

眼底视网膜色素上皮层细胞脂褐素及 氧化黑色素自体荧光寿命成像研究*

孙怡雯¹⁾ 屈军乐^{1)†} 赵羚伶¹⁾ 许改霞^{1)‡} 丁志华²⁾ 牛憨笨¹⁾

1) 光电子器件与系统教育部重点实验室, 深圳大学光电子学研究所, 深圳 518060)

2) 浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 杭州 310027)

(2007 年 3 月 26 日收到 2007 年 4 月 28 日收到修改稿)

利用一种基于时间相关单光子计数器的双光子激发荧光寿命显微成像技术, 对猪眼底视网膜色素上皮层细胞内的脂褐素和氧化黑色素颗粒的空间分布及其荧光寿命特性进行了研究, 尤其对于这些色素颗粒在光致氧化环境中的荧光寿命差异进行了分析. 结果表明, 利用荧光寿命测量能有效区分视网膜色素上皮层细胞中的多组分荧光团. 利用荧光寿命的衰减参数可分辨正常及异常的荧光现象. 该方法有望发展成为一种用于眼科临床诊断及病理学研究的高灵敏度的工具, 对眼底细胞随年龄增长的衰老机理的研究具有重要的意义.

关键词: 双光子激发荧光, 荧光寿命成像, 视网膜色素上皮层

PACC: 0760P, 8770E, 8732C, 3380K

1. 引言

视网膜色素上皮层(RPE)位于视网膜锥、杆体细胞层及 Bruch 膜(玻璃膜)之间, 由六角形、圆形或长圆形细胞组成, 是排列整齐的单层细胞层. RPE 细胞最主要的功能之一就是维持光感细胞对光信号的接收和传导, 从而保证视觉功能的正常发挥. 当 RPE 细胞新陈代谢发生异常时, 光感细胞功能失常, 继发性的损伤将对视功能造成严重影响. 虽然其具体的发病机理还不清楚, 但离体荧光研究和组织学研究证实, RPE 细胞中最重要的荧光团成份-脂褐素(lipofuscin)会随着年龄的增加而增多, 大量堆积的代谢最终产物将造成 RPE 细胞的严重损伤甚至死亡. RPE 细胞中还存在着许多其他的内源荧光团, 如 FAD, NADH 和黑色素等, 这些荧光团能够被一定波长的光激发后产生自体荧光. 由于这些荧光信号携带有关于眼底代谢状态的信息, 因此眼底荧光成像已经成为一种眼科临床常用的视网膜疾病诊断手段.

但一般的视网膜眼底成像技术是基于荧光强度的测量, 不但容易受影响光强度变化因素的影响, 而

且只能提供荧光的空间分布信息^[1], 难以提供早期的诊断. 荧光寿命的测量不受激发光强度变化、荧光团的浓度、光漂白等因素的影响, 而且不受其他限制强度测量的因素的制约, 只与荧光团所处的微环境密切相关. 因此利用荧光寿命成像技术, 可准确反映细胞内如新陈代谢状况等功能信息, 无疑将在生物及医学领域发挥极大的作用^[2,3].

本论文利用双光子激发(TPE)^[4]荧光寿命成像(FILIM)技术研究了猪眼底视网膜色素上皮细胞内脂褐素和氧化黑色素颗粒的荧光寿命特性及其空间分布, 实现了一种用于眼底组织新陈代谢状态监测的新方法, 并通过分析眼底自体荧光团光氧化状态前后荧光寿命的差异, 有望为眼底细胞随年龄增长的衰老机理的研究提供可能的依据.

2. 实验系统

双光子激发荧光寿命显微成像实验系统如图 1 所示. 系统采用钛宝石锁模飞秒激光器作为激发光源, 用激光扫描共焦倒置显微系统实现 RPE 细胞的显微成像, 并采用时间相关单光子计数器对视网膜色素上皮层细胞的自体荧光寿命进行测量和成像.

* 国家自然科学基金(批准号: 6048011, 60627003)和广东省自然科学基金(批准号: 5010500)资助的课题.

