

雙光子顯微術於生物組織的應用

李宜真 台灣大學物理系

蘇子正 麻省理工學院機械系

E-mail : b7202004@ms.cc.ntu.edu.tw

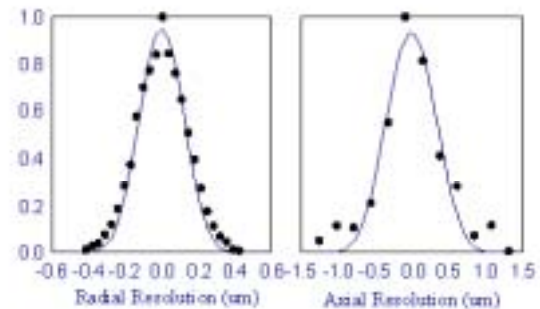
傳統上，若要穿透可觀的厚度而獲得生物組織內的細胞生理學資料，切片方法可提供高解析度的影像。但是切片方法每次只能探測一個二維的平面且有可能破壞三維的結構，同時切片的樣品必須經過化學處理及固定，無法觀測活體。以上的缺點都可由改用共焦顯微術與雙光子顯微術而克服。

一、簡介

三維共焦及雙光子顯微術

共焦顯微術使用一個透鏡將入射光源聚焦，以焦點掃描樣品，再以同一個透鏡收集樣品的反射光或受激發所發出的螢光，會聚到另一側的對應焦點上，用一個針孔將焦點以外的光線濾除。共焦顯微術以限制收光的區域達到三維的鑑別。

雙光子顯微術在 1990 年由 Denk 等人提出^[1]。此技術與共焦顯微術的基本架構類似，不同的是使用在短時間內發出極高強度光子量的脈衝式雷射，一次以兩個較長波長的光子激發一個螢光分子。由於雙光子激發要求較高的光子量，幾乎沒有焦點外的螢光分子會被激發，故雙光子顯微術無須在另一側的對應焦點上用針孔濾除背景。軸方向的高對比度為雙光子顯微術的最大優點。若使用 NA 1.25 的物鏡與 960 nm 的激發光源，螢光總量的 80% 都來自焦點上下 1 μ m 的區域。

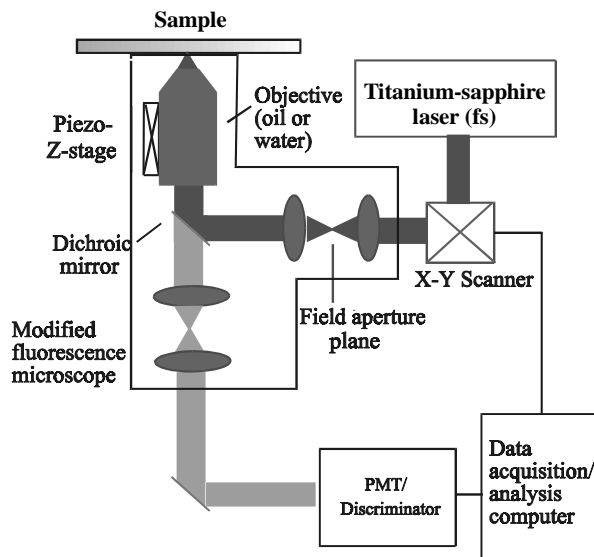


圖一、雙光子顯微的點散佈函數 (point-spread-function)，軸方向的聚焦點寬度為 0.9 μ m，徑向方向為 0.3 μ m。

共焦顯微術和雙光子顯微術都可做三維的顯微，前者可測量兩種來自樣品的訊號：反射或螢光。且因為共焦顯微術使用波長較短的光，聚焦點較雙光子使用的近紅外光子波長較小。但雙光子顯微術有幾個無法取代的優點：(1)在進行深度生物組織掃描時，螢光共焦顯微術通常所使用的藍紫、

