

生物医学光子学

Biomedical Photonics

生物医学信息工程教育部重点实验室

张镇西

生命科学与技术学院

生物医学分析技术与仪器研究所

The Institute of Biomedical Analytical Technology & Instrumentation

The School of Life Science & Technology

Xi'an Jiaotong University

2012年9月6日



第4章 光子技术在生物医学领域的新发展即应用

4.1 心脏光标测技术

荧光探针、光学系统、光源和探测器的不断完善和发展使荧光成像技术得到快速发展，并在生物医学领域得到广泛应用。

光学标测技术是指通过荧光染料对细胞进行标记，然后通过相应波长的激发光照射样品。样品被激发后，荧光分子吸收一个光子，从基态跃迁到激发态，经过能量弛豫后，发射一个长波光光子回到基态，依赖这种方式就可以成像并进行测量得到所需要的信息。

光学标测技术实现了高分辨率下组织或细胞膜电位、 Ca^{2+} 浓度等生理信息的实时检测。



第4章第1节心脏光标测技术

认识和了解细胞膜电活动为生理学家从微观领域揭示生命现象的奥秘，探索疾病的发生机制，治疗诸如心脑血管、神经障碍等疾病提供了重要的依据。

运用细胞内电极记录或膜片钳记录技术,尤其是结合分子生物学的方法,对心脏细胞膜离子通道的生物物理特性、通道结构与功能的关系等都有了深入的认识。

但是,单纯凭借这类研究技术,很难了解在细胞间电偶联状态下心脏电活动的整体行为。因此,传统的手段已无法满足当前研究的需要,基于电压敏感染料的膜电位光学标测方法自问世以来得到了迅速发展并在实际研究中发挥着越来越重要的作用。该技术的优势主要体现在: 1) 可以多位点同步记录细胞膜电活动, 动态显示膜电位的传导过程; 2) 具有高的时间和空间分辨率, 时间分辨可达几十微秒, 空间分辨可达数微米; 3) 具有无创性, 可有效避免接触型测量中电极对细胞膜的机械损伤; 4) 避免外部电磁场干扰, 可为心脏电除颤等机理研究提供可能。



4.1.1 基本原理

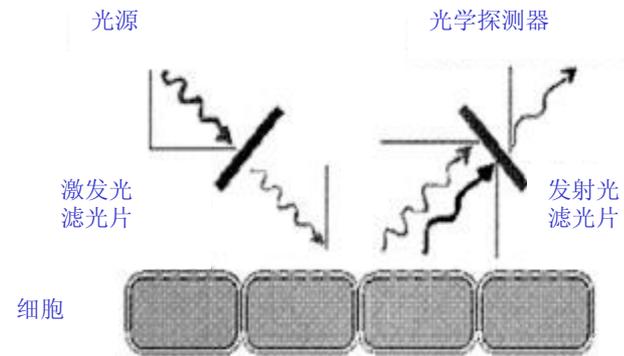


图4-1光标测机理

光学方法记录细胞跨膜电位是基于电压敏感性荧光染料的使用。该技术的基本原理是：将电压敏感染料（Voltage - Sensitive Dyes, VSDs, 又称分子探针）灌注于待观测的细胞或组织，即待测物内（称为染色）。然后，用激发光（excitation light）照射待测物表面（图4-1），当细胞膜电位改变时（ ΔV_m ），染料自身的荧光特性或吸光特性能够跟随局部电场的变化而改变，且这种变化与膜电位的改变呈近似线性关系。由于发射光（emission light）波长远离激发光波长，因此，可利用光学滤光片，如二向色镜滤除待测物上的激发光后，将发射的荧光信号经探测器接收并利用等时图、等势图等手段分析、成像。



4.1.1 基本原理

电压敏感染料可以感受到局部电场的变化，但是，染料具有特异性和敏感性，不同研究对象具有不同染色效果。电压敏感染料又称为分子探针 (molecular probe) 或光学探针 (optical probe)。它们能够随着局部电场的变化改变染料自身的荧光特性或吸光特性，且这种变化与电极记录到的膜电位变化呈线性关系。

