

基于 NADH 荧光的组织病理生理状态多参数在体监测与评价

施华*, MAYEVSKY Avraham

华中科技大学武汉光电国家实验室(筹), Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 武汉 430074

* 联系人, E-mail: huashi@mail.hust.edu.cn

2010-03-06 收稿, 2010-06-02 接受

高等学校学科创新引智计划(B07038)、高等学校博士学科点专项科研基金(20070487058)和国家自然科学基金(30800339)资助项目

摘要 组织病理生理状态的实时多参数评价,无论在动物实验研究还是临床应用中均具有重要价值,一直是生命科学与医学研究者们广泛关注的热点。众所周知,临床手术过程或重症监护病房中,患者病理生理状态的实时监测是十分必需的。心、脑等重要组织脏器是否处于缺血缺氧等危急状态直接关系到病人的存活与否;早期发现术中和术后次要脏器的微循环障碍有助于提高器官移植等手术的成功率和降低术后并发症的发生率。临床常规使用的监测指标,如血压、心电图、脉搏等,在生命指征的实时评价中发挥了重要作用。然而,目前的常规指标尚不足以从分子水平反映局部组织病理生理状态的早期改变。NADH 是细胞线粒体中氧化还原呼吸链上的内源性关键分子,具有自发荧光性质,可作为一项灵敏的内源性含氧状态指标来反映机体的代谢状态和细胞活力。本文介绍了基于 NADH 自发荧光信号的细胞氧化还原状态在体监测方法,从分子水平预警机体的活力情况,结合微循环血流、血氧饱和度等多种生理参数的同步并行监测,不仅可在活体动物体内进行疾病的病理生理学机制研究和新药的药效评价,还有望应用于临床外科手术和重症监护病房,为机体活力和生命指征的实时监护提供分子水平的动态信息。目前, NADH 荧光一维信号的获取技术发展最为成熟,可实现从离体、活细胞、活体动物乃至临床水平的实时动态监测,已处于临床推广应用阶段。二维动态成像也已经发展到活体动物实验阶段。三维成像由于受制于 NADH 荧光的穿透能力,只能在冷冻组织切片上实现。如何突破因高散射所致的荧光穿透能力受限的瓶颈,最大限度地减少环境因素对荧光信号的干扰,在分子水平实现组织病理生理状态的实时多参数评价,是生物医学光子学领域面临的巨大挑战。

关键词

病理生理
氧化还原
在体监测
线粒体
NADH
自发荧光

实验动物和人体的病理生理状态可通过多种监测方法评价。常规的监测指标有体温、呼吸、脉搏、血压、心电图、脑电图等,虽然它们都具有在体、实时、无损等优点,但由于都是针对全身性的机体功能状态进行监测,组织特异性和时效性较差。在某些情况下,重点监测局部的病理生理状态具有重要的意义。例如,在活体动物实验中,监测局部组织或脏器在不同病理条件下的状态变化,可作为评价药物疗效与

毒性的平台;在手术室或重症监护病房中,对病人的局部组织进行监测,可实时掌握局部组织的活性状态尤其是氧代谢情况,及时采取防治措施。这些局部的生理参数包括局部组织区域内的血流、血氧、血容量等。

由于生物体的复杂性和机体内外环境的多因素作用,在多数情况下,单一的生理指标不能作为评价机体状态的唯一依据。在动物实验及临床中,常常需

英文引用格式: Shi H, Mayevsky A. *In vivo* multiparametric monitoring of tissue pathophysiological conditions based on NADH fluorescence (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2476—2486. doi: 10.1360/972010-388

要根据多项指标综合推断得出结论。各项参数条件发生的先后顺序、因果关系也是评价病理进程的重要依据。因此,随着现代医学的发展及疾病监测技术的发展,人们对病理生理监测指标的需求也逐渐从整体层次(全身性)转向组织层次(局部性),继而在细胞及分子层次窥探疾病发生时的一连串变化,综合考虑多方面的信息,以达到正确判断病情的目的。本文将介绍基于 NADH 荧光的组织病理生理状态实时多参数在体监测与评价方法,并展望其发展趋势。

1 NADH 是评价细胞氧化还原状态的关键指标

细胞的氧化代谢俗称细胞呼吸,表现为细胞消耗葡萄糖和氧而获得能量,通过一系列氧化还原反应完成。首先,葡萄糖在细胞质中通过糖酵解分解成丙酮酸,同时生成 NADH 和 ATP;然后,丙酮酸进入线粒体,通过三羧酸循环进一步分解形成 CO₂, NADH 和 FADH₂; NADH 和 FADH₂ 中的高能电子再通过电子传递链(又称为呼吸链)逐步传到末端的分子氧,最终生成大量 ATP 和 H₂O 分子。

细胞的氧化还原状态可以通过线粒体的含氧状态来衡量。在线粒体电子传递链上, NADH, 黄素蛋白(Fp)和细胞色素都具有自发荧光的性质,易于被检测。那么,哪种分子对线粒体含氧状态变化最敏感?较早开始从事线粒体代谢状态研究的 Chance 等人^[1]在 1973 年指出,在电子传递平衡体系中,分子氧化态和还原态浓度相等时的中点电位(Mid-Potential)决定了其作为“氧指示剂”的灵敏度。氧分子在电子传递链中的中点电位最高,约为 800 mV。而 NADH 的中点电位最低(约-300 mV),相较于电位较高的黄素蛋白(约 0 mV)和细胞色素 c (约 220 mV)而言,能更灵敏地指示线粒体的含氧状态。

NADH 位于电子传递链的起始端,不仅承担了转移电子、维持线粒体功能的重要工作,而且具有易于检测的光学特性。在 300~380 nm 波段(最大吸收峰在 340 nm)光的激发下,还原态的 NADH 可产生荧光(发射波段在 420~480 nm),而氧化态的 NAD⁺则不被激发。因此,监测到的荧光强度的波动可以反映还原态 NADH 含量的相对变化,表征线粒体的氧化还原状态。

