

DOI: 10.7652/xjtuxb201604023

纳米金标记细胞的荧光寿命成像及其三维重建

姚翠萍, 周湘连, 王晶, 王波, 黄康, 张镇西

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 为了研究在基于纳米金的肿瘤光动力学疗法以及肿瘤热疗中纳米金在细胞中的分布及代谢, 利用多光子荧光显微镜技术对在热疗中纳米金结合的肿瘤细胞进行了多次扫描成像, 并采用一种基于区域的活动轮廓模型图像分割算法, 对与纳米金结合的细胞的多光子荧光显微图像进行处理, 在一幅具有多个细胞的图像中分割出单个细胞的轮廓。根据细胞断层切片图像的轮廓采用移动立方体算法, 对细胞进行三维重建, 绘制出细胞表面的三维模型, 再利用纳米金的荧光寿命和光强来标定纳米金在细胞具体位置的分布。结果表明, 在一定时间内, 纳米金会进入细胞并在不同的区域内呈现一定的分布。这与抗原抗体结合会导致抗体的内化, 从而使纳米金进入细胞内的事实相符。这种技术将会为更加直观、全面地研究纳米金与细胞的相互作用以及纳米金在细胞内具体位置(比如某个细胞器内的分布)提供一种可行的方法。

关键词: 荧光寿命成像; 金纳米微粒; 三维重建

中图分类号: R318.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2016)04-0153-06

Fluorescence Life Imaging of Gold Nanoparticle-Labeled Cells and Its 3D Reconstruction

YAO Cuiping, ZHOU Xianglian, WANG Jing, WANG Bo, HUANG Kang, ZHANG Zhenxi

(Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: To analyze the distribution and metabolism of gold nanoparticles in cells during the gold nanoparticles-based photodynamic therapy and photo-thermal therapy, the multiphoton fluorescence microscopy was used to image the gold nanoparticles labeled cells, and a region-based active contour model image segmentation algorithm was chosen to process the multiphoton fluorescence images of gold nanoparticles labeled cell. 60 thin slice images were reconstructed for a 3D cell image to draw a three-dimensional model of cell surface. The locations of gold nanoparticles in or on the cell were marked according to the fluorescence lifetime and intensity of gold nanoparticles. The results show that the gold nanoparticles can get into the cells, which is in accordance with the fact that antibody is internalized when the antibody combines with antigen. This technology is expected to more comprehensively investigate the interaction between gold nanoparticles and cell as well as the specific distribution of gold nanoparticles, for instance, in a certain cell organelle.

Keywords: fluorescence lifetime imaging; gold nanoparticle; 3D reconstruction

收稿日期: 2015-07-15。 作者简介: 姚翠萍(1971—), 女, 副教授。 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61575156); 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究资助项目(61120106013)。

网络出版时间: 2016-01-04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20160104.1837.004.html>

多光子显微成像对于癌症的早期诊断是一种强有力的技术手段,它能够非侵入式地对组织里上百微米深处亚细胞特征进行成像^[1]。多光子显微成像在三维分辨率、探测深度、信噪比等方面的优点都是以往的激光显微镜不具备的,其成像原理见图1。通过对非荧光观测目标注入荧光造影剂,就能够对多种其他生物分子特征进行多光子显微成像,从而更好地监测癌细胞^[2]。传统的有机染料是最早使用的造影剂之一,它能够发出明亮的荧光,可以用于细胞质和细胞核的标记,但是它的抗光漂白能力差。荧光半导体量子点具有较宽的吸收波长范围,但是却有潜在的细胞毒性,使得它不适合在体临床应用^[1]。另一类荧光造影剂金属纳米粒子,不仅具有较高的荧光发光效率,而且与细胞有着很好的生物相容性。以金纳米颗粒作为荧光造影剂,与多光子显微成像结合进行生物医学成像是目前的研究热点^[3-5]。另外,纳米金目前在选择性光热治疗、药物递送方面的研究也取得了很大的进展^[6],但是目前纳米金的代谢机理还不是很清楚,这使其应用于临床受到了限制。在纳米金辅助的光动力疗法中,由于纳米金的分布不清楚,导致纳米金在细胞内的局域场增强效应无法发挥的原因也无法确定^[7]。因此,纳米金在细胞内的分布有助于提高纳米金辅助的光动力疗法,并对纳米金在活体内的代谢通路研究有所促进,进而推进纳米金体内代谢的研究进展。

