

活体小鼠耳朵的拉曼成像方法研究

李雪^{1,2} 高国明³ 牛丽媛^{1,2} 林漫漫^{1,2} 覃宗定^{1,2} 刘军贤¹ 姚辉璐^{* 2}

¹(广西师范大学物理科学与技术学院, 桂林 541004) ²(广西科学院生物物理实验室, 南宁 530021)

³(广西师范大学计算机科学与信息工程学院, 桂林 541004)

摘要 利用扫描技术获取活体小鼠耳朵组织不同深度的微区拉曼光谱, 选取分别归属于血糖、脂类、血红蛋白、蛋白质分子结构的物质的特征谱带 1125, 1300, 1549 和 1660 cm^{-1} 进行峰面积计算, 利用这些数据重建二维三维拉曼光谱图像。图像清晰显示了不同物质在活体组织中空间分布情况。实验表明, 活体拉曼成像技术可以成为活体研究的新手段。

关键词 光谱学; 拉曼; 成像; 活体

1 引言

近年, 光学成像技术发展迅速。光学成像不仅具有对活体组织无损伤、非侵入、无电磁辐射等特点, 还可用于活体生物组织的显微结构分析、特性参数测量及疾病的诊断, 所以光学成像技术越来越受到生物与医学领域的广泛关注^[1]。目前应用较广泛的光学成像技术有: 荧光成像、漫反射成像、近红外光谱成像、光声成像、近场光学显微成像、二次谐波成像及 OTC 成像等。同这些技术相比, 拉曼光谱技术拥有独特的优势: 很强的分子特异性, 无需对样品进行标记, 制样简单, 对样品无损伤, 尤其在对含水量大的样品的检测上优势明显^[2]。拉曼光谱特征峰的位置、强度和线宽可提供构成物质分子振动、转动方面的信息, 从而反映出不同的化学键和官能团, 因此拉曼光谱已成为研究物质分子结构的有效手段^[3]。

拉曼光谱成像技术是拉曼光谱技术和成像技术的有效结合, 其中的一种方法是在层面上进行逐点扫描, 收集各点拉曼光谱, 根据光谱信息进行图像重构, 最终获得拉曼图像^[4]。拉曼光谱成像技术可以重构具有三维立体结构的图像^[4], 能够在空间上对目标进行分析和识别。拉曼扫描成像已经在病理学、药理学、地质学、公安法学等领域广泛应用^[5~10]。最近, 拉曼光谱成像已经开始用于复杂生物样品如活细胞、生物组织的化学分析, 并监控细胞、亚细胞水平的化学组成。活体组织中一般都是表皮成像, 对活体组织进行三维成像尚未见报道。

本研究以活体小鼠为实验模型, 通过构建激光拉曼扫描成像系统对脱毛后的活体小鼠耳朵进行拉曼扫描, 依据不同层面的扫描数据进行可视化成像, 直接得到血红蛋白分子结构的物质、蛋白质分子结构的物质、脂类分子结构的物质的直观二维空间分布。通过调节激光聚焦深度, 获得了组织中不同深度层面的物质分布信息, 将各层次信息叠加重构, 得到了三维立体图像, 实验结果以三维立体形式形象地显示出了不同物质在小鼠耳组织中空间的分布情况。

2 实验部分

2.1 样品准备

实验动物为 3~5 周龄的 SPF 级 KM 雄性小鼠, 重量在 15~25 g 之间, 购于广西医科大学动物实验中心。用 4% 的水合氯醛 (0.1 L/10 g) 腹腔注射麻醉, 并用脱毛膏将小鼠耳朵进行脱毛处理。

2.2 实验装置

本实验所采用的拉曼成像系统实验装置如图 1 所示, 实验小鼠麻醉后固定在载物台上, 将小鼠耳朵贴在载玻片上, 半导体激光器 (DL740-201S-Sanyo Laser Diode) 产生一束波长 780 nm 的激光, 滤波后经

2012-02-23 收稿; 2012-04-12 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 60868002, 31060128) 和广西自然科学基金 (Nos. 2012GXNSFFA060008, 2011GXNSFA018143, 0731013) 资助