黄素蛋白和细胞色素也具有自发荧光性质,但它们的检测信号受到血液中的血红蛋白等环境因素

的影响较大,在活体水平的监测不如 NADH 信号稳定,受重视程度较 NADH 次之。

2 NADH 含量变化与组织病理生理状态密切相关

前文提到, NADH 的含量变化与线粒体氧化还原状态密切相关。当机体出现缺氧、缺血等病理生理状态时,组织供氧失衡,线粒体代谢失常,氧化还原反应的动态平衡被打破, NADH 的含量出现较大幅度地上升或下降。

早在 1955 年, Chance 和 Williams^[2-7]就以大鼠肝脏细胞中分离的线粒体为研究对象,系统研究了氧化磷酸化过程中呼吸链上各成分的性质和动力学变化,把离体线粒体的代谢过程定义为 5 个状态。1962 年 Chance 等人^[8]又率先监测了在体线粒体的不同代谢状态。Mayevsky 等人^[9,10]在此基础上完善了一部分实验数据,总结得出图 1 所示的线粒体代谢状态图。状态 1 对应的是线粒体在不含磷酸受体 ADP 的等渗溶液中,其呼吸链反应速率较慢。待加入过量 ADP 后,反应迅速开始,到达状态 2,但由于底物仅仅由线粒体自身生成,数量有限,反应速率继续受限。此时,呼吸链上的各个成分均为氧化态。加入底物(β -羟丁酸)后,反应迅速进行,呼吸链上各成分被一定程度地还原,可测量出 NADH 的荧光信号。这就是高度活跃的状态 3。状态 3 会一直持续到 ADP 耗尽,这时反应速率又再减慢,到达状态 4——静息态。这时,如果再次加入 ADP,就回到状态 3。直到培养基中的氧耗尽,反应停止,即为缺氧的状态 5。正常情况下,分离的线粒体一般处于状态 4,在加入 ADP 前后, NADH 的荧光强度有很大的跳跃式变化(99%~53%)。

在活体情况下,根据 Mayevsky 等人^[9,10]的观察, NADH 的变化随着不同病理条件(如缺氧、高氧和缺血)的诱导和脑代谢的激活(如扩散性抑制、惊厥和高压氧),呈现出连续的变化谱。而且,组织正常状态下的线粒体介于状态 3 与状态 4 之间,这就可以解释当发生缺氧或缺血时,在体 NADH 荧光强度的增幅远远大于离体情况下状态 4(静息态)到状态 5 的增幅(仅为 1%)。当完全缺氧或心脏骤停时,在体线粒体的代谢状态到达状态 5(死亡),此时 NADH 含量达到最大水平。由于在活体动物中无法建立对应状态 1 和 2 的模型,在体 NADH 的最小值很难获取。但是,已经有足够多的实验数据^[11]显示, NADH 的变化对于缺

氧、缺血或组织激活等病理条件十分敏感,当线粒体面临突发的病理状态时,几乎可以在瞬间表现为 NADH 荧光信号强度改变。

因此, NADH 的含量变化与组织的病理生理状态也密切相关。已知多种疾病伴随着线粒体功能紊乱、氧化还原代谢异常的情况,如癌症、不孕症、糖尿病、心脏病、聋盲、肾病、中风、偏头痛、帕金森氏病、阿尔兹海默病、衰老以及药物中毒等^[12]。通过对 NADH 的荧光动态监测,有望诠释疾病发生发展过程中各种病理生理状态的特征谱,为深入研究疾病、评价治疗方案提供了新的可行性手段。对于危重病人来说,监测其重要脏器的氧化代谢功能是否正常,也十分重要。因此,将 NADH 的监测作为疾病研究和临床监护的辅助手段之一,具有十分重要的应用前景。

3 NADH 监测技术的发展

3.1 一维动态信息的获取与校正

NADH 信号可通过测量其荧光强度获得。普遍观点认为, NADH 的荧光强度与它在线粒体中的浓度成正比,而与它所处的环境(如溶液、线粒体、细胞悬液、组织切片、体外和活体器官等)无关。实验数据也表明,细胞质中的 NADH 对实验结果的影响微乎其微,荧光信号主要来自线粒体中的 NADH^[13-15]。因此,在上述波段,组织荧光强度的变化可以直观地反映线粒体氧化还原状态的变化。荧光强度的增加表示线粒体缺氧,氧化还原反应向还原态的方向转化;反之,荧光强度降低表示供氧充足,氧化还原反应向氧化态的方向转化。

尽管 NADH 的激发与发射波段和细胞中其他内

源性生色团的相应波段互不干扰,但由于测得的信号中包括组织、血管等在同一吸收波长下产生的影响,需要对信号进行校正,才能得到检测区域的 NADH 荧光强度。通常采用经验校正方法,通过计算荧光强度与反射光强度的差值或比值、计算荧光与反射光强度随光程变化的关系、比较不同波长下荧光强度的变化、根据实验获得荧光与反射光强的相关系数等校正 NADH 的信号^[16]。其中,反射光的变化主要受到血管内各种事件的影响,如血容量的改变、血红蛋白含量的改变、离子和水进出细胞的活动等。

Chance 等人^[17]于 1979 年提出用氧化还原比率 (redox ratio)反映线粒体的氧化还原状态变化情况。线粒体呼吸链上参与传递电子的黄素蛋白(Fp),其辅基有两种:黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),都含有核黄素的结构。波长范围在 405~500 nm 的光可以激发氧化态的 FMN 和 FAD 产生荧光,而不激发还原态的 FMN 和 FAD,对还原态的 NADH 也不构成串扰。由于 FMN 和 FAD 荧光光谱重叠,它们在电子传递链中的功能也类似,通常测得的荧光信号即统一视为 Fp 的信号,不加以细分。在 510 nm 可检测到 Fp 的最大吸收峰。对测得的还原态 NADH 和氧化态 Fp 的荧光强度进行比率计算,可以求出氧化还原比率值(Fp/NADH)。根据所关心的侧重点对计算公式进行修正,得到侧重于反映氧化状态变化的比率值 $Fp/(Fp+NADH)$ 和侧重于反映还原状态变化的比率值 $NADH/(Fp+NADH)$,取值范围均在 0~1 之间。

