

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2016.12.001

专题:数字诊疗装备研发

同步双光谱受激拉曼成像用于实体瘤无标记快速病理检测

刘琦,贺若愚,徐永奎,张莉丽,季敏标
复旦大学物理系,上海 200433

【摘要】受激拉曼散射(SRS)显微成像技术是近年来发展起来的新型无标记分子成像技术,具有高灵敏度、高特异性和高分辨率等优势。其对分子的选择性来源于分子的内禀振动特性,因而可以针对生物组织中的不同化学组分进行分别成像,如脂质、蛋白和核酸等。该课题组前期的工作初步证明了基于脂质和蛋白的双光谱SRS技术可用于脑肿瘤边界的术中活体成像以及离体标本的病理检测。但目前多光谱成像技术依赖于波长调谐或光谱编码等过程,不能实时得到病理图像。本文将围绕发展快速无标记病理检测方法为目标,以利用锁相放大器的相位敏感性发展而来的双光谱SRS成像技术为核心,结合同步的图像处理算法进行实时的数字病理诊断。此项技术可以大大提高肿瘤边界的探测精度以及术中病理成像的速度,从而提高手术治疗的精准度。

【关键词】实体肿瘤;受激拉曼散射;光谱成像;无标记显微镜;病理检测

【中图分类号】R312;O437.3

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2016)12-1189-06

Simultaneous bi-spectral stimulated Raman scattering microscopy for the pathological detection of label-free solid tumor

LIU Qi, HE Ruoyu, XU Yongkui, ZHANG Lili, JI Minbiao
Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Stimulated Raman scattering (SRS) micro-imaging, a novel label-free imaging technique, has high sensitivity, specificity and resolution. SRS utilizes the intrinsic molecular vibrations to selectively detect different biomolecules, such as lipids, proteins and DNA. The previous results show lipid/protein-based bi-spectral SRS can be used for the pathological detection of specimen *in vitro* and intraoperative imaging *in vivo*. However, the real-time pathological images can't be obtained by using current multi-spectral SRS imaging techniques which are dependent on wavelength tuning and spectral encoding. The study aims to develop a fast label-free pathological detection. The bi-spectral SAS imaging which is developed from the phase sensitivity of lock-in amplifier is combined with the simultaneously image processing algorithm to realize the real-time digital pathological diagnosis. The proposed method can significantly increase the detection precision of tumor margins and intraoperative imaging speed, improving the precision of surgical treatment.

Keywords: solid tumor; stimulated Raman scattering; spectral imaging; label-free microscopy; pathological detection

前言

目前外科手术仍然是实体肿瘤治疗的主要手段之一,手术的精准性直接影响预后效果。肿瘤手术治疗的目标是尽可能彻底切除肿瘤组织,同时尽可能完整保留健康组织。但绝大多数手术仍十分倚重

医生的肉眼和触觉,靠经验做出主观判断,无法精确定位肿瘤边界。虽然磁共振、PET、CT等成像技术能在大尺度范围对人体进行术前肿瘤成像和诊断,但无法实现术中成像,即使有些能用于导航,其定位精度也不高。而传统的病理手段,如HE染色,受限于缓慢的标本制备和染色过程,更不能用于在体诊断。目前国际上在术中诊断研究领域常见的手段主要有荧光成像、共聚焦显微成像和拉曼光谱等。基于荧光成像指导的手术,例如用5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)分子标记显像肿瘤区域,可以应用到高级别肿

【收稿日期】2016-10-19

【基金项目】国家重点研发计划(2016YFC0102100)