* E-mail: yaohl@163.net

过一对扫描透镜(SM)导入倒置显微镜(TE2000-U, Nikon)的物镜($NA = 1.3, 100 \times$)中,聚焦到小鼠耳朵上,激光功率约为 5 mW,拉曼散射信号被聚焦进光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, 600 g/mm)的狭缝入口处。光谱仪耦合到电荷耦合器件 CCD(PIXIS 100BR, Princeton Instruments)上,通过 CCD 接受拉曼信号。为了获得极低的暗电流,用液氮将 CCD 冷却到 $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ 。通过数字/模拟(D/A)转换器控制扫描透镜(SM)在 x 轴和 y 轴方向移动,使光斑精确地定位在所需要的位置,光斑大小 $2 \text{ } \mu\text{m}$ 。为了便于观察,本实验使用 LED 灯(560 nm)照射小鼠耳朵,并通过 CCD 摄像机拍照。

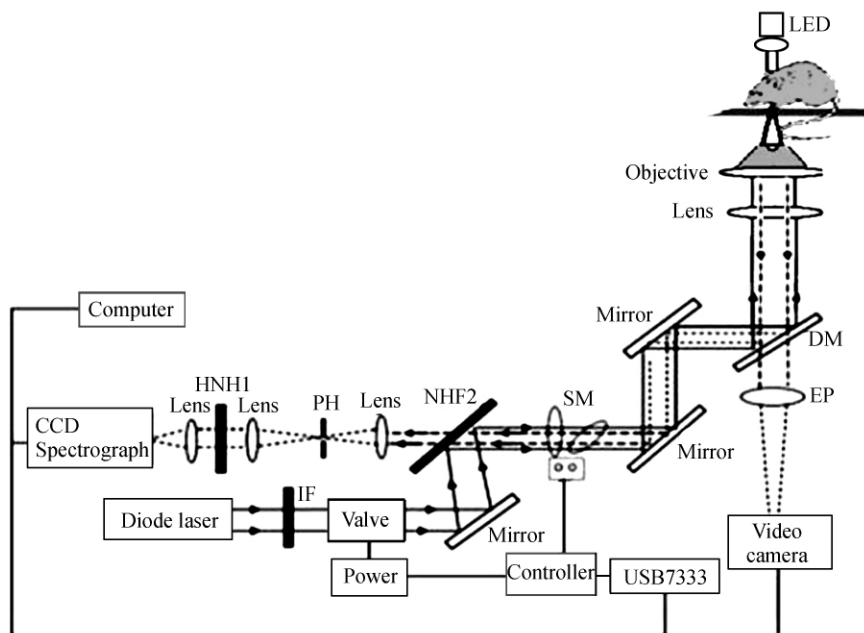


图 1 实验装置图

Fig.1 Schematic of experimental arrangement

2.3 拉曼逐点扫描的实现过程

通过自编 VB 程序控制 D/A 转换器将计算机的数字信号转换为电压信号,并将其放大,驱动扫描对镜移动,从而实现控制激光光斑移动。由于光斑每次移动的距离是通过改变电压值实现的,所以可以很精确地控制步长,而且重复精度很高^[8]。

根据扫描范围的需要,设定好 x 轴和 y 轴方向的扫描距离,启动程序打开 WinSpec32 软件(光谱仪自带)对扫描的每个点进行光谱的收集。在程序中设定光斑每次移动步长为 $2 \text{ } \mu\text{m}$,并设定好收集光谱积分时间,从而实现样品的全自动扫描。三维成像的部分是在二维成像的基础上,手动调节激光聚焦深度(即 z 轴方向的步长),实现对样品的逐层扫描,各层的光谱收集方法与二维成像收集光谱方法相同。

3 结果与讨论

3.1 拉曼光谱成像原理

拉曼光谱是拉曼散射所形成的光波谱带,不同的化学键在拉曼光谱中对应了不同的波数区域。物质特殊的化学键在拉曼光谱中表现的峰值称为这种物质的特征峰。生物物质分子中含有许多特殊的化学键或者官能团,这些化学键或官能团的存在与否,可以用于判断该区域是否含有这种物质,且这种物质的含量的多少也可以由这种化学键在单位面积内的含量表示。特征峰的峰面积或峰高可以反映物质含量。在选定的组织区域进行逐点扫描收集各个微区的拉曼光谱,抽取特征峰进行峰面积计算,根据归一化的结果即可实现图像重构。表 1 为拉曼光谱主要特征峰的峰值归属表^[10~14]。