实验证明,氧化还原比率受血红细胞、线粒体其他蛋白质和成像系统等外界因素的影响很小^[17]。因此,相对于单一检测 NADH 或 Fp 的荧光强度变化,氧化还原比率可以更准确更灵敏地衡量线粒体的氧化还原状态。

(i) 体外及活体监测。NADH 的光学测量可以追溯到 20 世纪 50 年代。研究表明,在 $NAD^+/NADH$ 溶液、细胞线粒体悬液、组织切片、离体和在体器官等不同层次, NADH 的荧光光谱特征基本一致^[13]。1962 年,第一篇在体光学监测 NADH 的文章发表在 *Science* 上^[8],此后,有多个课题组开展了大量的 NADH 荧光在体监测方面的研究工作,监测部位包括实验动物的脑部、心脏、肾脏及肝脏等^[13-15]。

通常的监测仪器包括 4 个组成部分:特定波长的光源、输入及输出装置、探测及信号处理装置、信号

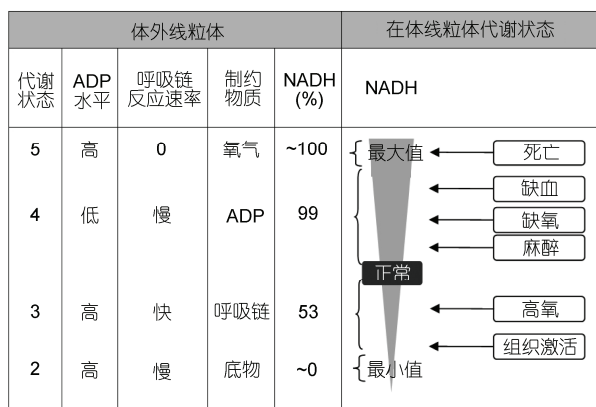


图 1 离体和在体条件下线粒体的不同代谢状态^[11]

记录及存储装置. 用于活体动物 NADH 光学监测的系统原理和组成如图 2 所示.

这一系统最早由 Chance 等人开发, 后来经 Mayevsky 等人不断完善, 形成了能稳定运行的脑组织多参数监测系统. 该系统以汞灯为光源, 利用 3000 r/min 旋转的滤光片轮分别控制 4 个入射和 4 个探测滤光片的飞速切换(图 2(a)和(b)). 光信号的传输通过整合了各种探头的光纤完成, 包括独立的 NADH 和血红蛋白的入射与探测光纤和激光多普勒光纤. 采集到的荧光信号整合成单一的强度值. 光纤探头连接到动物大脑皮层, 可同时获取 4 个参数: (1) 用荧光计监测特定波长(366 nm)激发下产生的 450 nm 荧光信号参数; (2) 用反射计监测 366 nm 光照后的组织反射光信号参数; (3) 从激光多普勒血流仪(图 2(d))导出多普勒光纤探头(图 2(e)), 与主探头整合, 获得脑部微循环血流参数; (4) 利用双波长反射技术, 发射 585 和 577 nm 的光, 测得两个波长下反射光的信号之差(R577-R585)为血氧水平参数(图 2(c)).

该系统能在体实时监测 NADH, 微循环血流及血氧含量的变化, 在脑部缺氧、缺血、皮层扩散性抑制的病理模型中已经得到成功的应用. 如图 3 所示, (a) 当吸入氮气引发脑部缺氧时, 脑血流和血氧含量均降低, 还原态的 NADH 含量增加. 反射光信号分两步下降, 这是因为在 366 nm 波长下, 脱氧血红蛋白的吸收系数略高于氧合血红蛋白, 由于缺氧导致氧饱和度减少, 脱氧血红蛋白的相对含量略微增加, 吸收光增加, 反射光减少. 缺氧还会引起整个皮层区

域动脉血管显著舒张, 从而导致局部血容量的急剧增加, 血红蛋白含量增加, 反射光进一步减少. (b) 闭合两侧颈总动脉产生脑缺血, 引起脑血流和血氧含量降低, 血容量降低, 血红蛋白减少从而反射光增加. 由于脑血管血流的代偿机制, 血容量逐渐获得补充, 反射光强减少. 由于缺血导致缺氧, NADH 升高. 当重新开放血管时, 血流迅速上升, 血容量迅速恢复, 反射光强进一步下降, 供氧充足, NADH 迅速回到基线水平, 线粒体功能较快恢复. 而血管的恢复则需要一段时间^[18].

皮层扩散性抑制是研究脑神经活动的重要模型, 多发生于偏头痛、脑缺血、癫痫和脑外伤等疾病中, 因此受到神经生理学家和临床脑外科医生的重视. 已有光学成像结果表明皮层扩散性抑制在不同皮层区域、不同缺血状态、不同病理模型或药物作用下表现出不同的光学信号特征^[19-24]. Mayevsky 和 Chance 等人^[25]则利用该系统首次揭示了 KCl 诱发皮层扩散性抑制时, 线粒体 NADH 信号同样表现出典型的连续波(图 3(c)), 并且发现局部脑血流和线粒体的耗氧量也随之发生动态变化^[26].

(ii) 临床监测. 1971 年, Jobsis 等人^[27]首次尝试将 NADH 的监测技术应用到人体脑外科手术中. 此后, 随着光学技术的不断发展, NADH 监测得以直接在病人的大脑^[28]、心脏^[29]、肌肉^[30]、肝脏^[31]、肾脏^[32]等部位进行, 尤其在脑外科手术和器官移植手术^[33]中得到了较为成功的应用.