† 通讯联系人. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

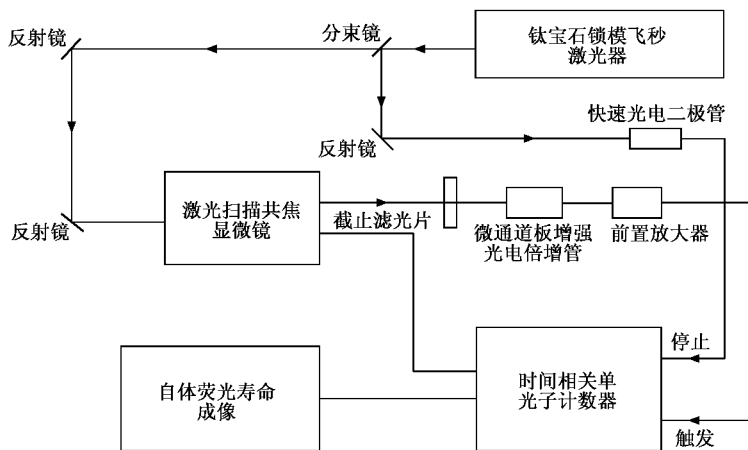


图1 双光子激发 RPE 细胞自体荧光寿命成像系统

钛宝石锁模飞秒激光器(Mira 900F, Coherent)输出激发光的脉冲宽度 120 fs, 重复频率 76 MHz, 平均输出功率 1.3 W, 可调谐波长范围在 700—980 nm 范围之内。飞秒激光器与一台激光扫描共焦显微镜(Leica TCS SP2, Leica)耦合, 并使飞秒激光光路与显微镜内原内置激光光路重合。所有实验采用放大倍率为 63 倍, 数值孔径为 1.32 的油浸物镜。在显微镜的备用外探测信号输出端口, 采用微通道板增强光电倍增管(MCP-PMT)(R3809U-50, Hamamatsu)作为接收单光子荧光信号的探测器。实验中, 从激光器输出的 860 nm 的超短脉冲激光被分束装置分为两路: 一路进入双光子激发共聚焦扫描显微镜系统, 用于激发样品台上的 RPE 细胞, 到达样品上的光功率大约为 5 mW, 它受到 ANSI 关于人眼激光安全使用的限制^[5]。截止滤光片将感兴趣波长的荧光信号滤出后, 由 MCP-PMT 探测, MCP-PMT 工作在 3 kV 电压下, 输出信号由前置放大器预放大后再进入时间相关单光子计数器(TCSPC)(SPC-730, Becker & Hickl); 另一路光作为时间相关单光子计数测量的停止脉冲, 被快速光电二极管接收后进入 SPC-730 计数器板。我们采用的这种以探测到的单光子信号作为时间相关单光子计数器的触发模式被称为反转脉冲基准模式(reversed start stop), 这种模式有别于传统的时间相关单光子计数技术, 确保了高效的光子计数率, 提高了寿命测量的准确度^[6]。整个系统响应小于 30 ps, 且 TCSPC 成像模块最小的时间通道宽度为 813 fs。通过记录图像上每一个像素点的荧光衰减信号, 并由 SPCImage 图像处理软件分析, 可得到荧光强度随时间的衰减曲线及 RPE 的自体荧光寿命图像。本文中所有荧光寿命图像的像素数均为

128 × 128。

3. 样品制备及方法

本试验所采用的样品全部取自健康成年猪的眼球, 4 摄氏度湿房保存, 并保证在宰杀后 6 h 之内将样品制作完毕。

取新鲜眼球, 剪去眼球周围组织及结膜, 在超净台内将猪眼球用 75% 乙醇浸泡 10 min, 用 PBS 液清洗 3 次。无菌处理后将眼球角膜向上置于眼球托上, 自赤道部环形剪开眼球壁, 去除眼前节、房水、玻璃体。由于离体猪眼的视网膜神经上皮经光照后有自由基产生, 而 RPE 细胞被活性氧攻击后发生的脂质过氧化反应会破坏细胞膜结构^[7], 因此样品制备过程在室内进行, 并要及时剥离视网膜(若视网膜不易剥离, 可将眼杯置于 pH7.16 的冷 PBS 中再进行剥离)。剥离视网膜后的眼杯置于环钻基座上, 用环钻切割出黄斑周围 5°—15°区域, 此区域为 RPE 细胞高密度区, 作为样品, 放置在适用于倒置显微镜的载波片进行测量。

4. 结果与讨论

荧光寿命显微成像技术不但能够提供有关荧光团的微环境的功能信息, 而且提供了一种鉴别光谱交叠的多组分复杂样品的手段。利用基于 TCSPC 的荧光寿命成像, 不仅使微弱荧光信号的采集成为可能, 而且通过选择合适的时间窗, 使不同荧光团的时域荧光特性对全光谱的贡献得以鉴别。

图 2 所示为用 860 nm 超短脉冲激光激发,

SPCImage 数据处理软件得到的 RPE 自体荧光寿命图像,原始图像的获取时间为 10 min.