【作者简介】刘琦, E-mail: 15210190016@fudan.edu.cn

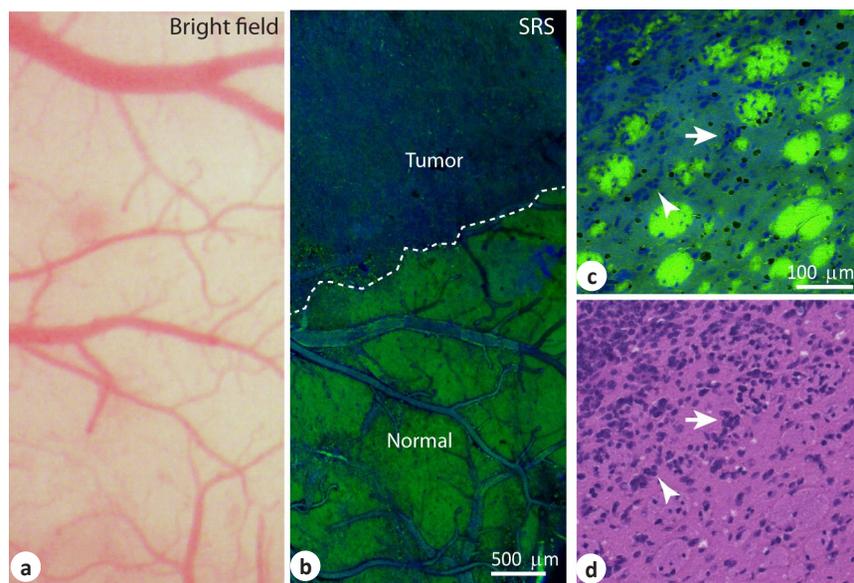
【通信作者】季敏标, E-mail: minbiaoj@fudan.edu.cn

瘤但对低级别肿瘤的特异性很差^[1]。基于荧光标记的术中聚焦显微成像能得到术中的高分辨图像,但同样有非特异性标记的限制^[2]。况且外源标记物的安全性有待进一步检验。基于拉曼光谱的诊断方法可以通过复杂的光谱分析区分肿瘤与正常组织,但无法得到组织的病理图像,也无法避免因组织异质性带来的干扰^[3]。因此,发展术中快速病理成像技术探测肿瘤边界已成为精准手术治疗的关键。我们提出以受激拉曼散射(SRS)成像技术为基础,结合骨肿瘤为代表模型验证此技术的病理检测效果,并由此获得国家重点研发项目数字诊疗装备专项的支持。

1 研究背景和意义

相干拉曼散射显微镜包括相干反斯托克斯拉曼(CARS)和SRS显微成像技术,是哈佛大学谢晓亮教授发明的新型、无标记分子影像方法^[4-6]。这种技术根据生物分子的指纹振动(拉曼)光谱区分成像组织中的不同化学成分,如脂类、蛋白和核酸等。相干拉曼与传统自发拉曼散射最大的区别在于其通过非线性效应得到大大增强的信号强度($10^3\sim 10^5$ 倍增益),因而能实现快速成像^[6]。对比相干拉曼的两种主要

方法,SRS比CARS更有优势,逐渐成为国际主流的相干拉曼成像技术^[6]。这种无标记成像技术避免了传统病理所需的样品处理过程,有望成为一种术中快速病理手段,甚至实现在体实时诊断。近年来SRS在生物医学领域展现了越来越多的独特应用,包括肿瘤无标记病理成像^[7-8]、脂类定量分析^[9]和小分子药物传输^[10]等。本项目申请人曾在谢晓亮教授组与密歇根医学院的脑外科医生们合作,首次将双光谱SRS成像技术成功应用到脑肿瘤的无标记探测,不但在小鼠模型中实现脑肿瘤的活体探测^[7],而且进一步用SRS定量分析方法对人脑肿瘤手术样本进行病理诊断和分类^[8]。双光谱SRS主要利用肿瘤组织和正常组织中脂类和蛋白相对含量的显著差异,对脂类和蛋白进行分别成像,得到与HE金标准类似的诊断效果(图1)。申请人将这方面的工作两次发表在Science Translational Medicine杂志上,受到学术界同行的一致认同和媒体的广泛关注,包括BBC新闻等^[7-8]。更重要的是这些工作打开了SRS技术在临床应用上的大门,国际首台SRS病理显微镜已于2015年进入密歇根医学院脑外科手术室,协助进行快速病理检测。