尽管活体动物的皮层扩散性抑制现象早在 1944

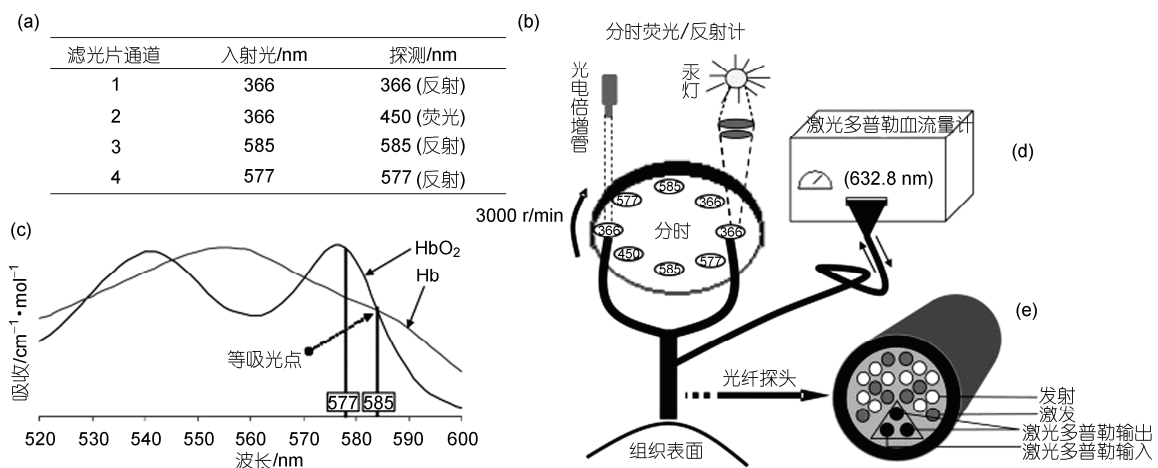


图 2 多参数在体实时监测系统示意图^[18]

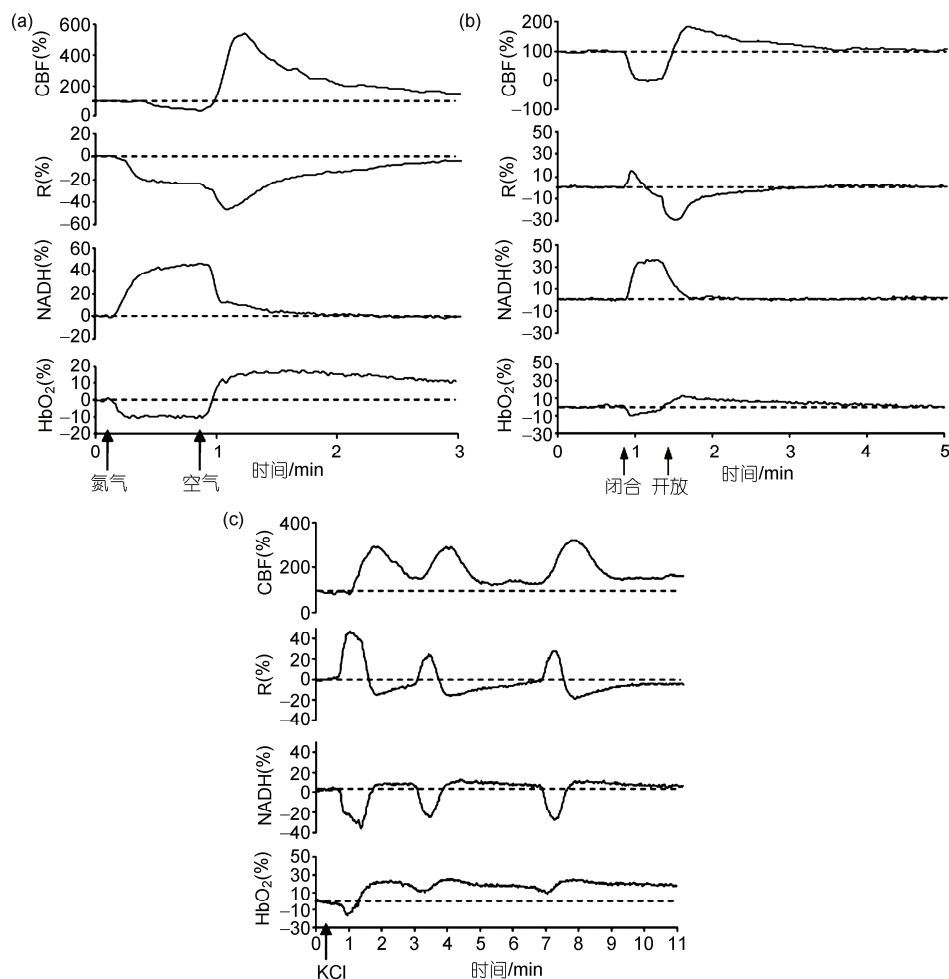


图3 利用多参数在体实时监测系统监测大鼠脑部缺氧(a)、缺血(b)和皮层扩散性抑制(c)的结果^[18]
 CBF表示脑血流, R表示在激发光波长(366 nm)下测得的反射光, NADH表示经过校正的 NADH 荧光, HbO₂表示血氧含量

年就有记录^[34], 直到 20 世纪 90 年代, Mayevsky 等人^[35]才率先在脑外伤病人的脑皮层观测到与动物实验结果相类似的自发、重复性的扩散性抑制周期信号, 提示 NADH 监测手段在脑外科手术和重症监护病房中均有重要的应用前景, 并可用于偏头痛、脑缺血、癫痫和脑外伤等伴随着皮层扩散性抑制现象的疾病监测. 他们进一步研制开发了可用于临床的多参数实时监测系统 CritiView^[36]. 这套系统(图 4(a))已于 2007 年通过美国食品药品监督管理局(FDA)认证. 它可同时测量 NADH 浓度、血流及血容量(血氧)的变化, 除了监测脑部活力外, 还能监测肝脏、肾脏、肠、睾丸、皮肤和尿道的活力. 根据其监测部位的不同, 可搭配不同形状和大小的探头(图 4(b)和(c))使用, 是描述生命征指的有效补充手段, 在指导临床治疗方面能

发挥重要作用.

3.2 二维动态成像和三维冷冻成像

随着成像技术的发展, 人们对 NADH 这种内源性荧光信号的要求从一维提高到多维. 有了定位信息, 就可以知道具体在哪个组织、哪个部位出现了线粒体氧化还原状态的改变. 线粒体氧化还原状态的平衡出现异常, 提示可能发生某些病理生理状态的改变, 如局部组织缺血、缺氧等, 这对病灶的定位以及重要器官的监护有着非常重要的临床意义. 对 NADH 和 Fp 的荧光成像图进行比率计算, 即可得到氧化还原比率的图像, 该图像可以较为准确地描述某一区域的线粒体氧化还原状态.

