

# OCT 技术在发育生物学中的应用

李剑平<sup>1</sup>, 李栋<sup>2</sup>

(1. 山东大学 信息科学与工程学院, 山东 济南 250100; 2. 山东大学 生命科学学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 基于光学低相干反射测量而发展起来的光学相干层析技术(Optical Coherence Tomography, OCT)是一种新型的成像技术,它可以对强散射介质如生物组织实施非侵入性的快速活体成像。与传统的组织切片相比,OTC 可以大大减少对发育形态成像所需的时间、复杂程度及成本。非接触和非侵入式的成像方式有助于研究个体发育中由基因变异所引起的形态和功能变化,因而在发育生物学的研究当中有着广阔的应用前景。概述了OCT技术在发育生物学当中诸方面的应用情况。

**关键词:** 光学相干层析技术;发育生物学;生物组织;成像

中图分类号:O4361.1-39

文献标识码:A

## Applications of OCT Technique in Developmental Biology

LI Jian-ping<sup>1</sup>, LI Dong<sup>2</sup>

(1. School of Information Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Optical coherence tomography (OCT) based on optical reflectance measurement of low-coherence is a novel imaging technology that performs the noninvasive and high-resolution fast imaging of high scattering media such as biological tissue. OCT could result in a significant reduction in the time, complexity and cost for the imaging of developmental morphology as compared with the conventional histology. The non-contact, noninvasion imaging with OCT in vivo can be used to track the development of single specimen. The use of high-speed OCT imaging technology of cardiac structures enables the functional imaging to be performed in vivo of these specimens. OCT imaging is conducive to the developmental research on the variation of function and morphology due to gene mutation. Applications in developmental biology are presented in this paper.

**Keywords:** optical coherence tomography; developmental biology; biological tissue; imaging

## 引言

光学相干层析技术是近年来继共焦扫描显微镜之后发展起来的新型光学成像技术<sup>[1]</sup>。传统的光学显微镜和共焦扫描显微镜由于受散射光的影响,而不能从具有很强的吸收和散射的生物组织内部获取清晰的图像。OCT 技术将低相干干涉仪与共焦扫描显微技术结合在一起,可滤掉物镜焦点之外的散射光,加之现代计算机图像处理技术的迅速发展,从而使OCT 技术成为一门新兴的层析成像技

术。现代发育生物学因生物化学和分子生物技术而发展迅速<sup>[2]</sup>,其基本任务是研究生物体发育过程及其调控机制。发育过程由基因组中的基因表达来支配,如果能理解基因表达与发育图式之间的关系,那么研究人员就能够判断发育进程中所发生的生理及病理学特征,并从中提出新的科学问题。发育生物学还涉及广泛的临床应用领域,如基因疗法、克隆技术、以及遗传疾病的治疗。伴随着发育生物学和医学的进展,科研人员迫切需要了解活体生物

收稿日期:2004-03-09; 修回日期:2004-05-10

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(02BS042)

作者简介:李剑平(1978-),男,山东济南市人,山东大学信息科学与工程学院光学工程专业硕士研究生,主要从事生物医学光学研究。

组织的情况,如植物胚芽在发育过程中的内部性质变化,动物各组织的生理和病理变化过程等。为了适应这些领域发展的要求,人们开发了一系列生物组织的光子学成像方法,如超短光脉冲与时间门相结合的取像方法、双光子荧光法、光子密度波方法<sup>[3~5]</sup>和光学相干层析技术 OCT 等。还有一些非光子学方法,如核磁共振(MRI)和超声波成像方法等。由于OCT技术具有 $1\sim 15\ \mu\text{m}$ 的高分辨率和 $2\sim 3\ \text{mm}$ 的探测深度,使之在微观上观察胚胎发育过程中任何阶段的动态变化成为可能。除此之外,OCT还可以实现对活体组织的非侵入、无损伤及时探测和成像。从各方面综合评定来看,OCT技术都极可能成为研究发育生物学的一个有力工具。