In the *in vivo* image of a mouse brain, bright field microscope couldn't detect the tumor (fig.1a), and SRS microscope clearly visualized the tumor/normal margin in the same field of view (fig.1b). In the thin frozen sections of the mouse brain, two-color SRS (fig.1c) and HE staining (fig.1d) of the same tissue section showed similar histological results. (lipids: green; protein: blue)

图1 小鼠脑肿瘤模型的SRS成像结果

Fig.1 Stimulated Raman scattering (SRS) imaging of mouse brain tumor model

作为一种光谱成像技术,SRS需要平衡成像速度和光谱信息以针对不同的生物医学应用。对于那

些需要精细化学成分分析的问题,可以适当牺牲成像速度以获取更丰富的光谱细节;而对于那些只需

要少量光谱信息就可以实现的医学应用,如何提高光谱成像速度则是待解决的关键问题。我们前期工作的成功证明了肿瘤病理成像属于后者,基于脂质/蛋白的双光谱 SRS 成像可以成为有效的病理检测方法^[7-8]。国际上现有的光谱成像方法主要有:(a)基于皮秒光波长调谐方法^[7];(b)基于飞秒光谱整形方法^[11];(c)基于飞秒光谱聚焦方法^[12];(d)基于飞秒光谱编码方法^[13-14];(e)基于光栅和阵列探测器方法^[15-16]。以上能实现同步多光谱成像的只有(d)和(e),目前尚各有缺点:基于飞秒光谱编码方法由普度大学程继新教授发明,需对宽谱激发光进行不同频率的编码调制和傅里叶分析,但现在能实现的最快速度仅 30 s/帧^[14];基于光栅和阵列探测器方法只能用于组织切片成像,无法用于在体组织成像。因此实现快速 SRS 光谱成像(<1 s/帧)是国际上的研究趋势,也是 SRS 走进临床需要实现的关键技术。

在医学应用方面,虽然 SRS 技术目前最成功的案例是申请人在脑肿瘤领域的研究,国际上正在展开对其他类型的肿瘤成像研究,比如乳腺癌、胰腺癌等。骨与软组织肿瘤的病理种类多,形态学变异大、不典型,一直是实体瘤中病理学诊断公认的最难点^[17-18]。并且这类肿瘤的治疗必须以穿刺活检结果为基础,但穿刺活检的准确率和诊断成功率较低,影响了诊治和预后^[18]。快速无标记病理检测则可以实时指导穿刺活检取材,将大大提高穿刺活检的准确率。其次,发展术中的快速实时病理检测将逐渐淘汰术中冰冻这一传统方法,大大提高对手术切缘的判断效率和准确率^[18-19]。

综上所述,现有的技术无一能真正实现多光谱实时成像,极大限制了 SRS 的临床应用。本项目将发展实时双光谱 SRS 成像技术,结合新的图像处理算法实现快速病理检测,并以骨肿瘤为模型验证检测的效果。

2 总体目标

本项目计划在前期 SRS 成像工作基础之上,发展出新的快速光谱成像技术,突破现有技术瓶颈,实现脂类和蛋白的双通道同时成像,且进行实时图像分析与合成,无需调节激光器或任何光路元件,直接给出病理图像和数字化诊断结果,实现实体瘤快速病理检测。项目的目标是发明一种实时、双光谱 SRS 成像新技术,并实现快速病理成像。在光谱成像速度上达到国际领先水平,预期将突破现有的多光谱成像速度上限,达到超过 1 s/帧的双光谱成像速度,