在纳米金辅助的光动力疗法中,纳米金结合的光敏剂被细胞吸收后,光照射的结果可以使光动力效果提高,但是却没有发挥纳米金等离子体共振效应^[7],可能的原因是进入细胞后,纳米金和光敏剂分布在细胞的部位不同。

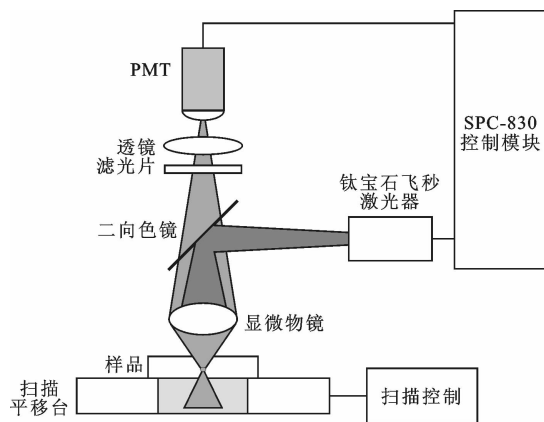


图1 多光子显微成像系统示意图

本文利用抗原抗体把纳米金特异性结合到卵巢癌细胞 OVCAR3 上,孵育 15 min,然后利用多光子

荧光显微镜的荧光寿命成像,对细胞进行多层扫描成像,获得一系列的二维图形。最后,利用图像分割算法,划分出单个细胞轮廓,并进行三维重建,利用荧光寿命的长短以及光强标定纳米金在细胞中或细胞表面的具体分布。如果再对不同的细胞器标记不同荧光寿命的染料,利用同样的方法,就可以定位纳米金在具体细胞器中的分布,与光敏剂所在部位进行比较,就可以获得其具体的分布信息。这种方法对于研究纳米金与细胞膜的相互作用以及纳米金的代谢通路提供了一种有力的工具。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

实验中所使用的卵巢癌细胞 OVCAR3 从美国模式培养中心(ATCC)获得,贴壁生长在含有 10 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪磺酸(Hepes)和 1 mmol/L 的 L-谷氨酰胺的培养基 RPMI-1640 (Sigma, USA)中,其中还加入了体积分数为 10% 的胎牛血清、1% 的青霉素/链霉素(PAA, USA)以及 1.5 g/L 的碳酸氢钠,置于 37 °C 的培养箱中进行培养,CO₂ 与空气的体积分数分别为 5%、95%,培养环境相对饱和湿度为 95%。

把细胞培养在培养瓶中,当细胞基本铺满瓶底的时候,用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶(含有 Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), Sigma)消化细胞 5 min,并对其在 20 °C 以 21 100 g 的速度离心 20 min,以 2.0×10^5 mL⁻¹ 的密度悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)中。接着以细胞与纳米金个数比等于 1:10⁴ 的浓度加入结合有 Erbitux 抗体的 30 nm 纳米金(British Biocell International 公司)和细胞上对应的表面生长因子受体(EGFR)反应,在培养箱中培养 15 min 后,冲洗掉多余的纳米金,将样品拿到多光子荧光显微镜下进行荧光寿命成像。

1.2 荧光寿命成像

成像所用设备为德国 JenLab 公司的 DermaInspect 多光子显微成像系统。系统包括一个固态锁模钛宝石激光器(MaiTai, Spectra Physics, Darmstadt, 德国),波长从 710~920 nm 可调,频率为 80 MHz,800 nm 时的平均输出功率大于 900 mW,脉宽为 75 fs。扫描模块包括电动光束衰减器、双轴电控扫描仪、压电驱动,工作距离为 140 μm 的物镜(Plan Neofluar×40, NA 1.3, Zeiss, Goettingen, 德国)等。通过二向色镜和低通滤波片(BG39, Schott, Mainz, 德国)对激发光和背景噪声进行滤除,发光

信号由光电倍增管模块(H7732-01, hamamatsu, Herrsching, 德国)进行探测^[8-9]。荧光寿命成像模块是通过时间关联单光子计数法来测量的^[10-11]。