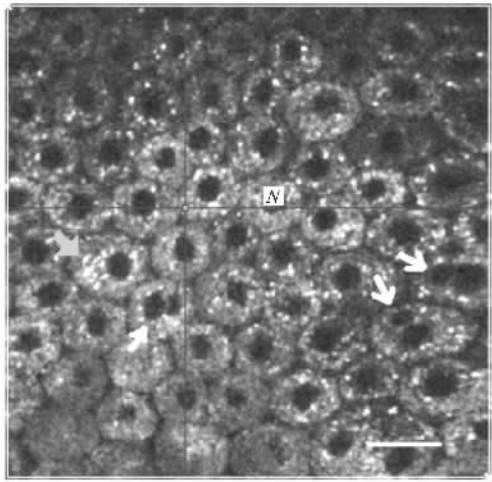


图 2 RPE 细胞自体荧光寿命图像 图中可偶见 RPE 细胞特有的双核结构(如白色箭头所示)以及不规则的条索状荧光(如图中灰色箭头所示),图中十字交叉是样品上进行荧光寿命拟合分析的位置. N 表示细胞核,图中标尺为 $10 \mu\text{m}$

成熟的 RPE 细胞中存在两种最主要的色素颗粒——黑色素颗粒及脂褐素颗粒. 电镜下超微结构表明, RPE 细胞是一种具有极性细胞. 靠近基底部胞质中可见较大的细胞核, 脂褐素颗粒存在于细胞底侧部, 黑色素颗粒存在于细胞中央和上部, 呈椭圆形或杆状^[8]. 我们利用倒置激光扫描共聚焦显微镜的光学切片特点, 将聚焦层定位在 RPE 细胞下部, 采用 860 nm 超短脉冲激光激发样品. 实验发现在 RPE 的细胞质中, 有明显的自体荧光现象; 由于细胞核不具有荧光特性, 因此在图像中呈现黑色(细胞核如图 2 中 N 所示位置), 并在一些细胞中可见 RPE 特有的双核结构(如图 2 中白色箭头所示). 同时我们也发现, 在每个 RPE 细胞质中有着不尽相同的自体荧光强度. 其原因是, RPE 细胞中主要的荧光物质(脂褐质)是 RPE 细胞吞噬光感受器外节盘膜后代代谢产物堆积形成的^[9]; 但当细胞处在不同的代谢状态下时, 细胞质中溶酶体对光感受器外节盘膜的吞噬及消化能力不同^[1], 因此在每个 RPE 细胞中产生了不同的脂褐素颗粒密度. 另外我们发现, 绝大多数脂褐素呈现为 $1\text{--}2 \mu\text{m}$ 的颗粒状, 但在灰色箭头所示的 RPE 细胞中, 却有另一种杆状的荧光色素团也产生明显的荧光现象(如图 2).

图 3(a) 为聚焦于 RPE 细胞中上部(避开细胞核所在层)电子放大 8 倍时得到的荧光寿命和荧光强

度复合图像, 原始图像的采集时间为 10 min. 在此位置成像的 RPE 细胞中, 存在着颗粒状和杆状两种荧光色素颗粒, 这两种色素颗粒无规则地分布在细胞质中, 并在一个 RPE 细胞中发现自体荧光强度明显强于其他部分(如白色圆圈所示). 图 3(b) 是图 3(a) 的寿命分布直方图, 图中的灰度信息代表不同的寿命值分布, 其灰度代表的寿命值信息同样也体现在图 3(a) 的细胞中. 从对荧光寿命分布直方图的分析中可以得到, 所有自体荧光色素成分的寿命集中在 $500 \text{ ps}\text{--}2 \text{ ns}$ 之间. 其中有两种主要的荧光色素成分: 短寿命成分的分布峰值为 750 ps , 长寿命成分的峰值为 1.5 ns . 较之以前报道的 RPE 细胞中单纯颗粒状的脂褐素荧光寿命分布来说, 长短两种寿命值均有增加^[10]. 当激光照射 30 min 后, 杆状荧光消失, 图中只可见颗粒状荧光分布(图 3(c)), 此时寿命分布直方图的变化相当明显: 从具有长短两种寿命的双峰分布, 变为集中分布在 $250\text{--}775 \text{ ps}$ 的单峰(图 3(d)).