实现同步双色 SRS 成像,实时给出基于脂类和蛋白分布的复合病理图像;在应用上,将以骨肿瘤手术标本为例进行病理成像,与 HE 金标准作比较检验病例检测的效果,预期两者的相关性要高于 95%;另外,基于此项目的专利申请将不少于 2 项。这种快速无标记病理检测新方法有望克服目前手术中缺乏快速诊断方法的局限,帮助医生提高对肿瘤边界的判断效率和精度,实现精准手术治疗。目标的实现将为今后产业化奠定技术基础,也将推动中国在新型无标记光学成像领域的引领性前沿研究,加速新成像技术的转化,促进我国数字诊疗装备进入国际先进行列。

3 研究内容和方法

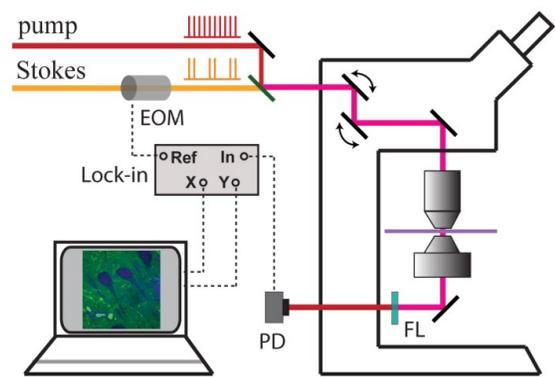
本项目使用 SRS 显微镜作为一种快速、无标记的分子成像技术用于肿瘤的快速病理检测。SRS 基本原理可类比于受激辐射,当泵浦和斯托克斯光同时作用于样品时,原本微弱的自发拉曼散射过程受到极大的激励,得到 $10^3 \sim 10^5$ 倍的增益。当泵浦和斯托克斯光的频率差刚好等于分子的某个特征振动频率时,来自这种分子的受激拉曼信号就会被探测到。因此,通过调节泵浦和斯托克斯光的相对波长,就可以选择性探测不同的生物分子,如脂类、蛋白和核酸等。由于 SRS 分子选择性是内源性的(来自化学键的本征振动),这种高灵敏度的无标记成像技术在生物医学成像,特别是快速病理成像中有着很好的应用前景。虽然单色的受激拉曼能达到视频成像速度,但成像速度和光谱信息量成反比关系,一旦需要采集多个光谱点成像速度就会成倍下降。我们考虑到在实际病理检测中往往只需要少量的分子信息就足够做病理分析,比如金标准 HE 染色法只使用两种染料分子即能得到双色病理诊断信息(紫蓝色的苏木精和红色的伊红)。我们之前的工作也表明只需用双光谱 SRS 对组织中的脂类和蛋白进行复合成像就足以得到细胞核形态、组织形态以及脂/蛋白比例等信息用于诊断,实现与 HE 相近的诊断效果(图 1)。由于 HE 染色法丢失了脂质的信息,双光谱 SRS 有可能提供比 HE 更丰富的病理信息,这在我们前期的工作中也已被初步证实(图 1c 和图 1d)。因此我们将在双光谱 SRS 成像基础上提高成像速度,实现实时的病理检测。

本项目的具体研究内容如下:(1)发展一种实时的双光谱 SRS 成像技术,克服目前光谱成像速度慢、难以用于临床检测的限制。我们发明的技术将利用两路调制相位差为 90° 的斯托克斯光,结合锁相放大

