

雙光子顯微術於生醫光電之應用

Application of Two Photon Microscopy in Biomedical Optics

孫熾、陳維良、李昌駿、劉源、董成淵

Yen Sun, Wesley Chen, Chang-Chun Lee, Yuan Liu, Chen-Yuan Dong

近年來由於雷射應用的快速發展與成熟，促使雙光子顯微系統有突破性的成長及應用。其藉助於先進的超短脈衝雷射，而達到光學切片的能力，具有眾多的優點，包含了較少的光破壞現象以及較深的樣品穿透能力，且可以應用於活體而避免種種因傳統切片所造成的問題。上述的優點使得雙光子顯微系統在生醫光電的應用領域中具有其一定的優勢。本篇文章將針對雙光子顯微術的原理、架構以及一些本實驗室所進行生醫光電方面的應用，諸如通過皮膚藥物傳遞之機制的了解、觀測熱對膠原蛋白所產生的結構破壞以及將其應用於觀測肝硬化的現象做一簡介。

The recent rapid development of laser application has led to breakthrough like growth in two-photon microscopy. Two-photon microscopy with femtosecond pulsed laser has demonstrated the possibility of optical biopsy. The advantages of this imaging technique include less photodamage and greater imaging depth. It allows in vivo observation and avoids many problems associated with histology. The characteristics of two-photon microscopy have clear advantages in the field of biomedical imaging. This article gives an introduction to the theory and experimental setup of two-photon microscopy, and describes the application of the technology to the investigation of transdermal drug delivery, thermal damage of collagen, and liver cirrhosis.

一、簡介

雙光子螢光顯微術是 1990 年由 Denk 等人所發明的，為一利用非線性光學激發螢光分子而達到三維影像的技術⁽¹⁾。有別於一般傳統的單光子激發：分子吸收一個光子由基態躍遷至激發態，雙光子激發必須同時吸收兩個波長為一倍的光子，才可由基態躍遷到激發態，如此一來被激發的機率變

小，所以便需要在光子密度較高的地方也就是焦點附近才會被激發。舉例而言，若以 700 nm 的光源作為激發光源，並以數值孔徑為 1.4 的物鏡來聚焦，則百分之八十的螢光訊號皆會被侷限在約為 $0.3 \mu\text{m} \times 0.3 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ 的空間中。如此一來可以有效降低背景螢光的干擾，故可以得到較高品質的影像⁽²⁾。雙光子顯微系統被認為是一個在生物影像上具有重大突破的技術，其原因包含下列幾點：

(1) 因為只有焦點附近才會被激發，所以可以得到高對比的影像，並可有效濾除焦點之外的螢光訊號，所以具備光學切片的能力；(2) 對生物樣品的光破壞 (photodamage) 較少，所以可以做為活體的觀測；(3) 因為激發波長較長，所以在一般生物樣品中比較不容易被散射及吸收，故可以掃描到比較深層的樣品；(4) 可允許在細胞以及組織中非常小的體積內引發光化學反應；(5) 其激發光與樣品發出的螢光波長相差甚多，故較不必擔心為了濾除激發光源而降低訊號⁽³⁾。

本篇文章將針對雙光子顯微術的基本原理以及架構做一概述，其後便會大略的介紹一下本實驗室利用雙光子顯微術在生醫方面所做的應用。

二、雙光子顯微術簡史

非線性光學的發展始於 1931 年時 Maria Goppert-Mayer 在她的博士論文中首次討論了原子或分子同時和兩顆光子交互作用的可能性⁽⁴⁾，但一直等到雷射的發明之後才驗證了她理論。至於 Colin J. Sheppard 則是第一個想到將這種性質運用至顯微影像中⁽⁵⁾，然而非線性顯微術真正的突破在於 1990 年 Denk 等人用飛秒脈衝雷射 (femtosecond laser) 加上快速掃描系統，提出用雙光子顯微術可以做生物切片⁽⁶⁾。至此之後，非線性顯微術在生物領域之應用就邁入一個新紀元。

三、雙光子顯微術的基本原理

雙光子激發為非線性激發，不同於單光子激發之線性激發，因而具有較小的激發體積，可避免激發焦平面之外的螢光，藉此提高訊雜比，所以被應用於顯微技術中。由圖 1 的 Jablonski 圖中可看出雙光子激發與單光子激發之不同。在單光子激發中，位在基態的螢光分子在吸收了一個能量相當於基態和激發態之間能階差的光子後，由基態跳至激發態，等分子再掉回基態時便會發出一個波長較長的螢光光子。而在雙光子激發中，第一顆光子先將分子激發至一個虛擬中間態 (intermediate state)，之後分子再吸收第二顆光子而達到激發態，這兩個被吸