虽然一般认为, 脂褐素荧光是眼底最主要的自体荧光来源^[11], 但 Glickman 等人^[12]的研究发现 RPE 细胞中的黑色素、脂褐素及黑色脂褐素颗粒具有十分活跃的自由基, 尤其当其被可见光或紫外线照射后易被激活. Peter 等人^[13]的研究也证明了 RPE 和脉络膜中氧化黑色素强黄光荧光团的性质. 在活体中黑色素的氧化导致多聚黑色素的降解, 形成可溶的荧光素. 自然发生的原位黑色素氧化可表现为类似脂褐素样的金黄色自体荧光, 且过多的曝光会使黑色素荧光性增加. 图 3(a) RPE 细胞中杆状荧光以及非正常的自体荧光现象证明了这一结论. 同时表明, 黑色素颗粒作为一种 RPE 细胞中能够吸收外界强烈光线、保护视网膜的色素颗粒较之脂褐素颗粒更容易发生光致氧化反应.

荧光寿命测量反映的是分子受到光脉冲激发后返回基态之前在激发态平均停留的时间^[14], 荧光强度的衰减可用数学式表达为负指数函数:

$$I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots \quad (1)$$

其中, $I(t)$ 是样品受到光脉冲激发后 t 时刻测量得到的强度, A_1, A_2, \dots 及 τ_1, τ_2, \dots 分别是各拟和组分在 t 时刻的荧光强度和荧光寿命.

RPE 细胞中脂褐素及氧化黑色素荧光寿命衰减参数的测量结果如表 1 所示. 衰减曲线模型建立在双指数拟和基础上, 短寿命为几十至几百 ps, 长寿命可达几个 ns; A_i 为荧光强度峰值; τ_i 为荧光寿命值; χ^2_R 为评估拟和程度优劣的参量. 除此之外,

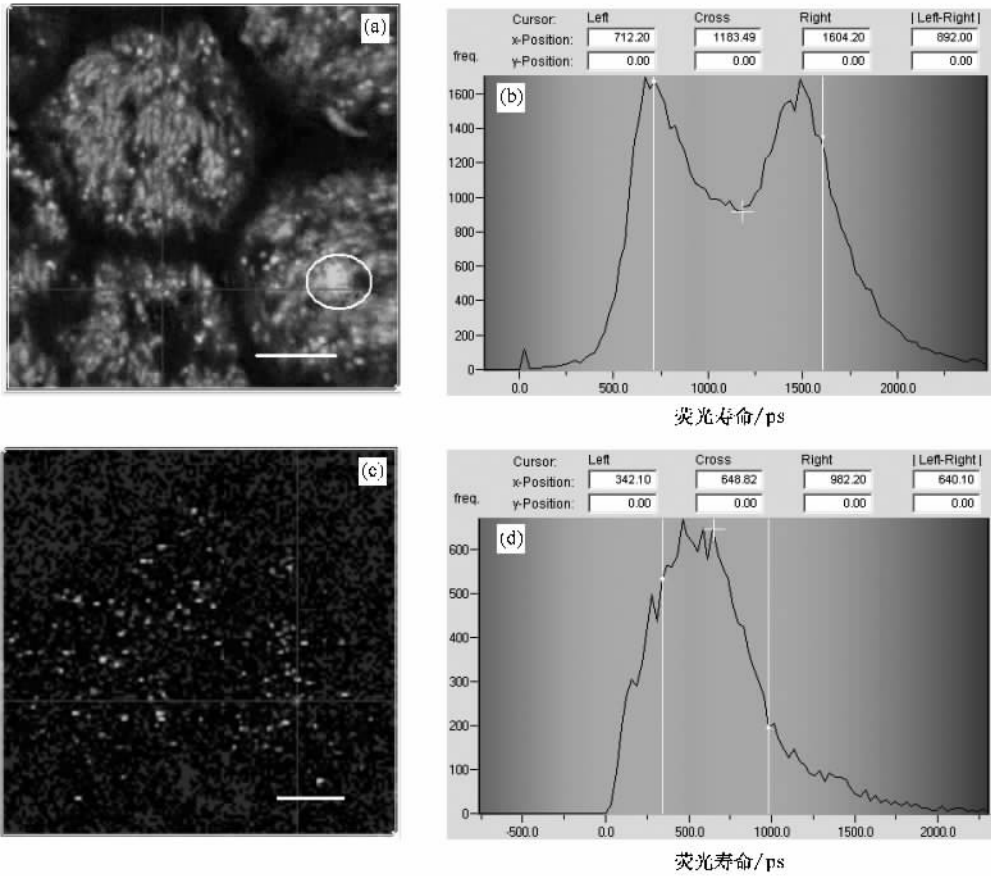


图 3 (a) RPE 细胞中部光学横截面切片荧光寿命图像,采集时间 10 min (b)图(a)荧光寿命图像的寿命分布直方图 (c)激光照射 30 min 后荧光寿命图像 (d)图(c)荧光寿命图像的寿命分布直方图.图中的尺度为 10 μm . 图(b)和(d)中的横坐标为荧光寿命,单位为 ps,纵坐标为荧光寿命的分布频率