3.2 二维成像

应用上述的成像方法,分别对组织中的血红蛋白分子、蛋白质分子及脂类分子的特征谱带 1549 , 1660 和 1300 cm^{-1} 进行抽取、计算,然后成像。扫描步长为 $2 \text{ } \mu\text{m}$,扫描面积为 $40 \text{ } \mu\text{m} \times 34 \text{ } \mu\text{m}$,成像图由

340 (20 × 17) 幅图谱组成, 每个微区图谱的积分时间为 10 s。如图 2 所示。

表 1 拉曼光谱特征峰归属一览表

Table 1 Peak assignments for Raman spectra

峰位 Band (cm^{-1})	主要归属 Major assignment	峰位 Band (cm^{-1})	主要归属 Major assignment
721	Adenine (C—C , ring mode)	1264	=C—H in plane bending (lipid)
754	Vibration breathing mode of Porphyrin	1300	CH ₂ wagging (lipid)
853	Ring breathing mode of tyrosine and C—C stretch of proline ring	1340	CH bending of the aliphatic chain of proteins
1001	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine	1446	CH ₂ bending mode of proteins
1078	C—C or C—O stretch (lipid) , C—C or PO ₂ stretch (nucleic acids)	1549	Vibration breathing mode of Porphyrin
1125	CO stretching	1660	Amide I [ν (C=O)]
1170	C—H in-plane bending mode of tyrosine		