收的光子能量和必須等於基態和激發態之間的能階差，隨後分子掉回基態時會發出一個波長較短的螢光光子。而這個激發的過程可藉由量子力學中分子與光子間互相吸引的作用來解釋，可用一個與時間有關的薛丁格方程式加以描述，並用二階時間相關的微擾理論 (second order time dependent perturbation theory) 解得，可計算求出躍遷機率的簡化式：

$$\Gamma_{i \rightarrow n, 2k}^{\text{abs}} \approx \frac{2\pi}{\hbar} \frac{e^2 c^2}{\omega^4} |E_k|^4 \sum_m \left| \frac{\langle n | e_k^* \cdot \vec{x} | m \rangle \langle m | e_k \cdot \vec{x} | i \rangle}{E_m - E_i} \right|^2 \delta(E_n - E_i - 2\hbar\omega_k) \quad (1)$$

其中 E_m 為虛擬中間態的能量， E_i 為基態的能量，而 $|E_k|^2$ 為光場的強度。

由上式可以看出在雙光子激發中，每單位時間的激發機率會正比於 $|E_k|^4$ ，也就是正比於照度的四次方。而且因為 (1) 式中的偶極運算子 (dipole operator) 是一個奇宇稱 (odd parity)，所以在雙光子激發中基態與激發態必須要有同樣的宇稱性質⁽⁷⁾。

此外，另一個將非線性光學原理應用於顯微術中的便是二倍頻顯微術。一般而言如果物體缺乏中心對稱便會存在一個二階係數以產生二倍頻訊號：

$$P_i = \chi_{ijk}^2 E_j E_k \quad (2)$$

本實驗室所使用的二倍頻顯微鏡之基本架構與雙光子顯微鏡相同，其為 1978 年 Sheppard 等人首次發展出來的⁽⁸⁾。其基本原理與雙光子吸收之不同

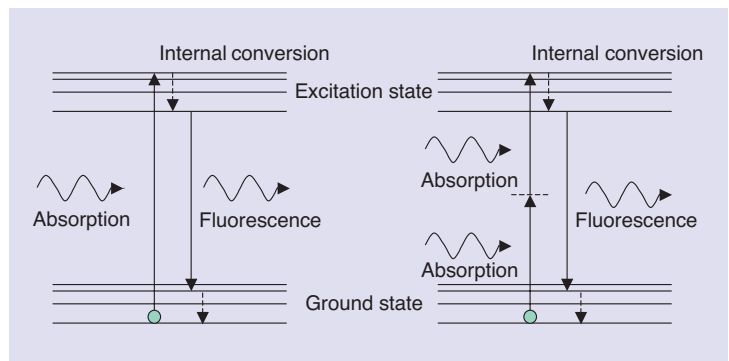


圖 1. 單光子 (左) 與雙光子 (右) 激發 Jablonski 圖。

在於倍頻效應之電子並沒有產生真正的能量躍遷，而只是經由虛擬的能階躍遷產生頻率恰為入射光兩倍的光子，其優點在於因為沒有真正的能量躍遷，所以不會累積熱量造成破壞。一般而言，在生物體中具有許多這種缺乏中心對稱的結構或組織，而它們所產生的這種訊號有助於觀測及了解這些生物樣品。

四、雙光子顯微系統的架設

筆者實驗室的雙光子顯微系統如圖 2 所示。乃是以一台正立式顯微鏡 (E800, Nikon) 為基礎架構，再導入以二極體雷射 (Millennia Xs J, Spectra-Physics) 激發鈦—藍寶石鎖模雷射 (Tsunami, Spectra-Physics) 的光源，經過一些光學元件控制激發光束的性質，激發樣品後由光電倍增管 (R7400p, Hamamatsu) 放大微小的螢光訊號，最後由電腦接收及分析。

在激發光源的選擇上，本實驗室是用鎖模鈦—藍寶石極短脈衝式雷射，由一台具有連續可見光波長特性的二極體雷射所激發，波長可調範圍由 690 nm 至 1080 nm，脈衝寬度約 100 fs，週期為 80 MHz，且由雷射發出來的光為線性極化光束。因為雙光子激發需要同時吸收兩個光子，所以要有很強的光量才可有效的激發樣品，然而如果是連續的高能量光源會對樣品造成破壞，由於脈衝雷射可在極短的時間內釋放出一個極大能量的光束，不但可有效的激發樣品也不至於累積過多能量造成破壞。