目前所发现的电压敏感染料多达2000多种，它们可按照自身光学特性变化的类型或染料对电场变化响应的速度快慢来分类。前者分为吸光性、光折射性和荧光特性染料，后者分为快反应和慢反应染料。在对神经系统、心肌细胞的电生理研究中多使用快反应染料，其中包括产生荧光变化的 di-8-ANEPPS、di-4-ANEPPS、RH421 染料和吸光性变化的染料 RH155 等。



4.1.1 基本原理

由于电压敏感染料具有特异性和敏感性，对不同的研究对象可能产生不同的染色效果，因此，实验前要根据所准备的材料进行染料的筛选。

染料的选择和使用应考虑：

- 1) 光强的相对变化率。在记录单细胞微观特性时，被测信号一般都很小，因此，应尽量选择荧光或吸光强度相对变化率 ($\Delta F/F$ 或 $\Delta A/A$) 大的染料，以提高记录系统信噪比；
- 2) 染料的内化 (internalization)。一部分镶嵌在细胞膜表面的染料分子会逐渐进入细胞内部造成荧光信号的衰减。研究证实内化过程与染料的类型有关。烷基链 (alkyl chains) 长的染料内化过程慢，因此 di-8-ANEPPS (8个碳原子) 较 di-4-ANEPPS (4个碳原子) 染料性能优良。



4.1.1 基本原理

3) 染料的毒副作用。电压敏感染料对被染材料会产生药理性毒副作用。在光强较大时，除了伴有光动力学损伤和光毒性作用外，还会造成被染物质本身电活动的改变。如对心肌细胞，用 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 的光强照射1分钟将引起细胞逐步除极，动作电位幅度衰减，后除极现象甚至触发激动的产生，直至细胞的死亡。实验显示染料RH421、di-8-ANEPPS和di-4-ANEPPS会增加心肌细胞的收缩而RH-414则会引起血管的收缩。与吸光性染料相比，荧光染料都具有潜在的光毒性。光强越大，毒副作用越明显。且内化的染料分子会加剧这种毒副作用。



4.1.1 基本原理

目前对染料毒副作用的机制还不十分清楚。但有资料显示电压敏感染料可能与细胞膜电压门控通道直接作用，改变了这些通道的电导和时间依从关系，从而改变了细胞正常的生理特性。因此，应尽量选择毒副作用较小的染料，且在不影响系统信噪比的情况下，注意控制染料浓度和曝光时间。



4.1.1 基本原理

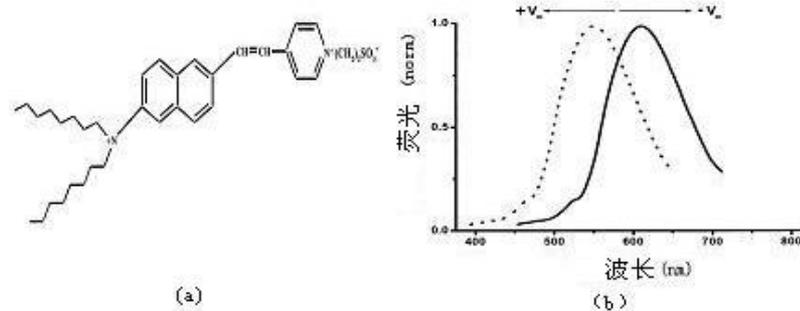
用于心脏电生理研究的染料应具有以下特点:

- ①能够被快速吸收,并且有很强的光子发射 (**photon emission**) 效能;
- ②激发光和发射光的光谱可以很好的分离;
- ③光漂白过程较慢;
- ④可以被反复激发 (**excitation**) 并发射 (**emission**) 荧光, 便于记录。