## 1 OCT 系统工作原理

图1是OCT系统的结构示意图,其主要构成是一个迈克尔逊干涉仪。弱相干光源(相干长度较短)发出的低相干光被 $2\times 2$ 的光纤耦合器分束,分别进入放有反射镜的参考端及被测样品的信号端。干涉仪的样品臂组成一个扫描共焦显微镜,参考臂中的反射镜可沿轴向移动。当参考臂的长度与其到样品散射点的距离均在光源的相干长度之内时,样品的背向散射光(信号光)就与参考臂上返回的光

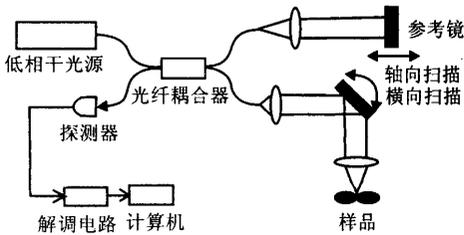


图1 OCT系统结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of the OCT imaging system (参考光)经光纤耦合器汇合产生干涉信号,从而被探测器探测到。探测到的信号经放大、解调和滤波之后便成为记录样品信息的相干信号。相干信号经数字化后被存入计算机中,随后便可以灰度图像或假彩色图像的形式显示出来(信号的强度反映样品的吸收和散射强度)。由于来自样品不同深度的散射信号具有不同的相位延迟,对应于参考臂某一位置,只有来自样品某一特定深度的散射信号才能与参考光相干,而与参考臂的光程差大于一个相干长

度的信号光不能与参考光发生干涉,于是就没有信号。因此,只有在探测光束的焦点处返回的光束才有很强的干涉信号,这样就滤掉了焦点外的杂散光。由此可见,OCT高分辨率和高信噪比的成像能力是通过以下两点实现的:一是利用灵敏的外差探测;二是焦点外的散射光不被探测。

## 2 OCT 技术在发育生物学中的应用

### 2.1 鉴别组织形式

由于OCT采用近红外光,因此它可以对可见光不透明的样品进行高分辨率、非接触及截面层析成像。尽管其成像深度比超声波成像要浅得多,但这已足以获取大多数发育胚胎的解剖结构特征了。在整个发育过程中,观察和跟踪形态变化对于确定基因表达的各个方面都十分有用。OCT技术成像的上述特点对半透明或者高散射样品的正常或异常发育过程中的形态变化分析具有潜在能力。

在发育生物学中,第一例采用OCT技术的是Boppert等人。他们对非洲爪蟾蝌蚪的发育形态进行观察<sup>[6]</sup>,得到的纵向和横向分辨率分别为 $16\ \mu\text{m}$ 和 $30\ \mu\text{m}$ 。图2A~2F给出了正常和异常活体非洲爪蟾的OCT图像( $3\ \text{mm}\times 3\ \text{mm}$ , $300\times 300$ 像素)及相应的组织切片。这些异常是自发而不是诱发的。正常的非洲爪蟾OCT图像(图2A)和组织切片图(图2B)非常对应,神经管组成正常,分布对称且定向正确。两个图中都可以观察到内部鳃。图2C和2D为处于同一发育阶段的异常样品的鲜明对比图,形状不规则的神经管和异常的大眼眶充满了小的、发育不良且不对称的视杯。在此图中,箭头所示为左侧视神经和眼部肌肉纵向的解剖(图2C)。图2E给出了异常样品后部的不良神经管结构。在这些图中,宏观和微观的结构差异都明显可辨。

### 2.2 活体跟踪发育

已证明光学镊子、光学陷阱和双原子显微镜等技术所采用的 $800\ \text{nm}$ 高功率聚焦激光束对细胞DNA有不可逆的损害作用<sup>[7~8]</sup>。如果这些技术被用来辅助人类的体外受精,这些因素就显得十分重要。但由于OCT采用非接触低功率的近红外成像,所以对活体细胞几乎没有损害。另外,由于OCT成像时不需要额外的染色剂,而是依赖于组织的光学散射和折射率的变化。所有这些优势使得OCT可