五、雙光子顯微術於生醫光電之應用

本實驗室近期將雙光子顯微鏡運用於生醫光電之發展主要包含下述諸項。

1. 通過皮膚藥物傳遞之機制的了解

通過皮膚藥物的傳遞 (transdermal drug delivery) 顧名思義就是將藥物塗抹在皮膚表面，經由擴散作用而至最終被皮膚吸收的過程。這種傳遞藥物的方式在日常生活中有非常廣泛的應用，其中最大的優點在於是一種非侵入性的投藥方式，而缺點便在於藥物不易穿透角質層而被吸收。角質層 (stratum

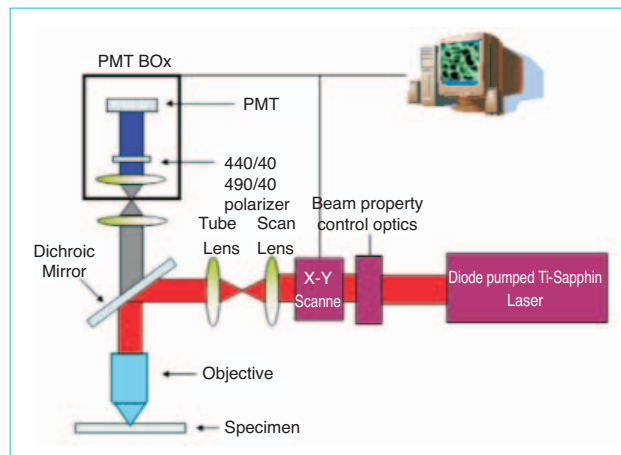


圖 2. 本實驗室雙光子顯微鏡之架構。

corneum) 在通過皮膚藥物的傳遞上造成一個最主要的障礙，於是科學家便想出種種增加藥物傳遞的方法，包含了物理方法：用電流電皮膚 (iontophoresis and electroporation)、光—力學波 (photomechanical wave) 等方法，及化學方法：加不同的化學增進劑 (chemical enhancer)。雖然上述的種種物理及化學方法多年來已被證實確實可以增加藥物傳遞的速度，但是這些方法作用的機制到底為何，至今還沒有一個完整的定論。我們希望能用一些光學的方法並結合雙光子顯微系統，試圖了解油酸 (oleic acid) 一種化學增進劑作用的機制。在實驗中引用了一種十分特殊的螢光染劑，稱為 laurdan，這種染劑因為會插到細胞膜間，所以可經由分子極化特性來監控細胞膜排列方式，其量化式為：

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

其中 I_{\parallel} 表示與激發光源平行的方向所收的螢光強度，而 I_{\perp} 則是在激發光源垂直的方向所收的螢光強度。並且因為它的光譜會隨著環境的極性而改變，也就是在較極性的環境中其光譜會紅移，所以也可用來監測細胞膜流性的變化。我們亦可藉由定義 GP 值將其量化