紫外光易被樣品吸收，只能觀測到大約 20 ~ 40um 的深度；雙光子螢光顯微術使用的紅外光則比較不易被吸收。(2)雙光子顯微術對樣品的激發侷限在焦點附近，故對樣品及螢光分子可能造成的漂白破壞也只發生在焦點附近，能進行更長時間的重複觀察。1998 年 Mohler 等人將倉鼠胚胎置於雙光子顯微鏡下觀察數小時^{[2][3]}，而此胚胎在移植回子宮發育後仍然能成長為健康的成鼠。(3)雙光子螢光顯微中的激發光與樣品發出的螢光波長相差甚多，較不必擔心為了濾除激發光源而降低訊號。(4)最重要的一點，當觀測本身會散射光線的樣品時，共焦顯微術中不可或缺的針孔不只阻擋了非焦點附近的光線，同時也阻擋了部分來自焦點、卻經過散射而無法回到共焦焦點的訊號。雙光子顯微術的三維鑑別是源自於激發範圍的限制，不需要針孔阻擋。

雙光子顯微鏡的架設



圖二、雙光子顯微鏡的架構

雙光子顯微鏡的架構一般皆包含三部分(如圖)：飛秒(fs)等級之脈衝式雷射、高集光效率的顯微鏡系統、高敏感度的光電轉換系統。雷射通常使用鈦-藍寶石雷射，經過兩面反射鏡以在 x-y 平面上移動聚焦點。

雙光子激發所得到的螢光由高 NA 值的水鏡收集；此物鏡的有效工作距離同時也大約限制了可能的觀測深度。物鏡與樣品間的相對高度以壓電晶體控制以快速移動。最後將物鏡收集到的螢光通過分光鏡、光纖，進入光電倍增管，光電倍增管轉換出的訊號交由電腦重組出三維的影像。

二、生物組織顯像所使用的螢光分子

雙光子螢光顯微用於生物組織顯像時所使用的螢光分子分為兩種：自體螢光與外加螢光。

自體螢光(Endogenous fluorescence)

生物組織本身通常即含有可以以雙光子激發的螢光分子，胺基酸中的 tryptophan 和 tyrosine 都會發光。但是胺基酸的單分子吸收波長大約在 250 ~ 300 nm 的範圍，也就是 500 ~ 600 nm 的雙光子吸收，通常雙光子顯微系統所使用的雷射可用波長並不包括這個波長。且因為胺基酸在生物各部為的分佈密度差異不大，從而得到的螢光分佈也並不是特別有意義。

生物體中常用的高能量分子 NADPH 與 NADH 也會產生螢光。獨立的 NAD(P)H 吸收譜線為 340 nm 並放出 460 nm 的螢光，衰滅時間 400 皮秒。與其他分子結合的 NAD(P)H 之螢光光譜會藍移，且衰滅時間延長到 2 奈秒。高新代謝率的區域因為有高濃度的 NAD(P)H，所得影像亮度較

高。NAD(P)H 的螢光因此可用來監測角膜與皮膚中的氧化還原態。在粒線體中濃度特別高的黃素蛋白(flavoprotein)(生化反應中電子傳遞鍊上的能量分子)也可用於雙光子螢光顯微，其單光子的吸收譜線在 450 nm，放出 550 nm 的螢光。

雙光子顯微術也可觀測細胞外間質，主要為膠原(吸收在 280 ~ 300 nm 左右，放出 350 ~ 400nm)與彈力蛋白(吸收 400 ~ 450 nm，放射 340 ~ 370 nm)。彈力蛋白可輕易以雙光子顯微觀測，但是膠原蛋白的吸收譜線與 tryptophan 相近，不容易單獨激發；企圖觀測膠原蛋白時，在穿透方向觀測二倍頻訊號是較好的選擇。

外加螢光(Exogenous fluorescence)

為了觀測生物組織中不會自發螢光的部分，外加螢光染劑是必要的。且自發螢光分子在生物體內基於化學條件的改變，幾乎都只侷限於氧化還原反應，無法由光譜或螢光激發的衰滅時間得到更多的資訊。外加螢光的主要困難通常是如何均勻而非破壞性地染進活體組織中。