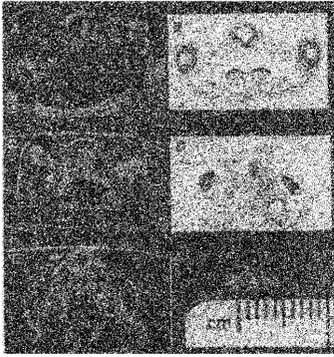


图2 异常非洲爪蟾发育的鉴别<sup>[6]</sup>

Fig. 2 Identification of abnormal xenopus development<sup>[6]</sup>

对发育过程进行几小时、几天甚至几周的成像,从而达到跟踪发育的目的。Boppart 等人在斑马鱼卵受精的一小时后开始每隔 15 min 对同一截面的胚胎取一次像,整个过程持续 24 h,结果获得了一系列 OCT 图像<sup>[6]</sup>。从这些图像中可以观察到细胞分裂和转移的结果。斑马鱼卵和胚胎是半透明的,OCT 图像成为光学显微成像的有力补充。Boppart 等人还利用同样的技术跟踪了非洲爪蟾肢芽的发育<sup>[9]</sup>,获得的图像揭示了一个小的肢芽是如何发育成一个独立足趾的。因此,我们可以说 OCT 可以用来跟踪这些基因的表达形态与形态发生过程。

### 2.3 功能成像

尽管先前的 OCT 活体图像可对生物样品形态特性进行测定,但这些结构仍然是静态的。医疗诊断应用时,对大的有机活体成像必须以较高的速度进行,避免因有机体的运动造成人为假象。功能成像是活体图像的量化,其携带的信息体现了器官系统的功能属性。高速 OCT 能够在实现成像的同时对样品进行配置和处理,是对发育生物学模式动物进行功能成像的有力工具。

对心脏正常和异常发育的研究经常由于无法获取有机体的心血管功能信息而受到限制。与核磁共振和 CT 不同,OCT 可提供高速的活体成像,可以对动态活动如心室喷出比进行定量的评估。这与 M 模式超声波成像和二维心回描技术非常类似。图 3A 是用基于超亮发光二极管(SLD)光源的 OCT 系统获得的正在跳动的非洲爪蟾心室图<sup>[10]</sup>。图中的周期带对应着心室壁在心跳周期中的运动。除了心室腔以外,腹侧和背侧的心室壁均可被辨别。

如图 3A 所示,OCT 光束被锁定并静止在心室上,此时对应着图像中心(箭头)。在此处进行轴向扫描可获得如图 3B 所示的一个麻痹的正常心脏功能光学心电图。OCT 光学心电图可以对心室功能进行量化测量,评估心室机能随时间和其他药物作用的变化,还能实现对心律及心脏终端的最大收缩和舒张尺度、充盈和排空时间等参数进行测量,如图 3B

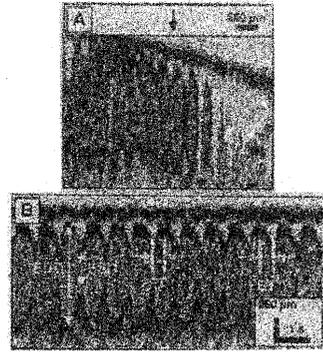


图3 非洲爪蟾的心室图(A)和功能正常的非洲爪蟾 OCT 光学心电图(B)<sup>[10]</sup>

Fig. 3 OCT image and optical cardiogram of a Xenopus heart<sup>[10]</sup>

所示。尽管数据获取速度较慢(30 s/幅),但是基于 SLD 的 OCT 已经足以对离体微结构进行成像并在某一位置获取光学心电图了。由于对活体跳动的心脏进行二维成像需要更快的成像速度,所以采用  $\text{Cr}^{4+}:\text{forsterite}$  激光器作为光源建立的高速 OCT,用 2 mW 的入射功率获得了 110 dB 的高速成像信噪比。用一种新的光学延迟线取代基于机械交流计参考臂扫描的办法,可将图像获取速度提高到每秒 4~8 幅<sup>[11]</sup>。与低速 OCT 相比,高速 OCT 获取的图像不存在由于心脏运动而造成的模糊,并且可在心脏跳动周期内的任意时间捕获图像。对一个始于心脏舒张及心室填充的完整跳动连续成像,可将每幅图像作为帧组成实时的动画电影来反映心脏发育的动态功能行为。

### 2.4 亚细胞级成像

尽管先前的研究已经显示了 OCT 对活体组织形态的成像能力,但是大多数的图像分辨率处于 10~15  $\mu\text{m}$  量级,还不能够分辨细胞的内部结构。随着 OCT 技术的不断进步,其分辨能力也在不断增强,已实现低于 10  $\mu\text{m}$  的高分辨率。美国麻省理工