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

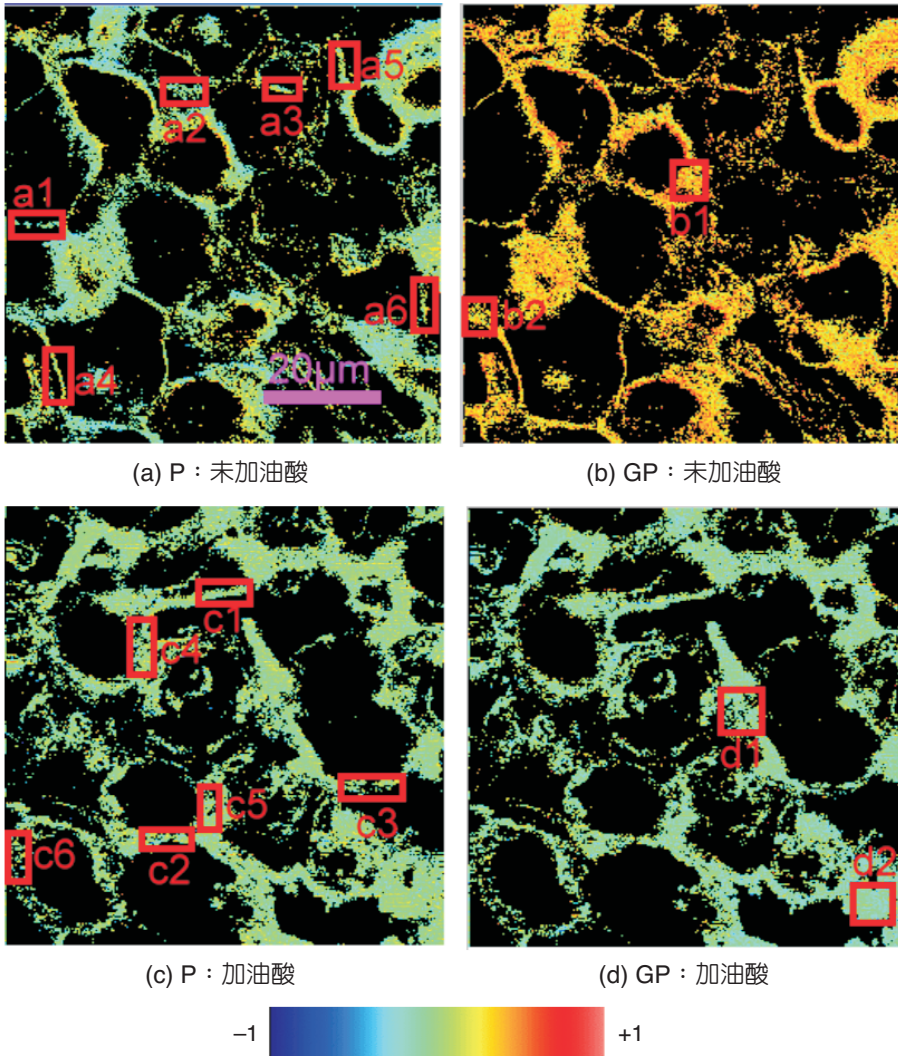


圖3.
經影像處理後 *P* 及 *GP* 影像。

其中 I_{440} 指的是光譜在 440 nm 所收到的訊號強度，而 I_{490} 則是指光譜在 490 nm 所收到的訊號強度。我們結合油酸與 laurdan，藉以了解在油酸作用下角質層物理結構及化學環境上的改變，以期能更進一步了解油酸作用的機制與藥物傳遞之間的關係。

我們針對影像進一步所做的處理為直接使用影像做點對點的 *P* 值以及 *GP* 值的運算，之後我們針對這四張圖 (圖 3) 做了 histograms 的分析，結果如圖 4 所示。在圖 3 中未加油酸時 *P* 值整張圖的平均值為 -0.01 ± 0.18 ，加了油酸之後的平均值為 -0.02 ± 0.16 ，至於在 histogram 上加了油酸與沒加油酸之間的差別並不顯著，原因是圖中有各種走向的細胞膜分子，平均之下 *P* 值的差異便變得不明顯。但由圖 3 中我們可以看出未加油酸時影像偏振

性較大，因為其 *P* 值差異較大 (包含了較多的顏色分布，由藍到紅)，而加了油酸之後 *P* 值變得趨於均一化，其值趨於零 (顏色分布趨於一致並接近綠色)。為了表現出這種差異，我們分別選取三條水平走向的細胞膜以及三條垂直走向的細胞膜，計算其 *P* 值，試圖找出細胞膜排列方式的改變，結果如表 1 所示。未加油酸時水平走向的細胞膜其 *P* 值為 -0.08 ± 0.08 ，垂直走向的細胞膜其 *P* 值則為 0.09 ± 0.11 。至於加了油酸之後如表 2 所示，水平走向的細胞膜其 *P* 值為 -0.01 ± 0.08 ，垂直走向的細胞膜其 *P* 值則為 -0.01 ± 0.08 。從這部分資料分析上說明了未加入油酸時細胞膜的排列較整齊，所以 *P* 值差異較大，但當加入油酸後細胞膜排列趨於混亂，所以 *P* 值幾乎沒有差異。