1.3 图像分割与细胞三维重建

测试获得二维的荧光寿命成像结果,其视野内一般不会只有一个细胞,因此首先要把每个细胞分割出来,再进行重建。对于细胞的分割,本文采用了文献[12]提出的一种基于局部区域的活动轮廓模型算法。在此模型中,图像分割是在一个较小的局部区域里划分出前景和背景。首先,需要建立一个合适形状的初始化轮廓,初始化轮廓用水平集表示,根据所选模型(例如 chan-vese 模型)计算初始化轮廓上每个点的局域化能量。然后,通过均值区分方法,使局部能量最优化,进行曲线演化,最终达到使曲线上所有点的总能量最小。这时,经过一系列曲线演化所得到的分割结果就是目标细胞的外轮廓。

细胞的三维重建采用的是移动立方体(MC)算法,是一种三维等值面重建算法,它是由文献[13]提出来的。在医学成像领域里,MC 算法是最常用的面绘制三维重建算法,采用分而治之的方法,以上下两层切片的 8 个像素点形成的立方体为单位对所有的切片数据进行逐个处理。每个立方体与设定的阈值相比较,在立方体里形成一个三角形表面,所有三角形连成网状结构,就构成了三维表面。

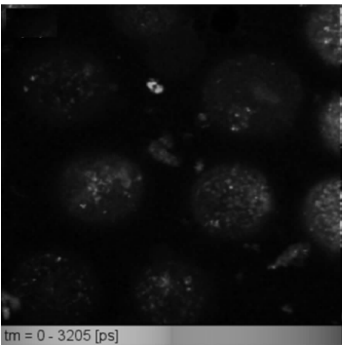
1.4 纳米金细胞内空间分布标记

在荧光寿命成像中,通过对所采集的数据与所设定的模型(特定函数)进行拟合,使数据和模型之间的方差最小,其中每个点可以由几个不同的发色团叠加。在本测量中,对任意一点设置为两个发色团的叠加(纳米金和细胞)。因此,在对纳米金进行空间标记的时候,同时设置 3 个条件:荧光寿命小于 200 ps,每个像素中短寿命占比例大于 80%,每个像素强度大于 150(根据图像获得任意单位)。只有满足以上 3 个条件,才认为某个点是纳米金。最后,把获得的细胞三维模型与纳米金的分布模型进行叠加,就可以得到纳米金在细胞中的分布。

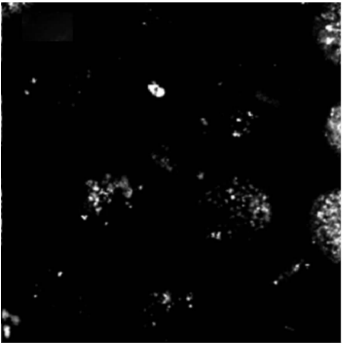
2 实验结果

2.1 荧光寿命成像

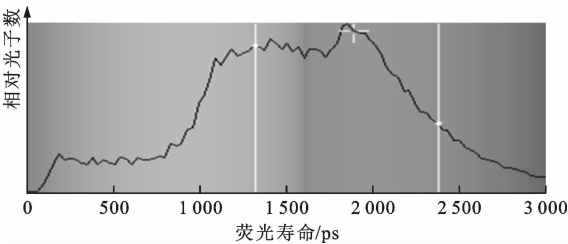
纳米金标记的 OVCAR3 细胞的发光强度、伪彩色荧光寿命和荧光寿命分布如图 2 所示。所使用的激发波长为 750 nm,激发功率为 25 mW。从图中可知,纳米金分布在细胞上。根据文献报道,纳米金的荧光寿命小于 100 ps^[14]。由于仪器最小分辨



(a) 荧光寿命成像伪彩图



(b) 荧光寿命成像强度



(c) 荧光寿命分布直方图

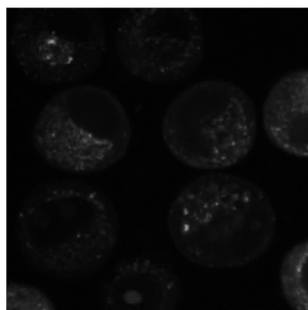
图 2 结合有纳米金的细胞的荧光寿命成像

率为 180 ps,而根据细胞各部分的荧光寿命均在纳秒级^[15-16],可以认为系统中荧光寿命小于 180 ps 的成分主要来自纳米金,后续程序中还会根据其强度的大小对其进一步限制。从获得的伪彩荧光寿命图像和其相应的荧光寿命分布直方图可以看出,荧光寿命小于 200 ps 的部分可以代表纳米金,而细胞的荧光寿命通常大于 1 500 ps。对于一个样品,在纵轴方向上每隔 0.4 μm 扫描一次,获得一副二维图像,要获得完整的一个细胞就要进行大约 50 多次的扫描,在每一个深度上都获得一个二维图像。