目前, 在心脏的光学标测实验研究中常用**di-8-ANEPPS** (8个碳原子) 和**di-4-ANEPPS** (4个碳原子) 作为分子探针。这种染料对电场变化响应速度快, 属快反应染料。



4.1.1 基本原理



4-2染料di-8-ANEPPS的结构 (a) 及细胞除极过程中di-8-ANEPPS的光谱迁移 (b)

图4-2为电压敏感染料di-8-ANEPPS的分子结构 ((a)) 及细胞除极过程中染料的光谱迁移 ((b)) 。

由于这类染料呈两性分子结构，使其易于嵌入到细胞膜的磷脂双分子层上，含有+ N 的一端朝细胞内部排列。当细胞除极化时，细胞膜与染料分子相互作用，细胞膜内侧和外侧的染料分子重新排列和旋转。

于是，当膜电位由 $-V_m$ 变化到 $+V_m$ 时，染料的结构由于电场力的作用而改变，造成光谱向左侧的短波长区域迁移（即蓝移）（图中虚线），从而产生荧光强度的变化。荧光光谱迁移越大，相同膜电位下光强变化越明显。



4.1.1 基本原理

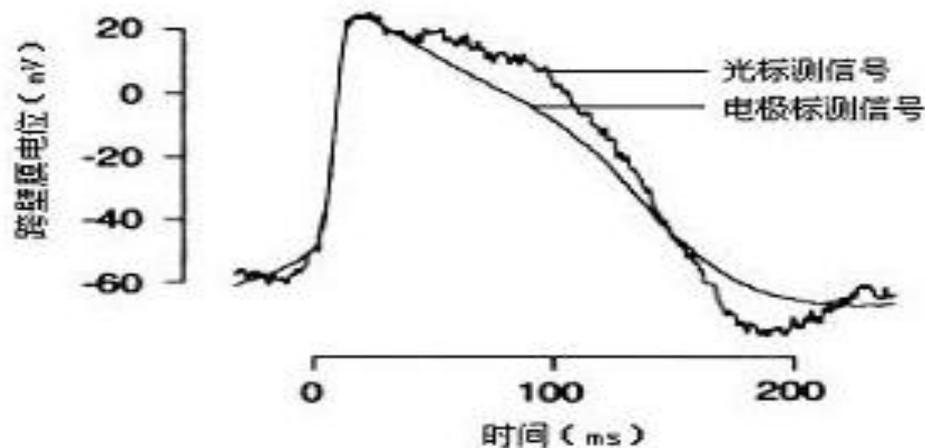


图4-3为分别采用光学标测和玻璃微电极记录到的动作电位。可以看到，两者具有较好的一致性，但光标测信号由于受运动伪迹的影响，复极化时噪声相对偏大。此外，光标测记录动作电位的幅度仅为荧光强度的相对值，因此不能用电压单位mV表示。