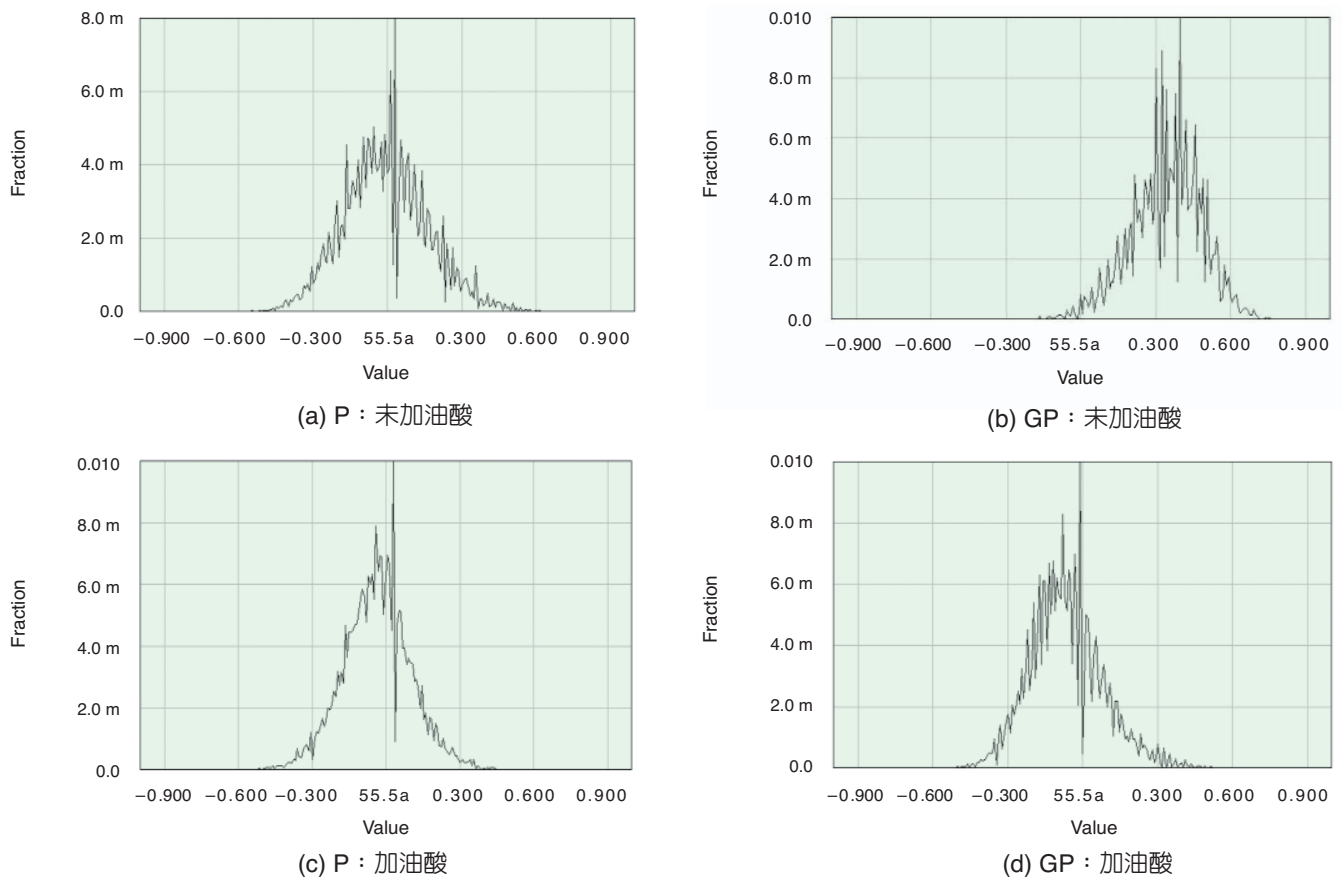


圖 4. 分別對應至圖 3 中四張圖的 histogram，橫軸為 P 或 GP 的數值，縱軸為此值在全張影像中所佔的比率。

同樣的我們針對 GP 的兩張圖選取與 P 值圖中相同的位置計算 GP 值，所得結果表 1 與表 2 中亦有顯示，我們發現不論細胞膜走向為何，當加入油酸後 GP 值皆會下降，由圖 3 的影像中即可看出，未加油酸時整張圖呈現橘紅色，其 GP 值平均為 0.35 ± 0.14 ，在加了油酸之後則變為黃綠色， GP 值平均為 -0.06 ± 0.15 ，此現象證明了加入油酸會使得環境的極性變大，符合油酸分子插入撐開細胞膜使水分子易於進入的推論。此外由 GP 的影像中我們可以看出，在未加油酸時影像上區域之間的顏色有所不同，我們選取區域中顏色差別較大的地方加以分析，如圖 3 中未加油酸時區域 b1 呈現較橘的顏色， GP 值平均為 0.37 ± 0.15 ，至於 b2 處呈現較黃的顏色， GP 值平均為 0.27 ± 0.14 ，加入油酸之後區域 d1 與 d2 之間顏色差別不大，其 GP 值平均分別為 -0.08 ± 0.13 和 -0.11 ± 0.11 ，這項結果說明當角質層的細胞膜在自然的狀態下有不同的流

性區域，但加入油酸後這些區域之間的差異會變小，也就是說油酸分子會打亂這些區域的分布並使環境的極性增加。

我們的結果證明了油酸分子會插入細胞膜中，使得細胞膜排列趨於混亂，並且讓水分子更容易進入，以致環境極性變大。所以結合偏振影像和廣義偏振影像可以用來了解油酸的作用機制，也可更進一步用於瞭解其他各種增加藥物穿透方式的作用機制⁽¹⁰⁾。