(i) 二维动态成像. 2001 年, Mironov 等人^[37]

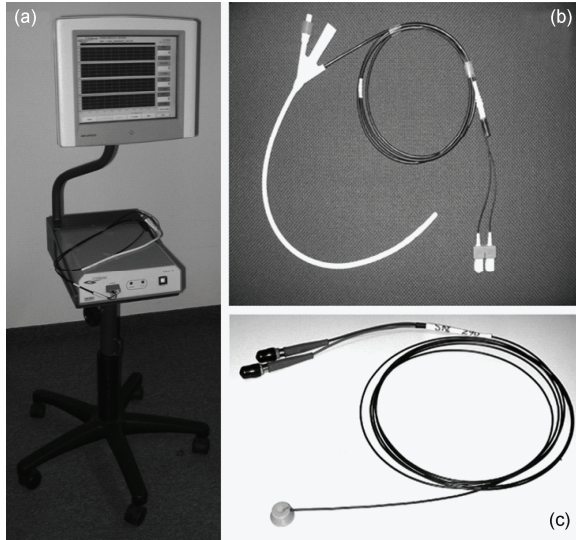


图 4 可用于临床的多参数实时监测系统 CritiView (a)和配套探头(b), (c)

对小鼠的脑干切片进行了 NADH 和 Fp 的荧光成像。2003~2004年, Shibuki 和 Reinert 等人^[38,39]也分别对麻醉大鼠的大脑皮层和小鼠的小脑皮层进行了 Fp 的荧光成像, 监测其神经活动。但是, 由于荧光波长较短, 组织中的高散射使得其穿透深度受限, 目前的技术水平只能对薄组织成像。近两年, Raman 等人^[40]利用 355 nm 的激发光纤, 非接触式地照射大鼠肾脏, 对肾脏在受损缺血和再灌注时的表面 NADH 荧光进行实时监测成像, 并考虑了微环境对荧光信号的影响,

发表了 2 种病理条件下 NADH 光谱差异和整个肾脏表面范围的 NADH 总荧光强度的定量变化结果。本实验室搭建了 NADH 与 Fp 自发荧光与激发反射光同时成像系统, 研究了大鼠大脑皮层在缺氧、富氧、皮层扩散性抑制以及缺血等病理过程中代谢的相关变化模式, 采用原始荧光信号减去激发反射光信号的方法, 获得了一些初步结果。

(ii) 三维冷冻成像。所谓冷冻成像, 就是将活体动物在麻醉存活状态下骤然冷冻至 -80°C 左右, 取出拟研究的组织, 其代谢状态就被固定在冷冻前某一时刻的状态。对组织表面分别进行 NADH 和 Fp 的荧光成像, 计算氧化还原比率, 获得组织表面在某一时刻的氧化还原状态信息。对冷冻的组织进行连续切割, 即可对纵向更深的组织切面进行成像, 克服了光学成像手段受成像深度限制的影响。对不同深度的多个切面图像重构得到三维立体的荧光成像图和氧化还原比率图。

由于 NADH 和 Fp 在冷冻环境下的荧光强度是其在室温下的 10 倍, 冷冻成像相对于室温成像可以提高成像精度^[17]。该方法已成功用于肿瘤组织的边界测定、预测肿瘤的转移潜力、评价光动力治疗效果等方面^[41,42], 是较为理想的监测肿瘤发生发展与治疗的研究手段, 可用于抗肿瘤药物的筛选和药效评价。图 5 显示的是对肿瘤组织冷冻成像得到的荧光图像和氧化还原比率图像^[43]。从氧化状态的氧化还原比率图像(图 5(e))可以看出, 肿瘤组织的氧化程度非常

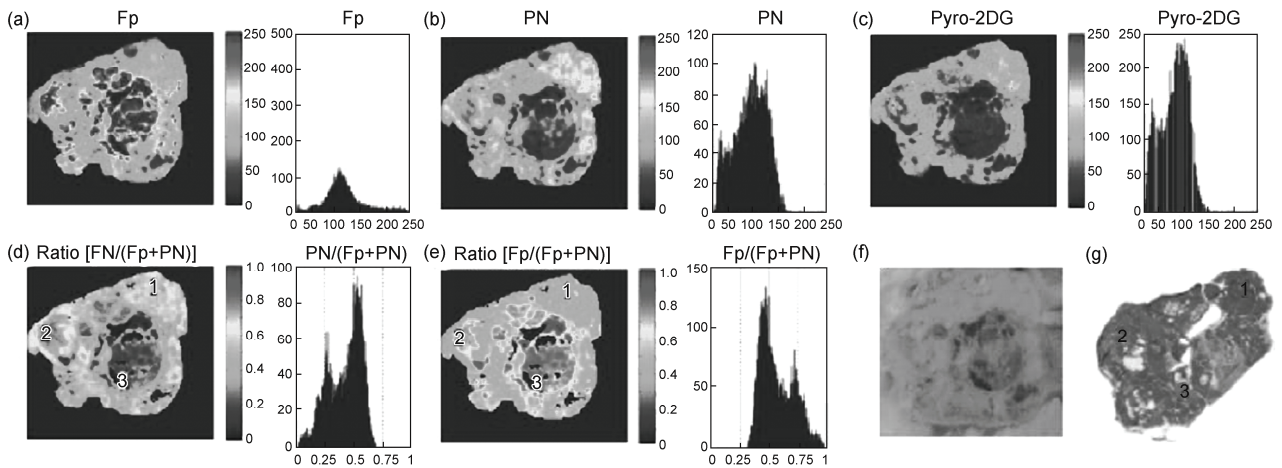


图 5 肿瘤组织的冷冻成像图^[43]

(a) 黄素蛋白荧光图; (b) 还原吡啶核苷酸(主要为 NADH)荧光图; (c) 外源性荧光标记物的成像图; (d) 侧重于还原状态的氧化还原比率图; (e) 侧重于氧化状态的氧化还原比率图; (f) 白光照片; (g) 组织病理切片图