4.1.2 系统结构

光标测系统主要包括光路系统、光电探测系统、电路系统和计算机处理接收系统。图4-4为光学标测系统通常采用的结构形式。

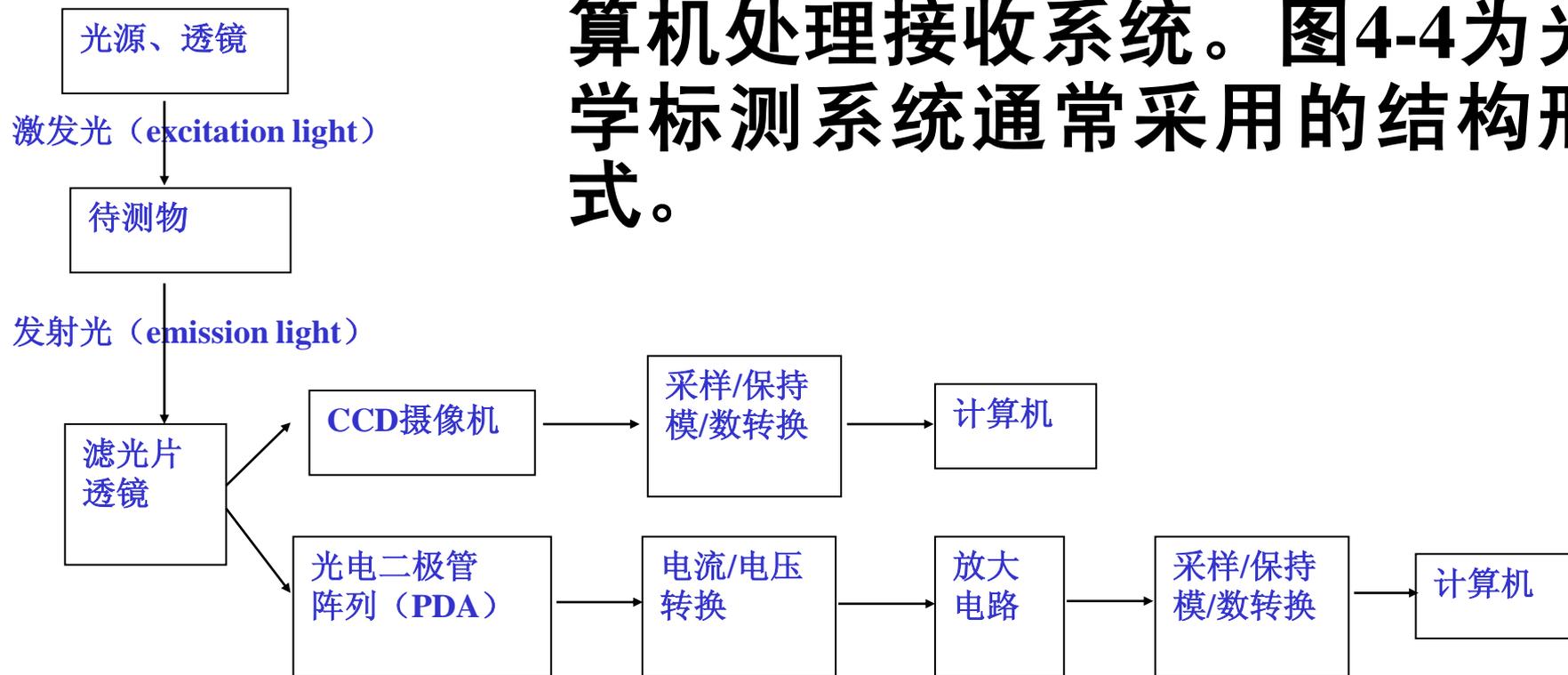


图4-4 光学标测系统的一般结构



4.1.2 系统结构

1 光路系统

光路系统的主要作用是获得尽量大的荧光信号。它包括光源、显微镜、滤光片、透镜等。光源和显微镜会影响被测信号的大小，同时光源的稳定性也是决定系统噪声的因素之一。钨灯、氙弧灯、激光是常用的光源。钨灯在供电电源纹波小时，可得到非常稳定的输出光。而弧光灯产生的光强大，150W的氙弧灯产生的光强是钨灯的2到3倍。因此，如果电源纹波小，100-250W的氙弧灯可产生足够的能量激发目前常用的电压敏感染料获得测量跨膜电位所需的信噪比。激光由于其稳定性好、质量高在系统设计中也得广泛使用。

4.1.2 系统结构

2 光电探测器

电荷耦合器件 CCD (Charge Coupled Device) 和光电二极管阵列 PDA (photodiode arrays) 目前作为主要的光电探测器用于电压敏感染料的跨膜电位标测。在选择光电探测器时除关注时空分辨率外, 还应特别考虑量子效率 QE (quantum efficiency), 即光子转换为电子的效率。因为系统信噪比与 QE 的平方根呈正比, QE 越大, 信噪比越高。