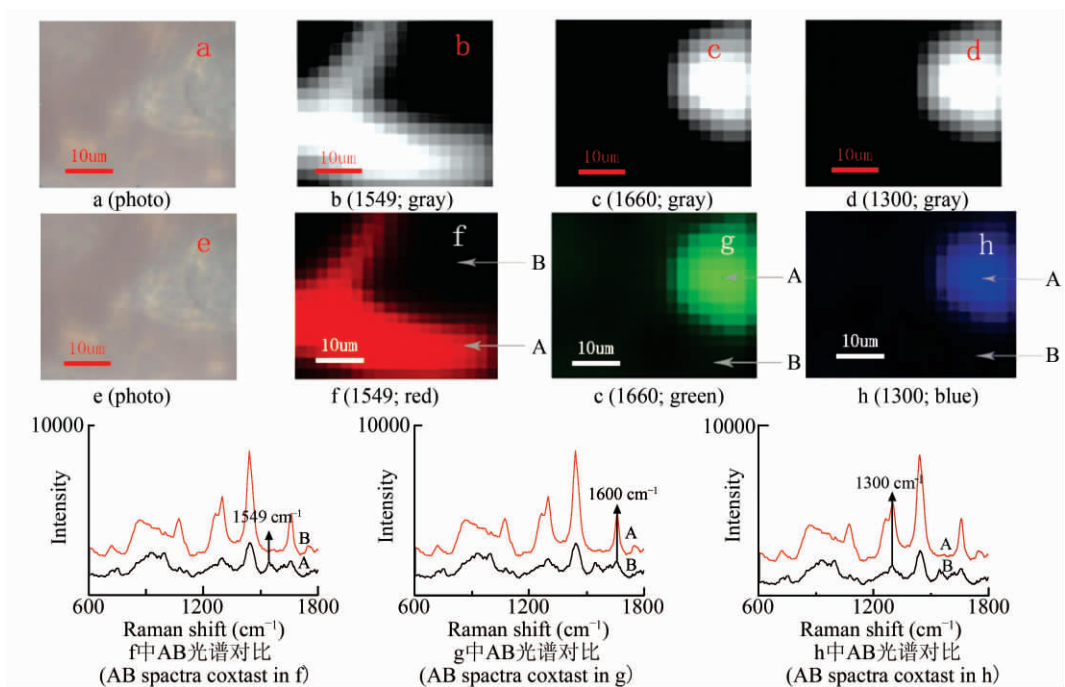


图 2 二维灰度成像、单彩色成像及各物质光谱对比

Fig. 2 Two order gray imaging, single color imaging and Raman spectrum contrast

图 2 中 a, e 是显微镜下的光学图像, 图中深色的部分为血管的位置。b, c, d 和 f, g, h 分别对应于不同特征峰的灰度和伪彩图。从图 2 中可清晰看到各种物质的分布。图 2f 是 1549 cm^{-1} 特征峰的拉曼图像, 1549 cm^{-1} 归属于卟啉呼吸振动模式, 是血红蛋白的标志特征峰; 光谱 A (红色亮点) 中血红蛋白特征谱峰 1549 cm^{-1} 清晰可见, 但在 f 点 (暗点) 光谱中观察不到 1549 cm^{-1} 特征峰的存在, 可见亮点确实比暗点位置含有的血红蛋白更多一些, 而暗点几乎不含有血红蛋白峰, 反映了血红蛋白分子结构的物质的分布情况。血红蛋白大量存在血液中, 而在血液以外基本没有, 因此从 1549 cm^{-1} 特征峰的分布可以判断出血管的大致位置。对比图 2f 与图 2a 可见, 与血红蛋白特征谱成像有很好的对应, 更进一步证明了成像的可靠性。图 2g 是 1660 cm^{-1} 特征峰拉曼图像, 特征峰 1660 cm^{-1} 归属蛋白酰胺 I^[2] 表征了蛋白质; 蛋白酰胺 I 这类分子结构的蛋白质物质大量分布于血管外部的组织中, 而在血管内部血液中很少。图 2h 是 1300 cm^{-1} 特征峰拉曼图, 1300 cm^{-1} 归属于脂类 C—H 非平面摇摆振动, 表征脂类物质在组织中的分布; 这类分子结构的脂类物质也集中分布在血管的外部, 血液中几乎不存在, 这与蛋白酰胺 I 分子结构的蛋白质物质的分布情况类似。

但是图 2 中只表现出单一物质, 将 2 种或者 3 种物质同时表示在一幅图像中, 对比性更佳。在图 3

中,仍然采用与图 2 相同的光谱数据,使用 3 个特征峰 1549、1300 和 1125 cm^{-1} ,其中 1125 cm^{-1} 为血糖特征峰。图像 3a 为 1125 cm^{-1} 特征峰的灰度图像;图 3b ~ 3d 为 2 种特征峰数据在一起显示的双色图;图 3e 为 3 种特征峰三色图,由于 1125 cm^{-1} 特征峰图像(图 3a) 范围比 1549 cm^{-1} 大(图 2b),所以会在图 3d 与图 3e 出现两种物质重叠覆盖的现象。

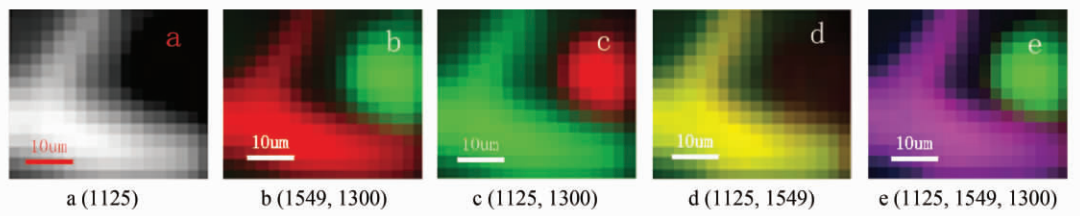


图 3 二维多彩色成像,图像面积: $40 \mu\text{m} \times 34 \mu\text{m}$,像素点: 20×17 ,积分时间: 10 s/光谱

Fig. 3 Two dimension (2D) multi-color imaging, every Image area $40 \mu\text{m} \times 34 \mu\text{m}$, 20×17 pixels, integration time: 10 s/spectrum

单一峰值可能无法实现所要的结果。例如,需要得到血管壁分布图,在血管水平切面上,血管通常表现为两条线。但是血管壁的特征峰很难寻找,然而血糖的特征峰却很明显,血糖是存在于与血液中和血管周围的物质,如果使用血糖成像数据与血液中血红蛋白成像数据的比值进行成像,就能够清晰呈现出血管位置。图 4 为两次实验的 1125 和 1549 cm^{-1} 两个特征峰的灰度成像及灰度图像数据比值成像。由于仅呈现血管壁,比值范围选取 1 ~ 3 内,范围之外不选取,然后对得到的数据进行归一化并放大至 0 ~ 255 灰度图像范围。

3.3 三维成像

三维成像是二维成像的扩展,包括普通三维和超三维,普通三维成像仅仅是指勾画出空间中物体的形状,而超三维成像不仅要呈现出物体的形状,也要呈现出物体在各点的密度。Matlab 中 mesh 函数可以实现物体形状勾画,而 slice 函数可以对物体表达矩阵进行超三维(四维)成像。普通三维和超三维成像第一步都是将二维成像中各个层次的矩阵按照顺序存放在三维矩阵中。之后,普通三维成像的原理是将某点所有高度中最大值所在高度保存为新的矩阵,带入 mesh 函数来绘制,而超三维则是直接使用 slice 函数对组合三维矩阵进行绘制。