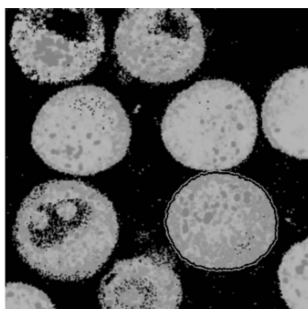
2.2 图像分割与三维重建

进行图像分割的目的是划分出图像中目标细胞的外轮廓用于细胞表面三维重建。为了方便进行三维重建,分割出来的轮廓要求是闭合的曲线。通过比较阈值分割、Canny 算子、Log 算子、区域生长、模

糊聚类等算法,本文最终选择了活动轮廓模型算法。该算法虽然速度稍慢,但是满足对图像轮廓精确划分的要求,且能进行局部分割。当需要在一幅包含多个类似目标的图像中分割出感兴趣的目标时,这个模型的分割效果尤其好。目标细胞分割以及三维重建算法都通过 Matlab 平台实现。图 3 是根据活动轮廓算法对图像中的一个目标细胞进行分割的结果,对其余的 50 多帧图像都进行了同样的分割,然后将所有的分割结果进行三维重建,组成一个细胞的完整三维模型,如图 4 所示。



(a) 荧光寿命成像伪彩图



(b) 灰度化并选定目标细胞



(c) 目标细胞分割后结果

图 3 对感兴趣细胞的分割过程

2.3 纳米金在细胞的空间分布

根据前述的方法获得了如图 5 所示纳米金在三维细胞内的空间分布图。从图中可以看出,经过 15 min 培育后,大部分纳米金已经进入细胞内部,而细胞膜表面上的纳米金只占了少部分。这些分布从动态三维图中可以分辨得更清楚。

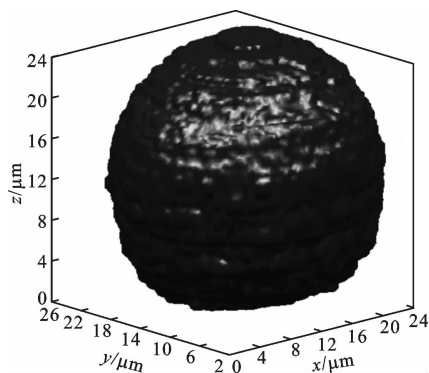


图 4 重构后的细胞三维模型

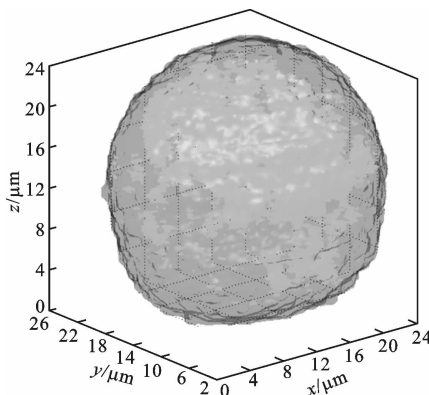


图 5 纳米金在三维细胞内的空间分布

3 讨论与结论

多光子显微镜为观察完整组织等比较厚的样品中的活细胞提供了一个很好的工具^[17]。这项技术为很多不方便成像或者不能提供有用信息的实验提供了一种可能性。纳米金的多光子发光被认为是等离体辅助成像、光热治疗以及观察细胞器的一种最重要的工具之一^[18-20]。通过多光子显微镜,在生理条件下可以直接观察到纳米金,同时通过荧光寿命成像可以很清楚地分辨出纳米金和细胞的自体荧光。而且,由于在多光子激励中,当物镜数值孔径在 1.2~1.4 时,荧光总能量的 80% 来自于物镜焦点 700~1 000 nm 厚度的范围内,这么窄范围的多光子激励只会诱导焦点处的物质发光。因此,当使用激光扫描多光子荧光显微镜在 z 轴方向上以 0.4 μm 的间隔进行成像时,就可以获得纳米金在细胞内的具体分布。从图 3、图 5 可以看出,纳米金有的分布在细胞膜上(颜色不同),有的分布在细胞内部,这是因为表皮生长因子受体在连接配体后会很快被内化^[21]。