学院 Fujimoto 教授领导的小组在活动模式动物中成功地获得了 $\sim 1 \mu\text{m}$ 的分辨率<sup>[12]</sup>。据最新报道,奥地利维也纳大学的 Drexler 等人把采用光子晶体光纤和掺钛蓝宝石激光器作为光源的 OCT 系统应用到离体组织获得了 $0.5 \mu\text{m}$ 的分辨率。如此高的分辨率可以对细胞的有丝分裂活动、核质比以及细胞迁移等亚细胞结构及活动进行观察。

#### 2.4.1 活体亚细胞成像

图4为 Fujimoto 等人获得的非洲爪蟾蝌蚪细胞图像,图中可以清楚地看到神经嗅束和各种尺寸的多晶间叶细胞。细胞核与细胞膜的背向散射很强,而细胞质的背向散射很弱。OCT 不仅能够对细胞核与细胞内部结构成像,还能够据此判定细胞的核质比以及有丝分裂状态。由图4中箭头所指的一对细胞可以看到两个明显的细胞核。因为人体细胞的典型平均尺寸与 OCT 的分辨率相符,因此应用此系统就有可能对人体细胞进行活体成像。



图4 非洲爪蟾蝌蚪细胞 OCT 图像<sup>[12]</sup>

Fig. 4 In vivo subcellular level resolution tomogram of *Xenopus laevis*<sup>[12]</sup>

#### 2.4.2 细胞有丝分裂

有丝分裂是一个母细胞经过DNA复制分裂为两个子细胞的过程<sup>[14]</sup>。它是有机体生长以及细胞发育分化的必需过程,不正常的有丝分裂可能导致无规则生长、变异和肿瘤的生成。对活体细胞的有丝分裂进行测定并据此判断分化状态对早期诊断人类肿瘤病变极为重要。

为了证实 OCT 对细胞分裂的鉴别能力, Boppart 等人对单个细胞的有丝分裂活动进行了一系列 OCT 成像<sup>[15]</sup>。所获得的每幅图像中都有一定数量的间叶细胞,细胞尺寸从 $100 \mu\text{m}$ 到低于 OCT 分辨率不等。相对于低背向散射的细胞质,细胞核与细胞膜在高背向散射的区域很明显。在某些细胞中可看到亚细胞结构形态,如在细胞核内部背

向散射较强的区域。一种可能是在这些区域核染质浓度的变化暗示了有丝分裂的活跃。

#### 2.4.3 细胞迁移

同有丝分裂一样,细胞迁移对机体的生长具有重要意义,但癌细胞也会藉细胞迁移而扩散。当肿瘤转移时,癌细胞通常会经过循环系统迁移很长的距离。因为肿瘤在转移前的早期阶段对医学治疗最为敏感,所以如果在早期能够诊断出肿瘤,那么将大大降低病人的死亡率。因此, OCT 亚细胞级分辨率的成像能力对人类早期恶性肿瘤的诊断具有重要意义。

为了证实 OCT 跟踪单个细胞运动的能力, Boppart 等人每隔 10 min 对神经管状黑色素细胞进行一次三维成像<sup>[15]</sup>。图5是根据所测图像而确定的细胞位置的三维示意图。图5中的 A 点~3F 点表示细胞相隔 10 min 的各个位置。这个示意图表明,细胞沿一条曲线迁移(先向背侧,后向腹侧)。图5中 D 点到 E 点的距离比其他距离要大且不连续,说明可能有人为假象。如果分辨率更高且跟踪时间更长的话可以得到更加精确的结果。

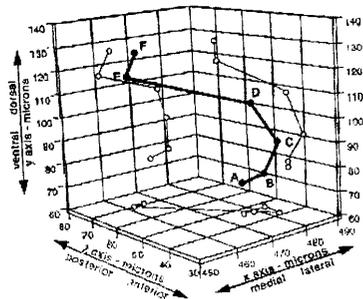


图5 神经冠状细胞迁移的三维示意图<sup>[15]</sup>

Fig. 5 3-D plot of neural crest cell migration<sup>[15]</sup>

## 4 结束语

上述的研究工作主要说明了 OCT 技术在发育生物学和显微学中的应用,证明了 OCT 可以对活体发育形态进行实时反复成像。与传统的组织切片对发育形态的成像相比, OCT 可以大大减少所需时间、复杂程度和成本。在非透明的胚胎中以较高的分辨率进行反复的活体成像可避免杀死标本中的细胞。对于那些很难得到且数量稀少的突变异种标本来说,这种能力显得更加有用。非接触和非侵