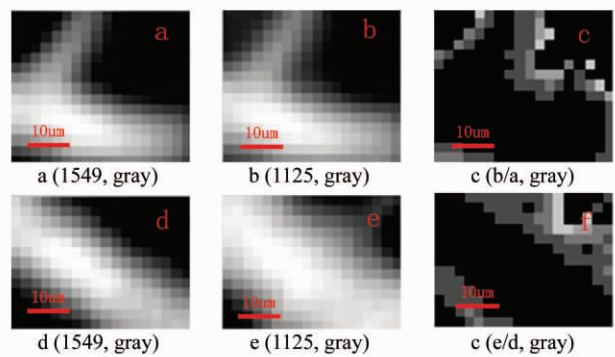


图 4 两次实验 1125 与 1549 比值成像,图像 a ~ c 面积: $40 \mu\text{m} \times 34 \mu\text{m}$,像素点: 20×17 ,积分时间: 10 s/光谱,图像 d ~ f 面积: $40 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$,像素点: 20×15 ,积分时间: 5 s/光谱

Fig. 4 Two experiment ratio imaging by 1125 and 1549

image a - c: Image area $40 \mu\text{m} \times 34 \mu\text{m}$, 20×17 pixels, integration time: 10 s/spectrum; image d - f: Image area $40 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$, 20×15 pixels, integration time: 5 s/spectrum image.

图 5 是根据同一次实验中获得的四层拉曼扫描数据做出的血红蛋白分子结构物质的三维立体图像。图 a ~ d 为从上到下每层的光学图;图 e ~ h 为图 a ~ d 相应图像的 1549 cm^{-1} 特征峰的伪彩像;红色区域为血红蛋白分子结构物质的分布, I 到 l 分别为该四层数据的超三维成像,包括立体图、切面图、俯视图和侧视图。从图 5 可以观察到颜色的变化: 由绿色逐渐过渡到淡蓝色直到深蓝色。这是由于 1549 cm^{-1} 峰值强度的变化引起的,图中浅绿色的部表示含有较多的血红蛋白分子结构的物质,浅蓝色表示含有极少的这种物质,深蓝色表示不含有这种物质,这基本上反映出了血红蛋白分子在组织中的分布情况。图 5 的 m ~ o 为普通三维成像,是 1549 cm^{-1} 峰值强度变化的反向图,图中间的蓝色部分呈现出凹槽的形状,空缺的部分恰是血红蛋白分子分布的区域。可以形象地表达出血红蛋白分子结构的物质的分布形态。从这些三维图像中,可以很清晰地从各个角度看到血红蛋白分子结构物质的在活体小鼠耳朵中的空间分布情况。