此外,从图 5 可以看出,通过利用荧光寿命和光强进行标记,可以比较清楚地观察到纳米金在细胞

内的分布,并且分布并不均匀,也许这和 OVCAR3 细胞膜上的表面生长因子受体分布有关,也可能和纳米金进入细胞后形成内吞泡有关,具体的原因需要进一步研究。如果纳米金不和细胞上的受体结合,只是单纯地和细胞进行一定时间的培育,此时要使纳米金进入细胞可能需要比较长的时间,其在细胞内的分布也会有所不同,即使这样,本文算法同样适用。除此之外,还可以用于其他情况,比如纳米金的穿膜载药等。

在算法方面,基于局部区域的活动轮廓模型对于初始化轮廓较为敏感,所以初始化轮廓应尽量接近目标轮廓,本文采用圆形或者椭圆形能达到良好的分割效果,同时也能提高分割效率。实验中,改变 z 轴距离进行成像,可能会使细胞发生位移,分割所得每层图像中目标细胞的外轮廓可能不在一条轴线上,所以有时需要对轴线进行校正才能保证三维重建得到正确的结果。由于图像分割算法采用水平集描述活动轮廓,运算量较大,运行时间相对较慢,但对于不要求实时进行的图像后处理阶段还是可以接受的。后期可以通过 c-Matlab 联用或者并行算法提高运算速率,节省运算时间。三维细胞以及纳米金分布后期还可以通过一些专业软件进行精细渲染,并添加一些旋转、平移、缩放功能,实现良好的视觉和互动效果。

本文的最终目的是想了解纳米金在细胞内的具体位置,包括具体的细胞器等的分布,因此后续研究中还需对不同的细胞器进行标记,将纳米金的细胞器分布进行重合才会有进一步的发现。而且,如果要对纳米金细胞内的代谢进行研究时,还需在不同时间段内进行标记研究,才能发现更有意义的现象,得出更有价值的结论。

参考文献:

- [1] KONIG K, RIEMANN I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2003, 8(3): 432-439.
- [2] DURR N J, LARSON T, SMITH D K, et al. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods [J]. *Nano Lett*, 2007, 7(4): 941-945.
- [3] QU X C, WANG J, YAO C P, et al. Two-photon imaging of lymphoma cells targeted by gold nanoparticles [J]. *Chinese Optics Letters*, 2008, 6(12): 879-881.
- [4] WANG H, HUFF T B, ZWEIFEL D A, et al. In

vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(44): 15752-15756.

- [5] QU Xiaochao, NORBERT K, LI Z, et al. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of Karpas 299 cells using ACT1 antibody conjugated gold nanoparticles [C] // *Proc SPIE* 6630. Washington, DC, USA: SPIE, 2007: 66301C.
- [6] QIN Z, BISCHOF J C. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(3): 1191-1217.
- [7] ZHANG Z X, WANG S J, XU H, et al. Role of 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(5): 0510431-0510438.
- [8] BECKER A W, BERGMANN A, KONIG K, et al. Picosecond fluorescence lifetime microscopy by TCSPC imaging [C] // *Proc SPIE* 4262. Washington, DC, USA: SPIE, 2001: 4262.
- [9] KONIG K, BECKER T W, FISCHER P, et al. Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes [J]. *Opt Lett*, 1999, 24(2): 113-115.
- [10] PHILIP J, CARLSSON K. Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging [J]. *J Opt Soc Am: A*, 2003, 20(2): 368-379.
- [11] BECKER W, STIEL H, KLOSE E. Flexible instrument for time-correlated single-photon counting [J]. *Rev Sci Instrum*, 1991, 62(12): 2991-2996.
- [12] LANKTON S, TANNENBAUM A. Localizing region-based active contours [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2008, 17(11): 2029-2039.
- [13] LORENSEN W E, CLINE H E. Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm [J]. *ACM Siggraph Computer Graphics*, 1987, 21(4): 163-169.
- [14] ZHANG Y A, YU J, BIRCH D J S, et al. Gold nanorods for fluorescence lifetime imaging in biology [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(2): 0205041-0205043.
- [15] QU X C, WANG J, ZHANG Z X, et al. Imaging of cancer cells by multiphoton microscopy using gold nanoparticles and fluorescent dyes [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(3): 0312171-0312177.
- [16] 刘超,周燕,王新伟,等. 荧光寿命成像技术及其研究进展 [J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48: 1111021-1111026.