高,与周围正常组织的边界区分较为明显。

3.3 多参数监测为机体活力提供全方位评价

正如疾病往往是多分子、多因素共同作用的结果一样,疾病表现出的各种症状也不尽相同。线粒体功能异常可以引发一连串微循环血流、血容量、血氧等生理和 NADH 及黄素蛋白等分子的变化,单凭自发荧光信号的变化难以全面地判断病理生理状态,需要引入更多的病理生理参数综合评价。

随着光学显微镜和电荷耦合器件(CCD)的不断发展,光学脑成像技术日趋成熟。绝大多数光学脑成像方法是利用光谱特征,对组织中的氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白进行监测,这一方法也称为内源光学信号成像^[44]。用于小动物的脑部内源光学信号成像技术采用特定波长的光直接照射在裸露的大脑皮层,用 CCD 获取成像信息。这一方法揭示了脑神经电活动与皮层微循环之间存在的联系^[45-47],多用于皮层区域的病理状态监测^[21,48]。另一方面,激光散斑成像技术利用相干光照射无规散射体获得随机产生的亮暗斑点,可以对血流动力学进行监测,已成为继激光多普勒技术之后的又一热点。已实现完整大鼠颅骨下脑血流的监测^[49]、特定脑疾病模型的病理状态监测^[50]等。而对于人体的脑部成像,则采用近红外光探头,实现对大脑皮层的无损功能成像,也称为近红外光学脑成像。近年来,该技术已被开发成便携式的仪器^[51],被广泛用于认知学习、脑疾病^[52]等条件下的脑功能活动监测。而对多种监测技术结合的探索也取得了一定进展^[53]。

飞秒激光双光子显微成像技术是近年来逐渐兴起的用于神经生物学研究的技术,具有高空间分辨率地获取脑功能信号的能力^[54],可以无损监测大脑中神经元细胞之间的信息传递。脑电图也是研究大脑活动的重要手段,它利用脑自身微弱的生物电放大记录成为曲线图,描述大脑的神经电活动。早在1875年,科学家就观察到实验动物的脑电图,1929年该技术被用于人体^[55],经不断发展,目前已广泛用于癫痫、脑外伤等脑部疾病的检查。

对于其他组织的监测,同样可以通过光学方法监测局部微循环血流和血氧饱和度等信息,综合全身性的体温、呼吸、脉搏、血压、心率、心电图等指标,能够较全面地对组织的病理生理状态给出评价。本实验室已开始这方面研究的尝试。

多参数监测方法的整合不仅对病理生理状态的判断有益,而且可以揭示各监测参数之间的关联,从各参数响应的快慢推测出病理生理反应中的因果关系,诠释病理生理反应机制。

4 展望

本文重点介绍的是基于 NADH 荧光的组织病理生理状态多参数在体监测与评价的方法。这一方法的发展有赖于 NADH 荧光在体监测技术水平的提高。理想的监测技术应具有以下优点:在光学特性大范围变化条件下均可达到高精度、能与不同的测量系统集成、能反演出荧光团浓度的绝对值或相对变化值、做到实时动态监测且操作简单^[16]。现有的 NADH 荧光在体监测系统,结合了荧光、反射光及血流的检测技术,通过检测血红蛋白的相对变化,提高了荧光信号的准确性。在信号校正方法方面,目前采用的是经验算法,即通过荧光信号减去或除以反射光信号的方法减少组织周围环境对 NADH 荧光信号的影响。但适用于更大血压波动范围和不同监测对象的校正算法和经验参数还有待提出。随着组织光学理论与技术的发展,基于扩散近似理论和 Monte Carlo 模拟的融合算法将能快速、准确地对测得的 NADH 荧光信号进行校正。为降低生物组织高散射对信号检测的影响,新近发展起来的组织光透明技术是一种有效的方法。当高折射、高渗透及生物相容性的光透明剂进入组织后,能有效降低光在组织中的散射,提高光在组织中的穿透深度^[56,57],现已在活体的血流^[58]及荧光^[59]检测等方面表现出了巨大的潜力。把光透明技术与 NADH 荧光检测技术结合起来,将有望克服光在组织中穿透能力受限的瓶颈,最大限度地减少环境因素对荧光信号的干扰,在分子水平实现组织病理生理状态的实时多参数评价。

正如 NADH 是非常敏感的线粒体含氧状态指示分子,基于 NADH 荧光在体监测的组织病理生理状态实时多参数评价方法无论在活体动物实验还是在临床病人监护中都具有重要的应用潜力。

在活体动物实验中,NADH 荧光在体监测已用于缺氧、缺血、药物诱导皮层扩散性抑制等病理生理条件研究,提示在药物毒副作用的评价研究中具有重要价值。该方法可以在活体动物上实时监测,不像传统药理学实验那样需要宰杀大量动物,符合实验动物学的 3R 要求。另外,在同一只动物上对多个器官组织进

行同时监测,既可以解释药物在体内的吸收分布代谢情况,也可以揭示机体在应激状态下的调节机制。

在临床病人的重症监护方面,除了血压、心电等常规监护外,机体次要脏器的缺氧程度监测也非常重要。目前测量机体是否缺氧有两种办法:一是通过脉氧仪连续、无损地测量氧饱和度,但这种方法受到脉搏的影响较大,准确性有一定的局限;二是通过抽血做血气分析与乳酸测定等检测,但需要在非连续的时间点抽血检验,时效性较差,不能及时发现险情。线粒体 NADH 的信号可以实时连续监测,从分子水平预警机体的缺氧程度,对实时掌握局部机体活力状态具有重要的指导意义。当机体面临缺血缺氧的病理条件时,供血优先分布到心脏和脑,而皮肤、肠道等次要脏器最先表现出缺血缺氧的状态,更有可

能由于微循环障碍而导致次要器官功能损伤甚至坏死。而现有的监测手段不能及时发现微循环障碍,当发现血压、脉氧异常时已为时过晚。因此,综合线粒体与微循环血流血氧信息,有望更为灵敏地监测到机体的局部功能失常状态,具有重要的临床意义。