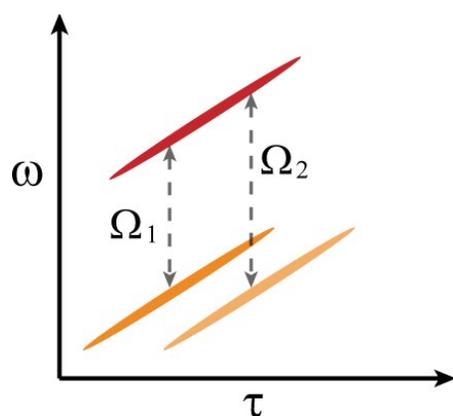
器的双通道正交输出实现双通道(脂类和蛋白)同步成像,目前已获得初步进展;(2)在实体瘤组织上用新技术进行病理成像。除了延续我们前期在脑肿瘤病理检测上的应用,本项目将拓展到其它未曾被研究过的实体瘤,新技术将被用于挑战病理检测中最难的肿瘤模型—骨与软组织肿瘤,此类肿瘤病理种类多,形态和组分变异很大。我们除了用脂/蛋白双光谱SRS成像得到组织形态和化学成分信息外,还将尝试结合同步多模态成像方法,添加二次谐波方法成像I型胶原蛋白,以及用双光子自发荧光成像弹性蛋白等;(3)发展病理图像识别算法,提高肿瘤数字化诊断的速度和精度。实时成像技术需要实时的图像处理算法。SRS图像的病理信息虽然类似于HE染色,但不全相同,因此需发展适用于SRS信号特点的快速图像识别算法。利用SRS信号正比于分子浓度的特点进行量化分析,我们计划从细胞核形态、细胞大小和密度、细胞间质的形态和浓度、脂/蛋白比例等参数着手,对不同类型、不同级别的骨肿瘤图像进行分析,并与病理金标准的诊断结果做比较,不断优化算法。根据图像分析结果的反馈,再调整成像技术中的参数设置,比如两个通道的光强比例、拉曼频率的选择等进一步优化诊断效果。数字化诊断的目标是使手术医生可以在术中根据软件快速得到判断结果,也将为今后的远程诊断打下基础。

以上3个方面的研究内容互相紧密联系,互相促进。研究方法流程如下:(1)发展一种新型的基于飞秒光谱聚焦的同步双光谱SRS成像方法。SRS过程会导致泵浦光强的减弱和斯托克斯光强的增强。这些光强的变化往往很微弱($<10^{-4}$),因此在信号探测上需要将其中一束光,如斯托克斯光,进行周期性的光强调制(开关),同时用锁相放大器解调泵浦光受到的同频振荡信号,即为SRS信号(图2a)。申请人将采用飞秒光谱聚焦的方法,将原本飞秒脉宽的泵浦和斯托克斯脉冲光通过玻璃介质啁啾成2~4 ps,通过调节啁啾匹配之后,只需要改变泵浦-斯托克斯脉冲的时间间隔即可实现拉曼频率的选择(图2b)。在此基础之上,若将受调制的斯托克斯光分为两束,并调节两者时间间隔使得它们的调制相位正好相差 90° (图2c)。进一步精细调节两者与泵浦光的相对延时使得它们分别探测 2850 cm^{-1} 和 2930 cm^{-1} 这两个拉曼频率(图2b)。经过这样的设计,被探测的两通道信号以 90° 的相位差正好被锁相放大器的X和Y通道同时分别探测到,实现双光谱同步成像。此设计的巧妙之处在于只需要用一个电光调制器实现双

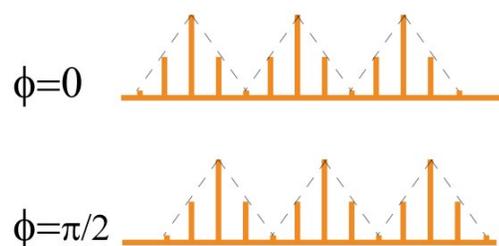
通道同步探测,且不需调节激光器波长或任何光电子元件,对长时间成像尤其有利;(2)用新成像技术获取大量肿瘤组织成像数据。将与上海市骨肿瘤研究所合作,用新技术对骨肿瘤穿刺活检标本和手术边界标本进行检测,获取大量的图像数据。组织标本可以有冷冻切片和新鲜样品两种形式。成像结果将与HE染色法比较,评价新方法的灵敏度和特异性;(3)发展图像处理技术,实现快速数字化诊断。借鉴我们前期工作中用于脑肿瘤识别的判断依据,将与青岛海信医疗设备股份有限公司合作,发展出适用于骨肿瘤病理诊断的图像识别算法,使得数字化诊断的结果接近传统病理的诊断效果。



a: Illustration of SRS microscope system



b: Chirp pulses used for spectral focusing SRS



c: Pulse profiles of two Stokes beams modulated at a phase difference of 90 degree