螢光蛋白質技術是最近在外加螢光上重要的發明。天然綠色螢光蛋白質來自水母，最近也有其他各種顏色的螢光蛋白質被開發出來。螢光蛋白質對生物無毒性，可被編譯在目標細胞的 DNA 中由細胞表現出來，若與其他蛋白質編譯在一起，即可用螢光強弱來追蹤特定蛋白質在細胞中的表現強度與出現位置。

三、生物組織的光學性質

生物組織的光學性質可大略被描述為三項：散射、吸收與折射率。不均勻的折射率變化與散射是

劣化成像品質的主因；吸收紅外線激發光則會使樣品因熱受損。

雙光子激發效率與深度的關係

雙光子顯微術在生物樣品中的探測深度受限於將雷射脈衝有效送入的效率；以下假設點散佈函數在幾百個微米的深度內沒有巨大改變，單從功率和脈衝變寬的角度去討論。雷射功率傳達與深度的關係可以表達如下：

$$I(z) = I_0 e^{-(1-g)\mu_s + \mu_a]z} \quad (1)$$

$I(z)$ 是在深度 z 時的強度， I_0 是在樣品表面上的強度， μ_s 為散射係數， μ_a 吸收係數， g 是散射角度取 cosine 值的平均。在一般的生物組織中，散射係數、吸收係數與 g 的值分別大約在 $20 \sim 200 \text{mm}^{-1}$ 、 $0.1 \sim 1 \text{mm}^{-1}$ 、與 $0.7 \sim 0.9$ 。由於雙光子激發的機率與入射光強度的二次方正比，螢光訊號在樣品中的平均自由徑約為 $20 \sim 25 \mu\text{m}$ 。

雷射脈衝在 150 飛秒尺度的鈦藍寶石雷射，其脈衝寬度會在光路中逐漸加寬而線性地降低雙光子激發效率。雷射脈衝也容易在經過顯微鏡物鏡時因色散被加寬到 500 飛秒以上，可在進入鏡頭前先用對應的修正以彌補色散的效應。但是即使物鏡造成的色散效應被修正了，雷射脈衝仍然會因為樣品的折射率變化與折射而劣化。這方面的問題還有待深入研究。

偵測來自多重散射樣品的螢光訊號

如同激發光源所面臨的問題，樣品所發出的螢光訊號也會被樣品本身散射且吸收。長波長的螢光

被散射和吸收的問題較小，故開發長波長螢光分子對深度樣品探測相當重要。與共焦顯微術相比，雙光子顯微術在偵測散射螢光訊號上較為靈敏。在典型的樣品中，光子的平均自由徑為 100 nm 左右，意為穿出樣品的螢光分子可能平均皆會遭到一次散射，共焦顯微術使用的針孔會阻擋部分訊號。雙光子顯微術中，只要散射光子的角度在物鏡收光的角度以內，就仍然可被偵測到。

同時具有非均勻折射率變化與高散射係數樣品對解析度造成的限制

影像對比與解析度會隨著光通過組織的路徑長度而降低，主要的原因可分為激發與發射光被散射、物鏡和生物組織內多變化的的折射率無法配合。散射可用蒙地卡羅法做模擬，2000 年 Dunn 與其他人的研究中將激發與發射光受到散射的影響分開並量化描述^[4]，他們給出的結論是：在雙光子顯微術中，隨著觀測深度的加深，訊號強度的減弱比解析度的劣化要明顯許多。此份研究中提供了也提供了實驗上觀測到的點散佈函數，並與 1998 年 Centonze 與 White 的研究結果相符^[5]。