综上所述,多种监测参数的组合为组织病理生理状态提供了更为全面的诠释,将 NADH 荧光信号与其他生理参数的在体监测相结合,可从分子水平及早观察到机体出现的病理生理险情,有助于更全面地评价组织病理生理状态,具有重要的指导意义和临床应用潜力。同时,如何对测得的荧光信号进行更有效的校正,最大程度地消除血红蛋白等环境因素对荧光信号的影响,也是对这一领域科研工作者的重大挑战。

致谢 感谢华中科技大学骆清铭教授和张智红教授的宝贵意见。作者之一 Avraham Mayevsky 教授原任职以色列 Bar Ilan University,受“高等学校学科创新引智计划”(B07038)资助在本单位合作研究期间完成此文。本文部分内容与华中科技大学顾问教授 Britton Chance 进行过讨论,在此一并致谢。

参考文献

- 1 Chance B, Oshino N, Sugano T, et al. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. *Adv Exp Med Biol*, 1973, 37: 277—292
- 2 Chance B, Williams G R. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*, 1955, 176: 250—254
- 3 Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem*, 1955, 217: 383—393
- 4 Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: II. Difference spectra. *J Biol Chem*, 1955, 217: 395—407
- 5 Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: III. The steady state. *J Biol Chem*, 1955, 217: 409—428
- 6 Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: IV. The respiratory chain. *J Biol Chem*, 1955, 217: 429—438
- 7 Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, 1955, 217: 439—451
- 8 Chance B, Cohen P, Jobsis F, et al. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*: The microfluorometry of pyridine nucleotide gives a continuous measurement of the oxidation state. *Science*, 1962, 137: 499—508
- 9 Mayevsky A, Chance B. Intracellular oxidation-reduction state measured *in situ* by a multichannel fiber-optic surface fluorometer. *Science*, 1982, 217: 537—540
- 10 Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored *in vivo* by fiber optic surface fluorometry. *Brain Res Rev*, 1984, 7: 49—68
- 11 Mayevsky A, Chance B. Oxidation-reduction states of NADH *in vivo*: From animals to clinical use. *Mitochondrion*, 2007, 7: 330—339
- 12 Scheffler I E. A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives. *Mitochondrion*, 2001, 1: 3—31
- 13 Mayevsky A, Rogatsky G G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: From animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292: C615—640
- 14 Ince C, Coremans J, Bruining H. *In vivo* NADH fluorescence. *Adv Exp Med Biol*, 1992, 317: 277—296
- 15 Pogue B W, Pitts J D, Mycek M A, et al. *In vivo* NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2001, 74: 817—824
- 16 Bradley R, Thorniley M. A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence. *J R Soc Interface*, 2006, 3: 1—13
- 17 Chance B, Schoener B, Oshino R, et al. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*, 1979, 254: 4764—4771

- 18 Mayevsky A. Mitochondrial function and energy metabolism in cancer cells: Past overview and future perspectives. *Mitochondrion*, 2009, 9: 165—179
- 19 Chen S B, Li P C, Gong H, et al. Cortical spreading depression in rats—monitoring biparietally with optical intrinsic signal imaging. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 2008, 27: 29—35
- 20 Chen S B, Li P C, Luo W H, et al. Origin sites of spontaneous cortical spreading depression migrated during focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 2006, 403: 266—270
- 21 Chen S B, Li P C, Luo W H, et al. Time-varying spreading depression waves in rat cortex revealed by optical intrinsic signal imaging. *Neurosci Lett*, 2006, 396: 132—136
- 22 Chen S B, Feng Z, Li P C, et al. *In vivo* optical reflectance imaging of spreading depression waves in rat brain with and without focal cerebral ischemia. *J Biomed Opt*, 2006, 11: 034002
- 23 Wang Z, Li P, Luo W, et al. Peri-infarct temporal changes in intrinsic optical signal during spreading depression in focal ischemic rat cortex. *Neurosci Lett*, 2007, 424: 133—138
- 24 Wang Z, Luo W, Li P, et al. Acute hyperglycemia compromises cerebral blood flow following cortical spreading depression in rats monitored by laser speckle imaging. *J Biomed Opt*, 2008, 13: 064023
- 25 Mayevsky A, Chance B. Repetitive patterns of metabolic changes during cortical spreading depression of the awake rat. *Brain Res*, 1974, 65: 529—533
- 26 Mayevsky A, Weiss H. Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1991, 11: 829—836
- 27 Jobsis F, O'Connor M, Rosenthal M, et al. Fluorometric monitoring of metabolic activity in the intact cerebral cortex. In: Somjen G, ed. *Proceedings of International Symposium on Neurophysiology in Man*, 1971 July 20—22, Paris. Amsterdam: Excerpta Medica International Congress Series No. 253, 1971. 18—26
- 28 Austin G J R, Chance B, Barlow C. Noninvasive monitoring of human brain oxidative metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 1978, III: 1445—1455
- 29 Barlow C, HARDEN III W, Harken A, et al. Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. *Crit Care Med*, 1979, 7: 402—406
- 30 Guezennec C, Lienhard F, Louisy F, et al. *In situ* NADH laser fluorimetry during muscle contraction in humans. *Eur J Appl Physiol*, 1991, 63: 36—42
- 31 Tanaka A, Kitai T, Iwata S, et al. Delayed oxidation of intramitochondrial pyridine nucleotide oxidoreduction state as compared with tissue oxygenation in human liver transplantation. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1182: 250—256
- 32 Mayevsky A, Nakache R, Merhav H, et al. Real time monitoring of intraoperative allograft vitality. *Transplant Proc*, 2000, 32: 684—685
- 33 Mayevsky A, Sonn J, Luger-Hamer M, et al. Real-time assessment of organ vitality during the transplantation procedure. *Transplant Rev*, 2003, 17: 96—116
- 34 Leao A. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 1944, 7: 359—390
- 35 Mayevsky A, Doron A, Manor T, et al. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res*, 1996, 740: 268—274
- 36 Mayevsky A, Dekel N, Oren L, et al. Mitochondrial dysfunction: Bench-to-bedside optical monitoring of tissue vitality. In: Mahadevan-Jansen A, Petrich W, Alfano R R, et al, eds. *Proceedings of SPIE*, 2008 January 19, San Jose, USA. Proc SPIE 6853 2008. 68531B
- 37 Mironov S, Richter D. Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice. *J Physiol*, 2001, 533: 227—236
- 38 Shibuki K, Hishida R, Murakami H, et al. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol*, 2003, 549: 919—927
- 39 Reinert K C, Dunbar R L, Gao W, et al. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex *in vivo*. *J Neurophysiol*, 2004, 92: 199—211
- 40 Raman R N, Pivetti C D, Matthews D L, et al. Quantification of *in vivo* autofluorescence dynamics during renal ischemia and reperfusion under 355 nm excitation. *Opt Express*, 2008, 16: 4930—4944
- 41 Zhang Z, Blessington D, Li H, et al. Redox ratio of mitochondria as an indicator for the response of photodynamic therapy. *J Biomed Opt*, 2004, 9: 772—778
- 42 Li L, Zhou R, Xu H, et al. Quantitative magnetic resonance and optical imaging biomarkers of melanoma metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 6608—6613