2. 應用二倍頻顯微鏡觀測熱對膠原蛋白所產生的結構破壞

本實驗室利用二倍頻顯微鏡觀察熱對膠原蛋白所產生的結構破壞。在生物體中諸如肌肉或是膠原蛋白都已被證明能有效地產生二倍頻訊號⁽⁹⁾，而膠原蛋白因為廣泛的存在於人體中，包含筋和眼角膜中，所以其產生的二倍頻訊號也引發許多的興趣。

細胞膜方向	區域	P 平均值	GP 平均值	P 總平均值	GP 總平均值
↔	1	-0.11	0.33	-0.08 ± 0.08	0.34 ± 0.08
	2	-0.08	0.35		
	3	-0.03	0.35		
↕	4	0.13	0.37	0.09 ± 0.11	0.35 ± 0.08
	5	0.07	0.32		
	6	0.1	0.36		

表 1.
未加油酸時選區的 P 與 GP。

細胞膜方向	區域	P 平均值	GP 平均值	P 總平均值	GP 總平均值
↔	1	-0.02	-0.03	-0.01 ± 0.08	-0.04 ± 0.09
	2	-0.01	-0.00		
	3	-0.01	-0.07		
↕	4	-0.02	-0.07	-0.01 ± 0.08	-0.05 ± 0.08
	5	-0.01	-0.07		
	6	-0.01	-0.02		

表 2.
加油酸時選區的 P 與 GP。

在醫學領域的運用上，外科手術時常會對肩膀的筋加熱以增加肩關節的穩定性，或是藉由加熱眼角膜改變其弧度以矯正視力，本實驗室利用二倍頻顯微術來觀察熱對膠原蛋白所產生的結構破壞，希望藉由此研究可找出適當的加熱溫度，使得膠原蛋白不至於被熱所破壞分解而又足以達到治療的效果。

我們將鼠尾肌腱 (rat tail tendon) 取出，放入不同溫度的水浴槽中加熱十分鐘，拿起後將其固定，使用二倍頻顯微鏡觀察，取得大面積的拼圖影像，如圖 5 所示。我們並計算由 25 度至 60 度二倍頻訊號的強度，強度對溫度的作圖如圖 6 所示。我們發現二倍頻強度在 45 度時強度忽然下降，直至 60 度強度接近於零，但由二倍頻的影像中可發現直至 52 度肌腱的排列方式才開始有些許改變，變得較

為捲曲，而直至 57 度才可發現明顯的斷裂 (紅箭頭所示)，當 60 度時膠原蛋白結構遭分解幾乎完全溶化，以致二倍頻訊號消失。我們的結果說明除了強度的資訊之外應搭配二倍頻的影像資訊，才可完整了解熱對膠原蛋白結構所造成的改變。

3. 應用雙光子顯微術來觀測肝硬化的現象

由於肝臟是人體內的主要器官之一，且國人肝硬化的比例偏高，肝臟於人體中負責移除體內毒素和儲存維他命 A 等重要生理功能；所以如何預防、診斷及治療肝臟病變已經成為相當重要的課題。本實驗室應用多光子顯微術來偵測和診斷肝硬化。相較於傳統切片診斷，多光子顯微術可以在數十分鐘內完成掃描樣品並加以診斷；再加上多光子