由於生物樣品的折射率常隨組織種類的變化而改變，以人類皮膚樣品為例，從表面到深度為 100 μm 左右，折射率從 1.52、1.34、1.48 做不連續的變化，觀測皮膚深處時，物鏡與樣品折射率不匹配的問題將無法避免。在高折射係數樣品中，折射率不匹配的點散佈函數測量，可使用大小遠小於點散佈函數的螢光球，置於加入散射物質、折射率約為 1.34 的凝膠中；掃描螢光球便得到點散佈函數。由實驗結果得知，油鏡在觀測此一折射率相當於水的樣品時，點散佈函數在軸方向與徑向上都被明顯

加寬。觀測生物樣品時，最常用的選擇是水鏡。但是在皮膚樣品的真皮層，甚至連水鏡也因折射率不匹配而出現嚴重的像差。

樣品遭受的光破壞 (photodamage)

激發光源強度過強會對樣品造成光破壞，在螢光訊號強度與激發光造成的光破壞之間必然要做個平衡。使用飛秒等級、紅外線雷射時，可能造成的氧化破壞主要來自於雙光子或者更多光子的吸收，化學上與紫外光照射的情況類似：自發螢光與外加螢光同樣會因為被激發而氧化。許多最近的研究顯示，螢光分子遭到光破壞的程度與激發光強度的四次方成正比，與激發得到的螢光強度直接成正比，與雷射脈衝寬度無關。(Hockberger et al., 1999^[6]; Koester et al., 1999^[7]; Konig et al., 1999^[8]; Konig et al., 1996^[9]; Sako et al., 1997^[10])。因此使用脈衝寬度較窄的雷射能在造成同樣強度螢光的前提下，盡量減少光破壞的程度。同時，也有些研究顯示螢光分子受到的光漂白(photobleach)可能源自三個或更多光子的吸收(Patterson 與 Piston, 2000 年^[11])。這些多於雙光子的吸收可能造成破壞，但卻對螢光訊號的增強沒有貢獻，應設法避免。除了光破壞以外，熱破壞也是雙光子顯微術中應被關心的問題。根據 Denk 等人在 1995 年^[12]與 Schonle 和 Hell 在 1998 年^[13]的結果，通常功率在 1mK 以下的雷射激發所造成的熱破壞可被忽略。

四、雙光子顯微術在生物組織成像的應用

雙光子顯微術的特點在觀測神經、胚胎、皮膚、胃壁都有特別的優勢。雙光子顯微術可觀測活體中的三維神經分布、神經反應電位(action

potentials)、鈣離子濃度變化、神經傳導。許多雙光子神經生物學研究都集中焦點在神經末梢分布如何受學習和記憶的影響而改變,也可偵測離子流動如何受外加刺激而改變。阿茲海默症中的神經連結。雙光子較不對樣品產生破壞的特性用於觀測活體胚胎特別適合,例如 1999 年 Squirrell 等人利用雙光子顯微觀測倉鼠胚胎中的粒線體^[14],時間長達 24 小時;共焦顯微術在相似的情況下只能持續數小時。針對皮膚厚度薄、容易量測的特點,雙光子顯微術特別適用。1997 年 Masters 等人量測皮膚的自發螢光^[15],深度可達 200 μm 。

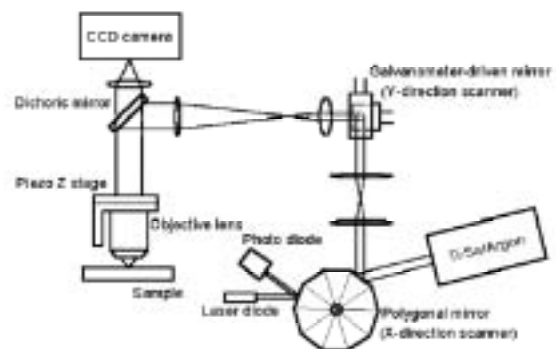
五、最新的雙光子生物組織成像技術

以下介紹三個在生物醫學上可應用的雙光子顯微技術:動態(video rate)雙光子成像、三維細胞儀(cytometry)、雙光子多色螢光顯像(two-photon spectral resolved imaging)。