$A_i \cdot \tau_i$ 作为一种权重系数用来比较不同组分荧光在总强度中的贡献.从表 1 中可知,脂褐素长短两组分荧光寿命值(84.8 和 1626.7 ps)都小于氧化黑色素的荧光寿命(172.4 和 1725.7 ps);对比正常荧光现象的氧化黑色素II和明亮荧光现象的氧化黑色素III,短寿命值基本一致,而过度曝光后的氧化黑色素长寿命有明显增加;经过激光照射30min后,同样

的颗粒状脂褐素荧光寿命值都缩短了(短寿命组分从 84.8 减小到 56.6 ps,长寿命组分从 1626.7 减小到 1403.7 ps).从 $A_i \cdot \tau_i$ 的变化规律来分析,无论长短寿命的值,脂褐素颗粒的 $A_i \cdot \tau_i$ (81.4, 65.1, 53.6 和 74.4)都要小于氧化黑色素颗粒,过度曝光后的氧化黑色素长寿命的 $A_i \cdot \tau_i$ 值甚至达到 221.5.

RPE细胞中的黑色素颗粒主要形成于动物体的

表 1 脂褐素及氧化黑色素荧光寿命衰减参数

荧光色素颗粒	$A_1/\%$	τ_1/ps	$A_1 \cdot \tau_1$	$A_2/\%$	τ_2/ps	$A_2 \cdot \tau_2$	χ^2_R
I	96	84.8	81.4	4	1626.7	65.1	1.11
II	92.4	172.4	159.3	7.6	1725.7	131.2	1.13
III	87.9	172.2	151.4	12.1	1830.3	221.5	1.76
IV	94.7	56.6	53.6	5.3	1403.7	74.4	1.11

注: I——脂褐素颗粒(图4(a)中颗粒状荧光); II——氧化黑色素颗粒(图4(a)中杆状荧光); III——氧化黑色素颗粒(图4(a)中白色圆圈内荧光); IV——脂褐素颗粒(图4(c)中颗粒状荧光)

胚胎时期,出生后就不再进行黑色素的合成,并有报

道指出黑色素体随着年龄的增长还处在退化过程

中^[15]。它可与初级溶酶体结合,被消化后成为二级溶酶体,而未被消化的成为残渣物(residual body),贮留在胞体内,最终转变为脂褐质颗粒。由此可知,RPE 细胞中这两种重要的色素颗粒之间存在着必然的关联,同时在发生和功能上也有着本质区别。由以上分析可知,利用时间分辨荧光显微成像的方法,可反映出 RPE 细胞中脂褐素及氧化黑色素颗粒在不同环境下其不同状态之间的联系,其荧光寿命衰减参数可用于分辨正常及异常的荧光现象。这对于监控 RPE 细胞中荧光色素团的新陈代谢状态,研究 RPE 细胞的衰老机理有着重要意义。

5. 结 论

RPE 细胞在发挥生理功能时易受光致氧化损

害,同时 RPE 本身也具有强大的抗氧化损伤能力^[16]。其原因目前并无定论,但可以肯定的是,这与 RPE 细胞中两种重要的色素颗粒——脂褐素及黑色素有直接联系。若 RPE 细胞中的脂褐素越多沉淀在黑色素体表面,则越容易导致低阈值的光氧化反应^[17]。临床上 RPE 与光氧化损伤的关系在老年性黄斑变性的发病和预防中起着重要作用。本论文首次采用双光子激发荧光寿命成像的方法,对视网膜色素上皮层细胞内的脂褐素和氧化黑色素颗粒的空间分布及其荧光寿命特性进行了分析,该方法有望发展成为一种高灵敏度的眼底功能成像工具。