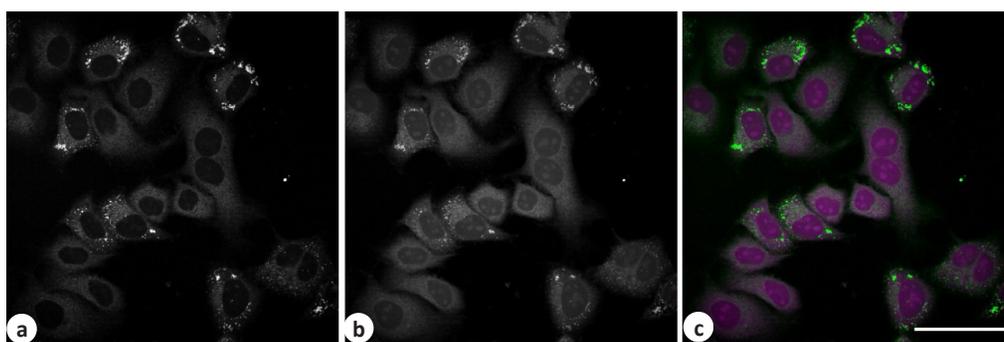
EOM: Electro-optical modulator; Lock-in: Lock-in amplifier

图2 技术简图

Fig.2 Technical design diagram

基于光谱聚焦的SRS成像方法已经在我们实验室得到实现。我们提出通过设计 90° 相位差的双通道调制方法不但在理论上可实现双光谱同步探测,而且在实验室已经被初步验证是可行的。此方法最需要担心的两个问题是来自两束斯托克斯光之间的干涉和锁相放大器两个输出通道之间的干扰。由于最终两束斯托克斯光的相对延时量在2 ps左右,而它们的相干时间不到200 fs,所以不存在干涉问题。锁相放大器的两个通道分别探测相位相差 90° 的正弦和余弦信号,理论上不会有干扰。我们在透射模式的细胞成像中已初步验证了这种干扰小到可以忽

略(图3),反射模式的组织成像效果正在检验。我们设计方案的优势是充分利用锁相放大器的相位敏感性进行双通道同时探测,大大节约了波长调谐所耗费的时间,从而大幅提高成像速度。而相比于光谱调制的方法,我们的方案要简单很多,无需复杂的光谱调制系统,也不需后续图像和数据处理过程。这个简单设计将有利于今后系统的小型化,且无需调节激光器或任何光电子元件,对长时间成像的稳定性和仪器的使用寿命都极有帮助。此外,我们的方法并不仅仅局限于双光谱成像,只需结合普通的延时线扫描即可实现多光谱/超光谱成像。



For SRS images of living HeLa cells in two channels, almost no interference was found between fig.3a (2850 cm^{-1}) and fig.3b (2930 cm^{-1}). The composite two-color image showed the morphology of the cell nucleus (fig.3c). lipids: green; protein: purple; pixel: 512×512 ; acquisition time: 1 s; scale bar: $50\ \mu\text{m}$

图3 同步双光谱SRS成像

Fig.3 Simultaneous bi-spectral SRS imaging

4 预期效益

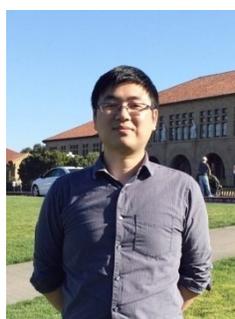
本项目属新技术的研发,项目的实现可预期推进术中快速病理检测技术的革新。基于本技术的离体手术样本检测离产业化已经很接近,在体检测的应用还需要克服更多的工程技术难题。本项目的实现不但对前沿科学和技术研究有很强的推动作用,更对将来的医学转化有极大的积极意义。尤其是对于那些严重依赖手术治疗的实体瘤病例,本技术将大大提高手术治疗的精准度,指导医生在手术中进行快速的切缘判定。因此,本项目的转化也将带来很好的社会影响和极大的经济效益。