動態雙光子成像

動態雙光子成像要求每秒鐘得到 30 幅以上的畫面,以觀察快速的生物反應與活體。觀測活體時有許多不可避免的干擾:呼吸、心跳、血液流動,這些生理雜訊的頻率約在 1 Hz 左右;如果能用 10 倍以上的頻率掃描,則可以忽略許多此種不可避免的移動造成的破碎影像。快速掃描也可用於量測更大的樣品。

一個做動態雙光子成像的方法是使用快速的光學掃描,例如多面鏡(Kim et al., 1999 年)^[16]。



圖三、使用多面鏡的動態雙光子顯像系統,最高掃描速度是每秒 100 張 256 * 256 個像素的畫面。

但是因為觀測每一點的時間縮短,所得影像的訊號噪音比便降低。

另一個做法是使用多焦點的掃描,或者線掃描(Bewersdorf et al., 1998^[17]; Buist et al., 1998^[18]);只要在空間或時間上分散多焦點,焦點間互相干涉的問題並不嚴重。多焦點掃描主要的問題是在於必須使用 CCD 以同時觀測多點的訊號,敏感度較使用 PMT 下降而價錢昂貴。

三維顯像細胞儀

三維細胞儀以觀測個別細胞的螢光或散射光以得知細胞的狀態,大致分為流體細胞儀與顯像細胞儀兩種。流體細胞儀用於偵測在液體流中的細胞所攜帶的成分,可做細胞分類。顯像細胞儀是用於觀測二維平面上培養的細胞,雖然此法在速度上較流體細胞儀要慢,每秒大約辨識兩百個細胞,但卻有可重複追蹤特定細胞的特點,例如觀察細胞再不同時間的演化。顯像細胞儀也提供微米等級的細

胞結構資訊,例如螢光分子在不同胞器間分布的密度。三維顯像細胞儀可延伸至三維組織培養的觀察。

雙光子多色螢光顯像

使用多種顏色的螢光分子可在光譜及空間上提高影像的鑑別度。若使用單光子激發,則不同顏色的螢光分子通常無法共用單一激發光;但許多常見螢光分子的雙光子激發範圍都較單光子激發要寬廣,用單一激發光源激發不同顏色螢光分子是可能的(Xu et al., 1996)^[19]。但多色螢光的接收不如激發簡單,傳統上使用轉動的濾光片將不同色光分開,較高價位的選擇也有可調式液晶濾片、可調式聲光濾片。通常的做法是用光柵將光色散,然後從不同的位置使用 CCD 或者 PMT 接收不同的色光。PMT 雖然敏感而價錢低廉,但是對於偵測波長在 600 nm 以上的光,效率常低於 1%。

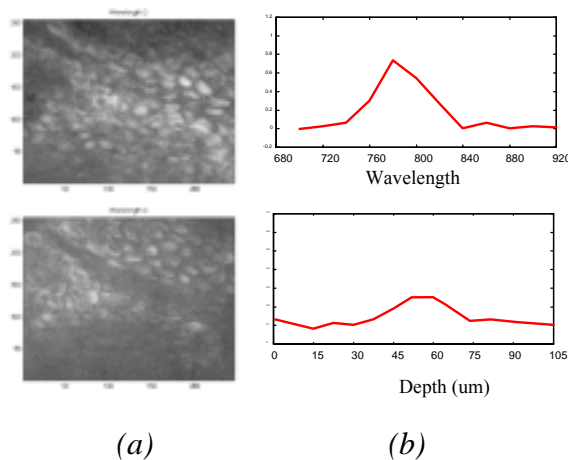
圖四、雙光子多色螢光顯像:基因突變的老鼠耳朵掃描。這隻老鼠經過基因工程改造,表現出強化的黃色螢光蛋白,上圖左邊的多角形是角質,右邊針狀的部分是一根毛。(a)總螢光亮度。(b)單獨像素點的光譜,可以看到