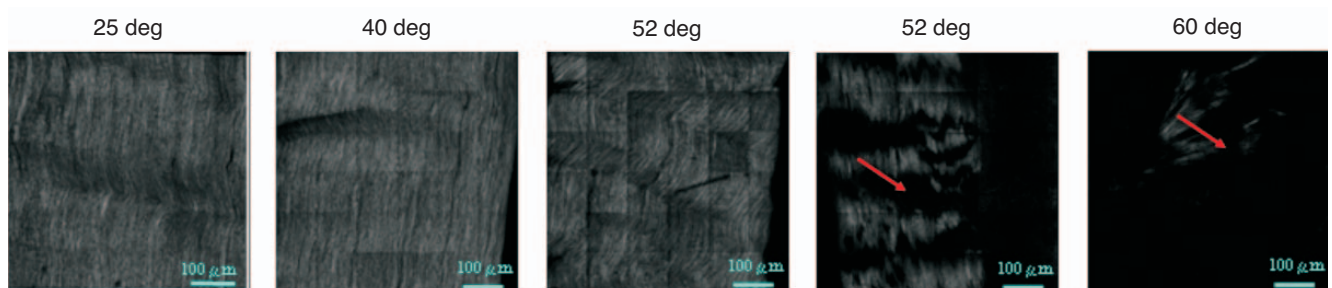


圖 5. 在不同溫度加熱下鼠尾肌腱二倍頻的影像。

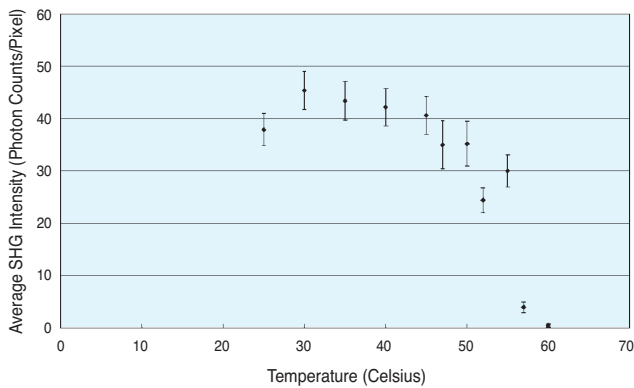


圖 6. 隨不同溫度二倍頻強度的改變。

點狀的非線性激發，僅會對極小的激發體積造成光破壞，所以將來適合拿來發展成活體器官表面掃描的診斷技術。

本實驗藉著注射四氯化碳到老鼠身上來誘發肝硬化，注射之後分別間隔一個禮拜、二個禮拜和三個禮拜，取出肝臟樣品對其表面做多光子顯微術掃描，並且和正常的肝臟樣品多光子顯微術掃描影像進行比較。為了取得大面積的掃描影像，我們排列了 8×8 陣列的 256×256 像素的圖片，得到了 $1.27 \text{ mm} \times 1.21 \text{ mm}$ 肝臟組織的自發螢光影像。在正常的肝臟組織自發螢光影像 (圖 7) 中，有著陰暗細胞核的為肝細胞 (hepatocyte) (橢圓區域)，而較小且螢光較亮的為星狀細胞 (stellate cell) (黃色箭頭)；影像中顯示正常肝臟組織的肝細胞和星狀細胞分布均勻。在間隔一、二和三個禮拜的肝硬化多

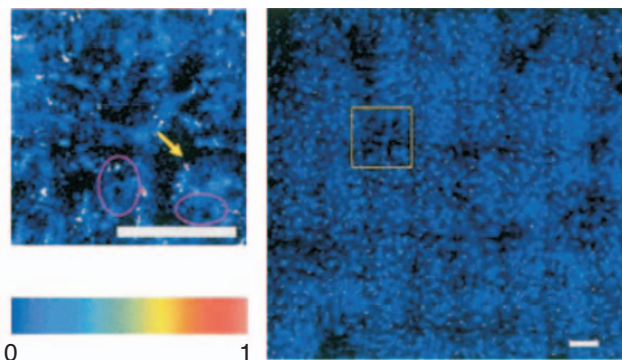


圖 7. 使用雙光子顯微鏡觀測肝細胞及星狀細胞在正常肝臟的分布情形。

光子掃描影像 (圖 8) 中，隨著肝臟組織纖維化，缺乏細胞結構的壞死部分開始出現；而且，在正常肝臟中分布均勻的星狀細胞，在壞死部分周圍的區域增生。雖然肝細胞仍然存在，但數目和增加的星狀細胞比起來卻在減少。經由這些觀察推論，肝細胞在空洞區域壞死，而星狀細胞在壞死區域附近對化學訊息的反應為增生。本實驗中，我們展示了多光子顯微術在診斷肝硬化的潛力，未來將往活體觀察的目標來邁進⁽¹¹⁾。

