,可客观地反映斑马鱼的不同身体部位肌肉发育状态及随时间的变化。使用基因操作技术产生一批肌肉受损斑型斑马鱼胚胎,进行定量偏振成像检测,同时与正常野生型斑马鱼作对比,发现相位延迟量的取值及分布存在显著差异,且具有明显不同的时间演化规律,实验结果证实了本文所构建的成像方法的有效性。平均相位延迟量参数及其检测方法可用于斑马鱼肌肉疾病动物模型和相关药物筛选研究。

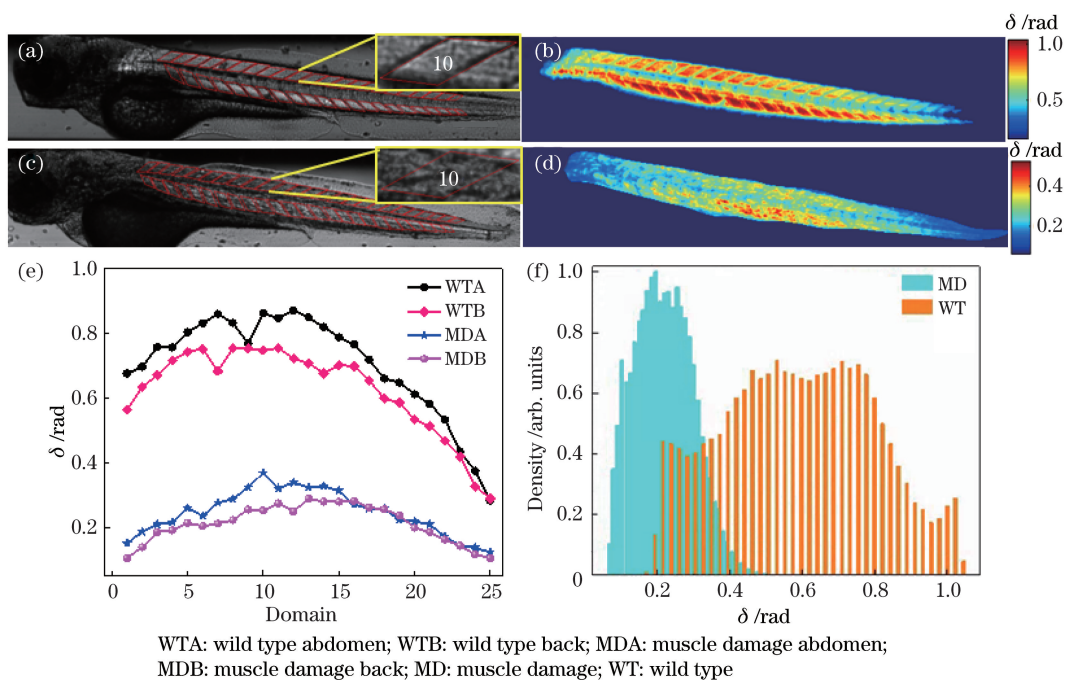


图 4 野生型与肌肉受损型斑马鱼肌节结构的成像对比。(a)受精后第 3 天的野生型斑马鱼明场图像;(b)对应(a)的相位延迟量图像;(c)受精后第 3 天的肌肉受损型斑马鱼明场图像;(d)对应(c)的相位延迟量图像;(e)野生型和肌肉损伤型斑马鱼腹部和背部每个肌节的平均相位延迟量,横轴为肌节编号;(f)斑马鱼肌节部位所有像素点的相位延迟量分布

Fig. 4 Comparison of images between wild-type and muscle-damaged zebrafish somite structures. (a) Bright field image of wild type zebrafish at 3 days post-fertilization; (b) phase retardance image corresponding to (a); (c) bright field image of muscle-damaged zebrafish at 3 days post-fertilization; (d) phase retardance image corresponding to (c); (e) average retardance of each somite along the zebrafish abdomen and back, domain represents the number of somite; (f) phase retardance distribution of every pixel for wide type and muscle-damaged zebrafish

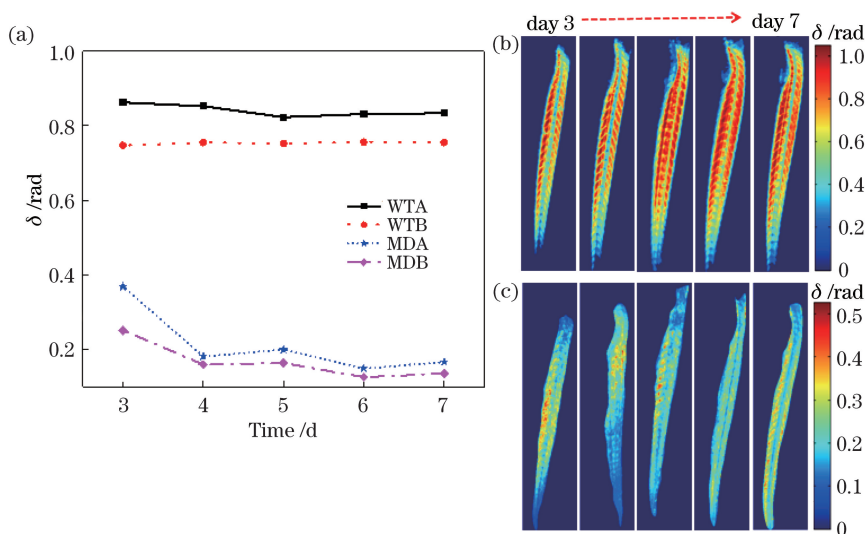


图 5 野生型斑马鱼和肌肉受损型斑马鱼第 3 天到第 7 天肌肉生长变化。(a)第 10 肌节相位延迟量随时间变化曲线图;(b)野生型斑马鱼相位延迟量随时间变化分布图;(c)肌肉受损型斑马鱼相位延迟量随时间变化分布图