CCD 是一种固体摄像器件, 它依据时钟脉冲的电压作用, 应用电荷耦合效应, 利用少数载流子的注入、存贮和转移过程, 在其内部实现扫描后获取图像信息。目前 CCD 和放大器常集成在一块硅片上, 固定于摄像机或数码相机镜头后, 具有摄像、电荷转移、前置放大和输出等功能。通常 CCD 的像素为几微米大小, 具有很高的空间分辨率。并且在常见电压敏感染料激发荧光的波长范围内 (600-700nm), QE 为 40% 或更大, 对薄背光 (thin back-illuminated) CCD, 在 600nm 处 QE 可达 90%。但由于像素尺寸小, 在微观测量时每个探测点接收到的光子数量少, 因此, CCD 的信噪比并不很高。此外, CCD 数据的读出速率慢, 即便是帧扫描速率为 2KHz 的 CCD, 也不足以在亚细胞水平上捕获兴奋传导特性的详细信息, 因此, 一定程度上限制了 CCD 在微观电兴奋传导特性检测中的应用。CCD 更适合于整个组织或器官兴奋的宏观成像, 因为此时信号较大, 电兴奋持续时间相对较长。

4.1.2 系统结构

滤光片

透镜光电二极管

阵列 (PDA) 电流/电压

转换放大

电路采样/保持

模/数转换计算机CCD摄像机采样/保持

模/数转换计算机光源、透镜待测物激发光 (excitation light) 发射光 (emission light) 图5-4 光学标测系统的一般结构

PDA在常见电压敏感染料激发荧光的波长范围内, QE可达80%。PDA具有很大的动态范围, 可测量 $10^{-13}W/cm^2$ 到 $10^{-1}W/cm^2$ 范围内的光强。PDA的响应速度非常快, 可达皮秒级, 对生物系统内跨膜电位的变化足以做出反应。另外, 与CCD串行读出数据的方式不同, PDA可采用并行数据输出, 满足了微观兴奋传导特性的速度要求。目前PDA已有 128×128 阵列, 空间分辨率也较高。



4.1.2 系统结构

3 电路系统

利用CCD的摄像功能可直接对荧光成像。但PDA目前尚没有集成化的成像产品，因此PDA输出的电流信号，必须经过信号调理及模/数转换电路才能变为数字信号，输入计算机进行后处理。电路系统包括信号调理及模/数转换电路。前者由电流-电压转换、运算放大器放大、低通滤波等环节组成。



4.1.2 系统结构

4 计算机系统

主要用于数据存储、数据处理（数字滤波、叠加等）、实验程序控制和图形、图像显示等。

信噪比关系到光学标测系统的性能，可通过以下途径提高系统信噪比：

- 1) 选择荧光或吸光强度变化率大的电压敏感染料。同时注意染色方法，尽量使更多的染料分子能够嵌在细胞膜表面，同时对细胞又无伤害。
- 2) 通过增大光源发射光强、目镜放大倍数等手段提高光路系统输出的待测荧光信号。
- 3) 通过模拟或数字方法降低由光电探测器或放大器自身产生的暗噪声。
- 4) 采用纹波电压较小的电源或电池供电增大光源稳定性，减少工频干扰。
- 5) 将测试材料放在减振台上减小振动，同时采用药物减少被测对象自身收缩运动带来的伪迹，尤其当空间分辨率高且测量细胞复极化特性时，更应注意运动伪迹的影响。
- 6) 减少电路系统噪声。电流-电压转换电路是电信号放大的主要环节，电流噪声与带宽呈正比，与该级的反馈电阻大小呈反比。因此，在不影响对信号最大上升速率测量的情况下，通过模拟或数字滤波技术降低系统带宽，增大反馈电阻可减少电路噪声。同时，应尽量采用高性能低噪声运算放大器。