- LIU Chao, ZHOU Yan, WANG Xinwei, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy and its research progress [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48: 1111021-1111026.
- [17] LEBLOND F, DAVIS S C, VALDES P A, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: review of instruments, methods and applications [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B Biology*, 2010, 98(1): 77-94.
- [18] EICHELBAUM M, KNEIPP J, SCHMIDT B E, et al. SERS and multiphoton-induced luminescence of gold micro-and nanostructures fabricated by nir femto-second-laser irradiation [J]. *ChemPhysChem*, 2008, 9 (15): 2163-2167.
- [19] 李政, 张镇西. 纳米金标记活细胞双光子荧光成像研究 [J]. *深圳大学学报: 理工版*, 2008, 25(3): 248-251.
- LI Zheng, ZHANG Zhenxi. Two-photon fluorescence imaging of cationic gold nanoparticles labeled fibroblasts and its application [J]. *Journal of Shen Zhen University: Science and Engineering*, 2008, 25(3): 248-251.
- [20] MARTI D, STOLLER P, RUOSCH M, et al. Combined scattering confocal and multiphoton luminescence imaging of gold nanospheres [C]//*Proc SPIE 68690K*. Washington, DC, USA: SPIE, 2008: 68690K.
- [21] WANG Q, VILLENEUVE G, WANG Z. Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(10): 942-948.
- (编辑 杜秀杰)

(上接第 130 页)

- [13] SINGER I, TURKEL E. A perfectly matched layer for the Helmholtz equation in a semi-infinite strip [J]. *Journal of Computational Physics*, 2004, 201(2): 439-465.
- [14] RYLANDER T, JIN J M. Perfectly matched layer for the time domain finite element method [J]. *Journal of Computational Physics*, 2004, 200(1): 238-250.
- [15] BASU U, CHOPRA A K. Perfectly matched layers for time-harmonic elastodynamics of unbounded domains: theory and finite-element implementation [J]. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 2003, 192(11): 1337-1375.
- [16] 温熙森, 温激鸿, 郁殿龙, 等. 声子晶体 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2009: 139-146.
- [17] CABALLERO D, SANCHEZ-DEHESA J, RUBIO C, et al. Large two-dimensional sonic band gaps [J]. *Physical Review: E*, 1999, 60(6): 6316-6319.
- [18] WANG X H, GU B Y, LI Z Y, et al. Large absolute photonic band gaps created by rotating noncircular rods in two-dimensional lattices [J]. *Physical Review: B*, 1999, 60(16): 11417-11421.
- [19] QIU M, HE S. Large complete band gap in two-dimensional photonic crystals with elliptic air holes [J]. *Physical Review: B*, 1999, 60(15): 10610-10612.
- (编辑 杜秀杰)

(上接第 138 页)

- [10] 程远. 低温流体池沸腾实验及其迫流冷却系统的模拟研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [11] 熊炜. 液氮核态池沸腾 CFD 模拟和可视化实验 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [12] BROMLEY L A. Heat transfer in stable film boiling, AE CD-2295 [R]. Oak Ridge, USA: US Atomic Energy Commission, Technical Information Division, 1949.
- [13] BRENTARI E G, GIARRATANO P J, SMITH R V. Boiling heat transfer for oxygen, nitrogen, hydrogen, and helium, NBS-317 [R]. Washington, DC, USA: US National Bureau of Standards, 1965.
- [14] MERTE H, CLARK J A. Boiling heat transfer data for liquid nitrogen at standard and near-zero gravity [J]. *Advances in Cryogenic Engineering*, 1962, 7: 546-550.
- [15] LEWIS E W, CLARK J A, MERTE H. Boiling of liquid nitrogen in reduced gravity fields with subcooling, ORA Project-07461, No. 2 [R]. Ann Arbor, USA: The University of Michigan, 1967.
- (编辑 杜秀杰)