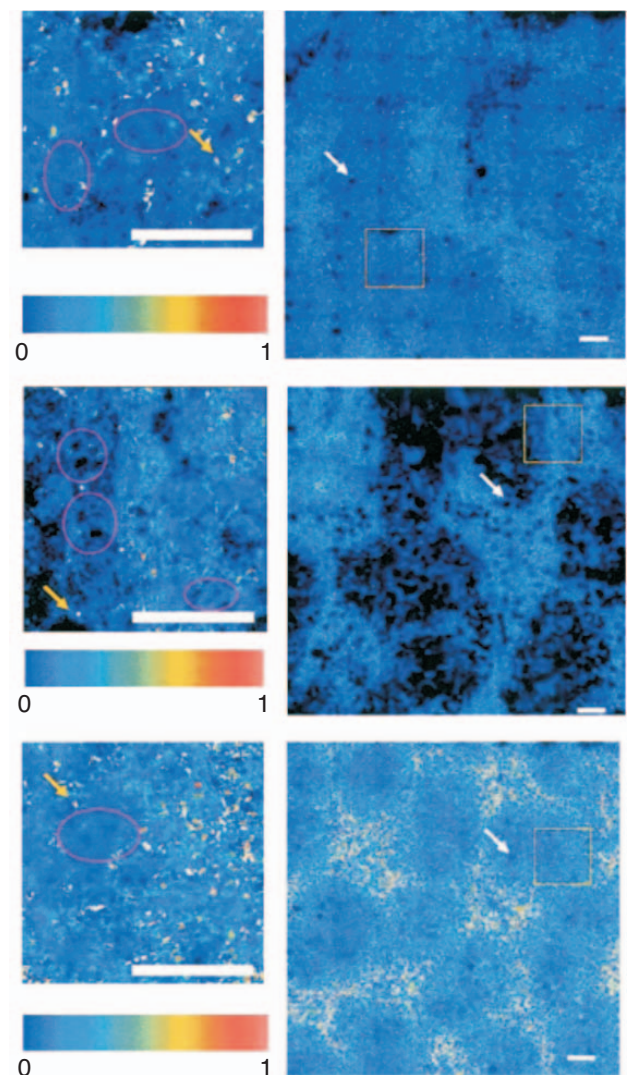


圖 8. 由上至下分別為用 CCl_4 作用 1、2 及 3 星期的老鼠肝臟所取得的影像，圖中所示為肝臟細胞 (特別是框起的區域) 及星狀細胞 (黃箭頭) 的分布，而壞死的部位則由白色箭頭標示。

六、結論

由於雙光子顯微術的眾多優點，以及不斷發展的周邊配備，使得雙光子顯微術未來在生醫領域中有著不可取代的地位。本實驗室已經成功地將雙光子顯微術應用於種種生醫領域上，包含文中所提及之通過皮膚藥物傳遞之機制的了解、觀測熱對膠原蛋白所產生的結構破壞以及將其應用於觀測肝硬化的現象。此外，由於雙光子顯微術具有對生物樣品的光破壞較少之特性，所以非常有潛力運用於活體的觀測上，我們預期此種技術在未來的生醫領域發展中將會扮演一個非常重要的角色。

參考文獻

1. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science*, **248**, 73 (1990).
 2. B. Herman, *Fluorescence Microscopy*, 2nd ed., Springer, 95 (1998).
 3. P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland, *Annu Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 399 (2000).
 4. M. Goppert-Mayer, *Ann. Phys.*, **9**, 273 (1931).
 5. C. J. Sheppard and R. Kompfner, *Appl. Optics*, **17**, 2879 (1978).
 6. W. Denk, J. H. Stricker, and W. W. Webb, *Science*, **248**, 73 (1990).
 7. G. Baym, *Lectures on Quantum Mechanics*, W. A. Benjamin, Inc. (1986).
 8. J. Gannway and C. J. R. Sheppard, *Opt. Quantum Electron.*, **10**, 435 (1978).
 9. P. J. Campagnola and L. M. Loew, *Nature Biotechnology*, **21** (11), 1356 (2003).
 10. Y. Sun, W. Lo, S. J. Lin, S. H. Jee, and C. Y. Dong, *Optics Letters*, **29** (17), 2013 (2004).
 11. H. S. Lee, Y. Liu, H.C. Chen, L. L. Chiou, G. T. Huang, W. Lo, and C. Y. Dong, *Optics Letters*, **29** (22), 2614 (2004).
-
- 孫熾小姐為國立台灣大學物理學系專任助理。
 - 陳維良先生現於國立台灣大學物理學系從事博士後研究。
 - 李昌駿先生為國立台灣大學物理學系碩士班學生。
 - 劉源先生為國立台灣大學物理學系碩士班學生。
 - 董成淵先生為美國伊利諾大學物理學博士，現任國立台灣大學物理學系副教授。
 - Yen Sun is an assistant in the Department of Physics at National Taiwan University.
 - Wei-Liang Chen is a postdoctoral researcher in the Department of Physics at National Taiwan University.
 - Chang-Chun Lee is a master degree student in the Department of Physics at National Taiwan University.
 - Yuan Liu is a master degree student in the Department of Physics at National Taiwan University.
 - Chen-Yuan Dong received his Ph.D. in physics from the University of Illinois, USA. He is currently an associate professor in the Department of Physics at National Taiwan University.