左邊角質上的螢光光譜在 530 nm 特別強,是黃色螢光蛋白的特徵;右邊點的光譜較寬且紅,來自自發螢光。

已知螢光分子光譜的變化可用於了解生物體內的化學環境;而不確定種類的螢光則可使用主要成分分析法(PCA)來分析並識別螢光中特定螢光分子的種類與濃度。

六、結論

雙光子顯微術在獲取生物結構與化學資訊上是非常有力的技術,可從活體得到細胞尺度以下的訊息。若再配合科技進步而改良,其在生物醫學方面的應用可期望繼續增加。



圖五、(a)表皮—真皮層接合處的螢光掃描。(b)上:此螢光分子的光譜;下:此螢光分子強度與深度的關係。藉由 PCA 分析可知道這是皮膚中的黑色素。

引用文獻

1. Denk W., Strickler J. H., Webb W. W., "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, 248,73-6(1990).
2. Mohler W. A., Simske J. S., Williams-Masson E. M., Hardin J. D., White J. G., "Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis," *Curr. Biol.*, 8,1087-90 (1998).
3. Mohler W. A., White J. G., "Stereo-4-D reconstruction and animation from living fluorescent specimens," *Biotechniques*, 24,1006-10, 1012(1998).
4. Dunn A. K., Wallace V. P., Coleno M., Berns M. W., Tromberg B. J., "Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples," *Applied Optics*, 39,1194-1201(2000).
5. Centonze V. E., White J. G., "Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging," *Biophys. J.*, 75, 2015-24(1998).
6. Hockberger P. E., Skimina T. A., Centonze V. E., Lavin C., Chu S., Dadras S., Reddy J. K., White J. G., "Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96,6255-60(1999).
7. Koester H. J., Baur D., Uhl R., Hell S. W., "Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage," *Biophys. J.*, 77,2226-36 (1999).
8. Konig K., Becker T. W., Fischer P., Riemann I., Halbhuber K.-J., "Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes," *Opt. Lett.*, 24,113-15 (1999).
9. Konig K., So P. T. C., Mantulin W. W., Tromberg B. J., Gratton E., "Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress," *J. Microsc.*, 183, 197-204(1996).
10. Sako Y., Sekihata A., Yanagisawa Y., Yamamoto M., Shimada Y., Ozaki K., Kusumi A., "Comparison of two-photon excitation laser scanning microscopy with UV- confocal laser scanning microscopy in three-dimensional calcium imaging using the fluorescence indicator Indo-1," *J. Microsc.*, 185,9-20(1997).
11. Patterson G. H., Piston D. W., "Photobleaching in two-photon excitation microscopy," *Biophys J*, 78,2159-62(2000).
12. Denk W. J., Piston D. W., Webb W. W. 1995. Two-photon molecular excitation laser-scanning microscopy. In: Pawley JB, editor. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2 ed. New York: Plenum Press. p 445-458.
13. Schonle A., Hell S. W., "Heating by absorption in the focus of an objective lens," *Opt. Lett.*, 23,325-7(1998).
14. Squirrell J. M., Wokosin D. L., White J. G., Bavister B. D., "Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability," *Nat. Biotechnol.*, 17,763-7(1999).
15. Masters B. R., So P. T., Gratton E., "Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin," *Biophys. J.*, 72,2405-12 (1997).

16. Kim K. H., Buehler C., So P. T. C., "High-speed, two-photon scanning microscope," *Appl. Opt.*, 38,6004-9(1999).
17. Bewersdorf J., Pick R., Hell S. W., "Multifocal multiphoton microscopy," *Opt. Lett.*, 23,655-657(1998).
18. Buist A. H., Muller M., Squier J., Brakenhoff G. J., "Real time two-photon absorption microscopy using multipoint excitation," *J Microscopy*, 192,217-26 (1998).
19. Xu C., Zipfel W., Shear J. B., Williams R. M., Webb W. W., "Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93,10763-8(1996).