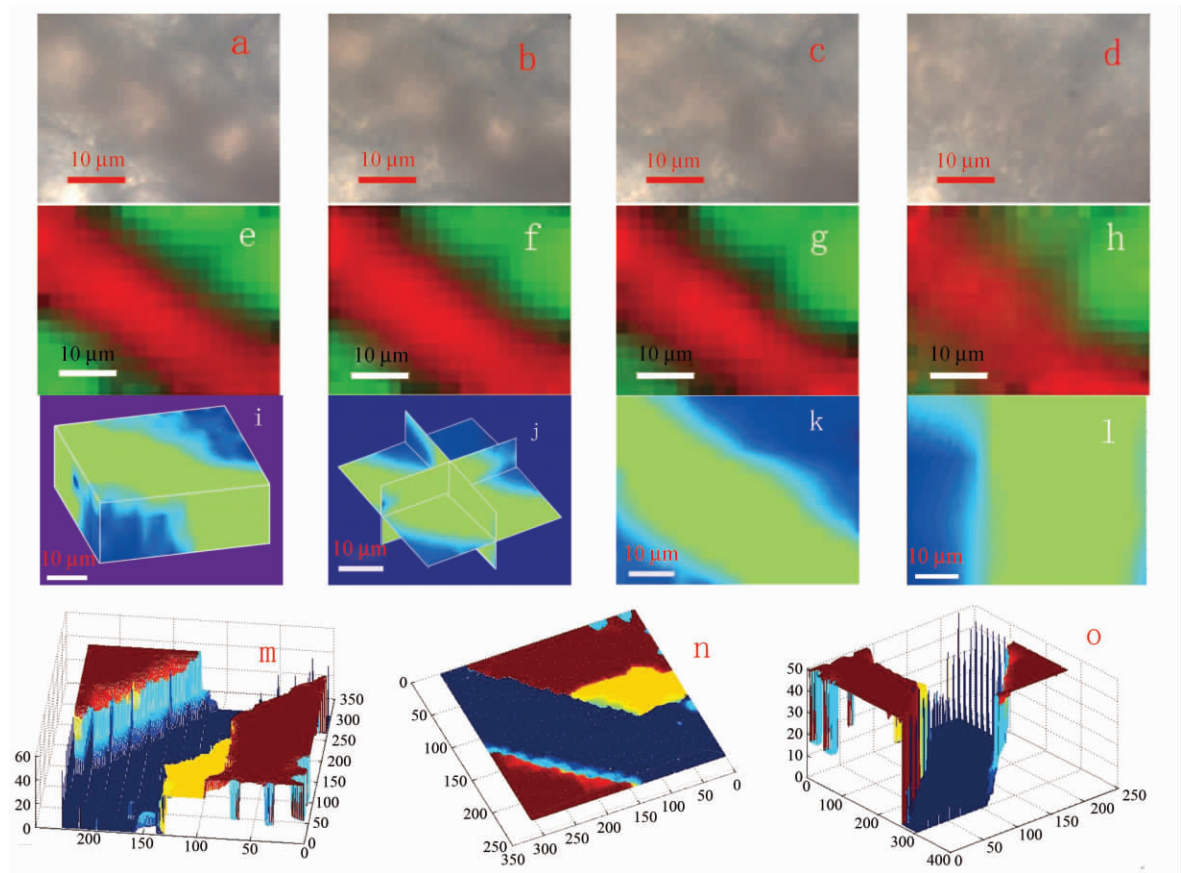


图5 三维彩色成像 扫描范围: $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$, 像素点: $20 \times 15 \times 4$ 积分时间: 5 s/光谱。图 a ~ d 为每层的拍照图, 图像 e ~ f 为每层的 $1549\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰的成像, 图像 i ~ l 为 $1549\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰的超三维成像, (i) 三维立体图 (j) 三维切面图; (k) 三维俯视图; (l) 三维侧视图。图像 m ~ o 为 $1549\ \text{cm}^{-1}$ 的反向普通三维成像。(m) 三维立体图; (n) 三维俯视图; (o) 三维侧视图。

Fig. 5 Three dimension (3D) color imaging, image area $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$, $20 \times 17 \times 4$ pixels, integration time: 5 s/spectrum. a - d: optical photo (e) - (f): every layer image of $1549\ \text{cm}^{-1}$ (i) - (l): 3D image of $1549\ \text{cm}^{-1}$, (i) 3D solid image, (j) 3D section image (k) 3D image look down (l) 3D image look from flank (m) - (o): 3D reverse image of $1549\ \text{cm}^{-1}$. (m) 3D solid image, (l) 3D image look from flank (o) 3D image look down.

4 结 论

实验表明,拉曼成像可以直接显示活体组织中的各种物质分子的含量及分布,免去了解剖等样品准备的繁杂过程,具有非破坏性、操作简单的优点,为活体组织的研究提供一种新方法。随着系统的不断改进,如果提高系统的时间和空间分辨率,拉曼成像将在生物研究领域发挥更广泛更重要的作用,为医学诊断提供更可靠、更便捷的研究手段。

References

- 1 ZHANG Zheng-Xi. *Biomedical Photonics New Technology and Application*. Beijing: Science Press., 2008: 73
张镇西. 生物医学光子学新技术及应用. 北京: 科学出版社, 2008: 73
- 2 Smith J, Kendall C, Sammon A, Christie-Brown J, Stone N. *Techno Cancer Res Treat.*, 2003, 2(4): 327 - 329
- 3 Yao H, Tao Z, Ai M, Peng L, Wang G, He B, Li Y. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 50(2): 193 - 197
- 4 JIANG Yang, REN Bin, TIAN Zhong-Qun. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(5): 1080 - 1090
江洋, 任斌, 田中群. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(5): 1080 - 1090
- 5 Larraona-Puy M, Ghita A, Zoladek A, Perkins W, Varma S, Leach IH, Koloydenko AA, Williams H, Notingher I. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(5): 054031-1-9