4.1.2 系统结构

根据光学标测技术的原理，我们实验室建立了一套光学标测实验系统。该系统主要由离体心脏灌流系统，以及信号测量系统两部分构成。灌流系统主要包含支架、管路系统和控温水浴槽，可实现离体心脏的Langendorff灌注。信号测量系统由激发光源、荧光信号采集、处理等部分构成。

信号测量部分主要结构如图5-5：用中心波长为515nm的LED阵列做为激励光源照射染有电压敏感染料的待测心脏表面。由于染料的荧光信号范围为600nm~700nm，为有效隔离激发光，我们采用透射波长大于600nm的滤光片滤除激发光后，将荧光信号直接送入CCD摄像机成像，并通过数据采集卡转换为数字信号后送入计算机进行后处理。



4.1.2 系统结构

4-6 建立的光学标测系统的主要组成

- A CCD摄像机
- B 发射光滤光片
- C 透镜
- D 发光二极管阵列
- E 待标测的家兔心脏
- F 直流稳压电源
- G 恒温水浴

本系统采用DALSA公司的CCD摄像头、Matrox采集卡作为图像采集设备。空间分辨率 128×128 ，12位数/模转换，250帧/秒的采集速率（主频10MHz）。软件在Visual C++ 6.0集成开发环境下使用Matrox自带的GNL开发包设计。目前，整套系统已可自动完成从图像采集、图像批处理、实时显示，以及部分后处理等一系列工作。图5-6为建立的光学标测系统部分实物照片。图中显示了除计算机图像处理之外的心脏光学标测、图像数据采集、灌注、恒温系统。



4.1.4 心脏光学标测实验技术的应用

- 1 观察各种条件下动作电位的变化
- 2 观察心脏电活动异质性分布对复极离散的调节作用
- 3 用于早后除极（EAD）发生机制的研究
- 4 光标测技术在室颤和除颤机制研究中的应用



4.1.5 光学标测技术的发展及其局限性

除了在心脏电生理研究方面的广泛应用外，近年来电压敏感染料膜电位光学记录技术还渗透到电生理学研究的其它领域，包括中枢神经系统、骨骼肌细胞、甚至外分泌腺体等。例如，该技术用于同步、多位点记录和分析更趋于正常生理状态下的神经细胞群或微小的神经细胞和纤细的突起的电活动；监测早期胚胎的中央神经系统的电活动，研究其机理；观测低级听觉中枢及前庭通路神经细胞群的电生理信号，为研究从未稍前庭器官到前庭中枢的信息传递过程，认识正常前庭机能和各种前庭性障碍的发病机制提供了可能。



4.1.5 光学标测技术的发展及其局限性

- 1) 膜电位的准确标定：准确的定标可以提高测量精度，为研究跨膜电压的空间异质性提供可能。而目前电压敏感染料的光学标测技术对膜电位的测量精度较差，一定程度上限制了其应用领域。有报道采用双波长激发光方法可提高膜电位的测量精度。但如何进一步提高膜电位测量精度是研究人员关心的重要课题。
- 2) 新型染料的开发应用：微观电传导特性的测量与系统信噪比密切相关，而增大染料对膜电压变化的灵敏度是提高信噪比的方法之一，目前所发现的染料在这方面性能较差，因此，选择敏感性更强，光毒性更小的染料也是人们关心的问题。
- 3) 光学测量系统性能的提高：发展新的光学测量系统提高信噪比、克服光漂白等影响。有报道显示利用新型荧光显微镜将常用的光学记录系统（CCD或PDA）与激光扫描结合，可以提高信噪比和时空分辨率。
- 4) 与其它技术的进一步融合：与微电极、膜片钳、激光共聚焦、荧光测钙、光学切片等技术相结合，完善在细胞电生理学、神经生物学等领域的应用。



思考题：

13. 心脏光学标测技术与传统的电极方法相比有哪些优势？
14. 心脏光学标测的主要应用方面？
15. 心脏光学标测技术未来的发展方向？