Fig. 5 Muscle growth of wild-type zebrafish and muscle-damaged zebrafish from day 3 to day 7. (a) Phase retardance curves of the 10th somite dependent on time; (b) phase retardance image of wild-type zebrafish dependent on time; (c) phase retardance image of muscle-damaged zebrafish dependent on time

致谢 感谢中国科学院上海健康研究院潘巍峻课题组提供所有斑马鱼样本。

参 考 文 献

- [1] Oldenbourg R. Polarized light microscopy: principles and practice[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2013, 2013(11): 1023-1036.
- [2] Liao R, Zeng N, Jiang X Y, *et al.* Rotating linear polarization imaging technique for anisotropic tissues [J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(3): 036014.
- [3] Liao R, Zeng N, Li D Z, *et al.* Penetration depth of linear polarization imaging for two-layer anisotropic samples[J]. Applied Optics, 2011, 50(23): 4681-4687.
- [4] Alali S, Vitkin A. Polarized light imaging in biomedicine: emerging Mueller matrix methodologies for bulk tissue assessment[J]. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20(6): 061104.
- [5] Zhou J L, He H H, Chen Z H, *et al.* Modulus design multiwavelength polarization microscope for transmission Mueller matrix imaging[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(1): 016007.
- [6] Katoh K, Hammar K, Smith P J S, *et al.* Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous actin in living growth cones [J]. Molecular Biology of the Cell, 1999, 10(1): 197-210.
- [7] Phan C N K, Huynh L Q, Nguyen Q N, *et al.* Model of colposcopy using polarized light and effective early[J]. Science and Technology Development Journal, 2017, 20(K2): 96-100.
- [8] Letrado P, de Miguel I, Lamberto I, *et al.* Zebrafish: speeding up the cancer drug discovery process[J]. Cancer Research, 2018, 78(21): 6048-6058.
- [9] Mehta S B, Shribak M, Oldenbourg R. Polarized light imaging of birefringence and diattenuation at high resolution and high sensitivity[J]. Journal of Optics, 2013, 15(9): 094007.
- [10] Ghosh N, Vitkin A I. Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook[J]. Journal of Biomedical Optics, 2011, 16(11): 110801.
- [11] Gupta V, Kawahara G, Gundry S R, *et al.* The zebrafish *dag1* mutant: a novel genetic model for dystroglycanopathies[J]. Human Molecular Genetics, 2011, 20(9): 1712-1725.
- [12] Bassett D I, Currie P D. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy[J]. Human Molecular Genetics, 2003, 12(suppl_2): R265-R270.
- [13] Gibbs E M, Horststick E J, Dowling J J. Swimming into prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies [J]. The FEBS Journal, 2013, 280(17): 4187-4197.
- [14] Berger J, Berger S, Hall T E, *et al.* Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the duchenne muscular dystrophy pathology[J]. Neuromuscular Disorders, 2010, 20(12): 826-832.
- [15] Felsenfeld A L, Walker C, Westerfield M, *et al.* Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish [J]. Development, 1990, 108(3): 443-459.
- [16] Bassett D I, Bryson-Richardson R J, Daggett D F, *et al.* Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo[J]. Development, 2003, 130(23): 5851-5860.
- [17] Jacques S L, Roman J R, Lee K. Imaging superficial tissues with polarized light[J]. Lasers in Surgery and Medicine, 2000, 26(2): 119-129.
- [18] Smith L L, Beggs A H, Gupta V A. Analysis of skeletal muscle defects in larval zebrafish by birefringence and touch-evoked escape response assays [J]. Journal of Visualized Experiments, 2013(82): e50925.
- [19] Berger J, Sztal T, Currie P D. Quantification of birefringence readily measures the level of muscle damage in zebrafish[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 423(4): 785-788.
- [20] Yang L F, Zeng N, Chen D S. Characterization of dehydration and proteolysis process of chicken muscle using polarization-sensitive optical coherence tomography[J]. Chinese Journal of Lasers, 2011, 38(12): 1204002.
阳利锋, 曾楠, 陈东胜. 偏振敏感光学相干层析对鸡肉组织两种变质过程的表征[J]. 中国激光, 2011, 38(12): 1204002.
- [21] He H H, He C, Chang J T, *et al.* Monitoring microstructural variations of fresh skeletal muscle tissues by Mueller matrix imaging[J]. Journal of Biophotonics, 2017, 10(5): 664-673.
- [22] Li M, Hromowyk K J, Amacher S L, *et al.* Muscular dystrophy modeling in zebrafish[M]// William Detrich III H, Westerfield M, Zon L I. Models and chemical screens. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017: 347-380.
- [23] Lechocinski N, Breugnot S. Fiber orientation measurement using polarization imaging[J]. Journal of Cosmetic Science, 2011, 62(2): 85-100.
- [24] Liu L F, Yang G, Liu S P, *et al.* High-throughput imaging of zebrafish embryos using a linear-CCD-

- based flow imaging system[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(12): 5651-5662.
- [25] Wang Y F, Huang Y, Zeng N, *et al.* Study on the influence of optical absorption on polarization characterization of tissues[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(12): 121609.