- 43 Zhang Z, Li H, Liu Q, et al. Metabolic imaging of tumors using intrinsic and extrinsic fluorescent markers. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20: 643—650
- 44 Grinvald A, Lieke E, Frostig R D, et al. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 1986, 324: 361—364
- 45 Malonek D, Grinvald A. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: Implications for functional brain mapping. *Science*, 1996, 272: 551—554
- 46 Frostig R, Lieke E, Ts'o D, et al. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by *in vivo* high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6082—6086
- 47 Vanzetta I, Grinvald A. Coupling between neuronal activity and microcirculation: Implications for functional brain imaging. *HFSP J*, 2008, 2: 79—88
- 48 Luo W, Li P, Chen S, et al. Differentiating hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex during non-noxious and noxious electrical stimulation by optical imaging. *Brain Res*, 2007, 1133: 67—77
- 49 Li P, Ni S, Zhang L, et al. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging. *Opt Lett*, 2006, 31: 1824—1826
- 50 Luo W H, Wang Z, Li P C, et al. A modified mini-stroke model with region-directed reperfusion in rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 973—983
- 51 郑毅, 骆清铭, 刘谦, 等. 适于脑功能活动检测的便携式近红外光谱仪的研制. *中国生物医学工程学报*, 2007, 26: 898—902
- 52 Pucci O, Stepanov S, Toronov V. Transcranial near-infrared spectroscopy of smoking brains. *J Innov Opt Health Sci*, 2009, 2: 227—234
- 53 LI T, LI L, DU P, et al. Pinpoint source localization for ocular nonselective attention with combination of ERP and fNIRI measurements. *J Innov Opt Health Sci*, 2008, 1: 195—206
- 54 Zhou W, Liu X, Lv X, et al. Monitor and control of neuronal activities with femtosecond pulse laser. *Chinese Sci Bull*, 2008, 53: 687—694
- 55 Swartz B E, Goldensohn E S. Timeline of the history of EEG and associated fields. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1998, 106: 173—176
- 56 Tuchin V. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. *J Phys D Appl Phys*, 2005, 38: 2497
- 57 Zhi Z, Han Z, Luo Q, et al. Improve optical clearing of skin *in vitro* with propylene glycol as a penetration enhancer. *J Innov Opt Health Sci*, 2009, 2: 269—278
- 58 Zhu D, Wang J, Zhi Z, et al. Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method. *J Biomed Opt*, 2010, 15: 026008
- 59 Matsui A, Lomnes S, Frangioni J. Optical clearing of the skin for near-infrared fluorescence image-guided surgery. *J Biomed Opt*, 2009, 14: 024019

***In vivo* multiparametric monitoring of tissue pathophysiological conditions based on NADH fluorescence**

SHI Hua & MAYEVSKY Avraham

Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Real-time multiparametric evaluation of tissue pathophysiological conditions is of great value in animal experiments and for clinic applications, and is receiving more and more attention by researchers in life sciences and medicine. It is well known that the real-time monitoring of pathophysiological conditions in patients is required during surgical procedures and in intensive care units (ICUs). Whether a critical condition such as ischemia and hypoxia can be detected in vital organs, such as heart and brain, is directly related to patient survival. Early detection of microcirculatory disturbances in non-vital organs will also help to increase the success rate of surgeries such as organ transplantation, and decrease the incidence of post-operative complications. Conventional parameters, such as blood pressure, electrocardiogram and pulse, which are monitored in clinics, play important roles in the real-time evaluation of vital signs; however, they do not provide enough information to expose early changes in local tissue pathophysiological conditions at the molecular level. NADH is an intrinsic autofluorescent molecule involved in the redox reactions of the mitochondrial respiratory chain and serves as a sensitive marker, reflecting metabolic states and cell vitality. This paper introduces *in vivo* techniques to monitor the cellular metabolic states based on NADH autofluorescence. This method, combined with synchronous parallel monitoring of multiple parameters such as microcirculatory blood flow and hemoglobin oxygenation, will not only be useful in studies of pathophysiological mechanisms and evaluation of drug effects *in vivo*, but could also be clinically applied in surgeries and ICUs to provide real-time dynamic information of vital signs. At present, the technique of monitoring one-dimensional NADH fluorescent signals is well developed, and has been applied from *in vitro* experiments to living cells, animals, and in clinical studies. The two-dimensional imaging technique has been previously used *in vivo*. However, three-dimensional imaging has only been successful in frozen tissue slices due to the limited penetration of NADH. There are some large challenges that need to be addressed in the future, such as how to overcome the bottleneck of limited light penetration caused by high scattering in biological tissues; and how to maximally reduce environmental interference of fluorescent signals. Once these problems have been overcome, it should be possible to achieve real-time multiparametric monitoring of tissue pathophysiological conditions at a molecular level.

pathophysiology, redox, *in vivo* monitoring, mitochondria, NADH autofluorescence

doi: 10.1360/972010-388