- [1] Cubeddu R, Docchio F, Ramponi R, Boulton M 1990 *IEEE J. Quantum Electron.* **26** 2218
- [2] Cubeddu R, Comelli D, Andrea C D, Taroni P, Valentini G 2002 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35** R61
- [3] Lin Z Y, Fu Z, Liu L X, Hu T, Qu J L, Guo B P, Niu H B 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 6701 (in Chinese) [林子扬、付哲、刘立新、胡涛、屈军乐、郭宝平、牛憨笨 2006 物理学报 **55** 6701]
- [4] Tang Z L, Liang R S, Chang H S 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1076 (in Chinese) [唐志列、梁瑞生、常鸿森 2000 物理学报 **49** 1076]
- [5] Schweitzer D, Kolb A, Hammer M 2001 *Proc. SPIE* **4432** 29
- [6] Becker W, Bergmann A, Hink M A, König K, Benndorf K, Biskup C 2004 *Microscopy Research and Technique* **63** 58
- [7] He S K 2005 Basis and Clinic of Retinal Pigment Epithelium (Beijing: Science) p108 (in Chinese) [何世坤 2005 视网膜色素上皮基础与临床(北京:科学出版社)第 108 页]
- [8] Liu Z L, Wu J T 1997 *Chin. J. Practical Ophthalmology* **15** 450 (in Chinese) [刘哲丽、吴景天 1997 中国实用眼科杂志 **15** 450]
- [9] Delori F C, Dorey D D K, Staurenghi G, Arend O, Goger D G, Weiter J J 1995 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36** 718
- [10] Sun Y W, Qu J L, Xu G X, Zhao L L, Niu H B 2006 *Proc. of International Symposium on Biophotonics, Nanophotonics and Metamaterials of IEEE* (IEEE Catalog Number: 06EX1462, ISBN: 0-7803-9773-8) p205
- [11] Kennedy C J, Rakoczy P E, Constable I J 1995 *Eye* **9** 763
- [12] Glickman R D, Dontsov A E, Ostrovsky M A, Kumar N, Vandal M, Gonzales M A 1999 *Proc. SPIE* **3863** 428
- [13] Peter K, Gabriele T, Thomas T L, Jordan J F, Bartz-Schmidt K U, Esser P J 2001 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42** 241
- [14] Liu L X, Qu J L, Lin Z Y, Chen D N, Xu G X, Hu T, Guo B P, Niu H B 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 6281 (in Chinese) [刘立新、屈军乐、林子扬、陈丹妮、许改霞、胡涛、郭宝平、牛憨笨 2006 物理学报 **55** 6281]
- [15] Feeney L 1978 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.: A Journal of Clinical and Basic Research* **17** 583
- [16] Dorey C K, Khouri G G, Syniuta L A, Curran S A, Weirer J J 1989 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30** 1047
- [17] Samokhvalov A, Hong L, Liu Y, Garguilo J, Nemanich R J, Edwards G S, Simon J D 2006 *Photochem. Photobiol.* **81** 145

Autofluorescence lifetime imaging of lipofuscin and oxidized melanin in retinal pigment epithelium cells^{*}

Sun Yi-Wen¹⁾ Qu Jun-Le^{1)†} Zhao Ling-Ling¹⁾ Xu Gai-Xia^{1)‡} Ding Zhi-Hua²⁾ Niu Han-Ben¹⁾

1) *Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education ,
Institute of Optoelectronics , Shenzhen University , Shenzhen 518060 , China)*

2) *State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation , Zhejiang University , Hangzhou 310027 , China)*

(Received 26 March 2007 ; revised manuscript received 28 April 2007)

Abstract

We report on our investigation of the spatial distribution and autofluorescence lifetime characterization of lipofuscin and oxidized melanin in the retinal pigment epithelium cells of the pig eye using a two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy (TPE-FLIM) system , which that is based on a time-correlated single photon counting technique. In particular , we analyzed the difference of autofluorescence lifetimes of these pigment granules in light-induced oxidizing environment. The experimental results showed that the fluorescence lifetime imaging can provide an effective differentiation of multi-component fluorophores , and fluorescence decay can be used to distinguish normal from abnormal fluorescence. TPE-FLIM has the potential to provide a high sensitive imaging instrument for the clinical diagnosis and pathological studies in ophthalmology , and is also of significance to the study of aging mechanism of cells in the fundus.

Keywords : two-photon excitation fluorescence , fluorescence lifetime imaging , retinal pigment epithelium

PACC : 0760P , 8770E , 8732C , 3380K

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 60408011 , 60627003) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No. 5010500).

[†] Corresponding author. E-mail : jlqu@szu.edu.cn