【参考文献】

- [1] STUMMER W, PICHLMEIER U, MEINEL T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(5): 392-401.
- [2] SANAI N, SNYDER L A, HONEA N J, et al. Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas [J]. *J Neurosurg*, 2011, 115(4): 740-748.
- [3] HAKA A S, SHAFER-PELTIER K E, FITZMAURICE M, et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(35): 12371-12376.
- [4] ZUMBUSCH A, HOLTOM GR, XIE X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes Raman scattering [J]. *Phys Rev Lett*, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [5] FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1857-1861.
- [6] SAAR B G, FREUDIGER C W, REICHMAN J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1368-1370.
- [7] JI M, ORRINGER D A, FREUDIGER C W, et al. Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(201): 921-925.
- [8] JI M, LEWIS S, CAMELO-PIRAGUA S, et al. Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(309): 829-831.
- [9] WANG M C, MIN W, FREUDIGER C W, et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(2): 135-138.
- [10] FU D, ZHOU J, ZHU W S, et al. Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with

- quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering [J]. Nat Chem, 2014, 6(7): 614-622.
- [11] FREUDIGER C W, MIN W, HOLTOM G R, et al. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy [J]. Nat Photonics, 2011, 5(2): 103-109.
- [12] FU D, HOLTOM G, FREUDIGER C, et al. Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering by chirped femtosecond lasers [J]. J Phys Chem B, 2013, 117(16): 4634-4640.
- [13] FU D, LU F K, ZHANG X, et al. Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(8): 3623-3626.
- [14] LIAO C S, WANG P, WANG P, et al. Spectrometer-free vibrational imaging by retrieving stimulated Raman signal from highly scattered photons [J]. Sci Adv, 2015, 1(9): e1500738.
- [15] LU F K, JI M, FU D, et al. Multicolor stimulated Raman scattering (SRS) microscopy [J]. Mol Phys, 2012, 110(15-16): 1927-1932.
- [16] LIAO C S, SLIPCHENKO M N, WANG P, et al. Microsecond scale vibrational spectroscopic imaging by multiplex stimulated Raman scattering microscopy [J]. Light-Sci Appl, 2015, 4: e265.
- [17] TRAINA F, ERRANI C, TOSCANO A, et al. Current concepts in the biopsy of musculoskeletal tumors: AAOS exhibit selection [J]. J Bone Joint Surg Am, 2015, 97(2): e7.
- [18] NOUJAIM J, THWAY K, SHERI A, et al. Histology-driven therapy: the importance of diagnostic accuracy in guiding systemic therapy of soft tissue tumors [J]. Int J Surg Path, 2015, 24(1): 5-15.
- [19] BYERLY S, CHOPRA S, NASSIF N A, et al. The role of margins in extremity soft tissue sarcoma [J]. J Surg Oncol, 2016, 113(3): 333-338.

(编辑:陈丽霞)



季敏标 1982年出生于浙江省台州市。北京大学物理学学士(2001~2005);斯坦福大学物理学博士(2005~2010);哈佛大学化学与化学生物学系博士后(2011~2014),师从谢晓亮教授。2014年9月加入复旦大学物理系任研究员。季敏标课题组的研究方向主要集中在非线性光谱学在物理、化学和生物领域的应用,从事的研究课题有超快化学反应动力学、材料的超快光物理过程、蛋白分子的瞬态动力学以及非线性拉曼光谱成像技术在生物医学中的应用。至今以第一作者在 Science、Science Translational Medicine、PNAS 和 Journal of Physical Chemistry 等杂志上发表的论文有十余篇。