入式成像方式使得 OCT 能够在一定时间段内跟踪标本的发育。利用高速 OCT 可以对心脏结构进行功能成像,这有助于对个体发育中因基因变异而引起的形态和功能变化的研究。基于上述原因,发育生物学将成为 OCT 应用的一个重要领域。

#### 参考文献:

- [1] Huang D, Swanson EA, Fujimoto JG, *et al.* Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254: 1178—1181.
- [2] GUI Jian-fang, YI Mei-sheng. *Developmental Biology* [M]. Beijing: Science press, 2002.
- [3] Liu F, Yoo KM, Alfano PR. Transmitted photon intensity through biological tissues within various time windows[J]. *Opt Lett*, 1994, 19: 740—742.
- [4] Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248: 73—76.
- [5] Srausand LO, Tromberg BJ, Haskell RC, *et al.* Tissue characterization and imaging using photon density waves[J]. *Opt Eng*, 1993, 32: 258—266.
- [6] Boppat SA, Brezinski ME, Bouma BE, *et al.* Investigation of developing embryonic morphology using optical coherence tomography[J]. *Dev Biol*, 1996, 177: 54—63.
- [7] Konig K, So PTC, Mantulin WW, *et al.* Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes[J]. *Opt Lett*, 1997, 22: 135—137.
- [8] Konig K, Liang H, Berns MW, *et al.* Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption[J]. *Opt Lett*, 1996, 21: 1090—1092.
- [9] Boppart SA. *Surgical diagnostics, guidance, and intervention using optical coherence tomography*[D]. PhD: Dissertation, 1998.
- [10] Boppart SA, Tearney GI, Bouma BE, *et al.* Non-invasive assessment of the developing xenopus cardiovascular system using optical coherence tomography[J]. *Science*, 1997, 94: 4256—4261.
- [11] Tearney GJ, Bouma BE, Fujimoto JG. High-speed phase and group-delay scanning with a grating-based phase control delay line[J]. *Opt Lett*, 1997, 22: 1811—1813.
- [12] Drexler W, Morgner U, Fujimoto JG, *et al.* In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Opt. Lett.*, 1999, 24: 1221—1223.
- [13] Povazay B, Bizkera K, Drexler W, *et al.* Submicrometer axial resolution optical coherence tomography[J]. *Opt Lett*, 2002, 27: 1800—1802.
- [14] Gilbert SF. *Developmental Biology* [M]. Sunderland, MA: Sinauer Assoc, 1994.
- [15] Boppart SA, Bouma Be, Pitris C, *et al.* In vivo cellular optical coherence tomography imaging[J]. *Nature Med*, 1998, 4: 861—864.

## 新概念“致僵”武器

据报道,美国一名发明家最近研制出新概念“致僵”武器,这种非致命武器依靠“致僵射线”,即利用紫外激光器发出光束,在空气中电离出一条通道,电流经由通道导向目标,使被击中者周身肌肉抽搐、痉挛,直至僵硬而丧失活动能力,进而丢掉武器束手就擒。由于身体组织的保护,被击者的心脏、隔膜等重要器官不会受到影响,因此不会危及生命。但电流超过 250 mA 后会干扰被击者心脏跳动的节律。调节激光器的发射波长,这种“致僵射线”还可以破坏微型芯片,从而使装有芯片的机器,包括飞机、坦克、汽车、舰船及其它武器系统失调从而丧失战斗能力。据说这种激光致僵武器已在实际应用中取得了良好效果。这种新概念“致僵”武器可以可多次使用,射程 100 m, 电流高达 25 mA, 交流频率 100 周,可以用光学瞄准进行非直视射击。第一个样机犹如小手提箱般大小,但新近研制出的激光二极管将会使其尺寸减小。