

# 活體多光子顯微技術於生醫研究之發展

## Development of *In Vivo* Multiphoton Microscopy in Biomedical Research

李峰杰、陳維良、董成淵

Feng-Chieh Li, Wei-Liang Chen, Chen-Yuan Dong

多光子顯微技術具有高穿透性，且於聚焦處形成較小之焦點，基於此產生了自然的組織切片而無需人為加工，且同時降低了光破壞的生成。活體觀測平台背部皮膚固定器 (dorsal skinfold chamber) 的發展強化了進行活體研究的能力，以生物相容性材料 (6AL/4V-TI ELI) 製造，能降低對生物樣品的傷害。活體上的研究，需要體外的實驗結果來做為比對的基礎，若能將本實驗室所進行之在體外的研究，諸如皮膚老化、組織工程及眼角膜結構等實驗結果及寶貴經驗，複製到活體來進行，再運用多光子顯微技術配合活體觀察平台在生醫研究上發展，然後進一步的比對活體與體外實驗的差異，當是最實用的工具，更能以貼近真實生物內部來了解一些奇妙的機制。

Compared to conventional microscopic imaging techniques, multiphoton microscopy are point like in excitation, and highly penetrative in nature. Since this technique does not require artificial sample preparation and causes relatively low sample photo damage, it is an ideal alternative for optical biopsy. In our laboratory, we have developed a dorsal skinfold imaging chamber using the biocompatible material 6AL/4V-TI ELI for *in vivo* investigation into living organisms. However, prior to conducting *in vivo* research, *ex vivo* studies on the tissue samples of interest need to be studied. In our lab, we are focusing on topics such as photo-aging, tissue engineering, and cornea structure. The combination of multiphoton microscopy, *ex vivo* tissue characterization and *in vivo* observation will enable us to study physiological processes in their natural state, leading to an improved understanding of biologically and medically related issues.

### 一、前言

早期人類對疾病的研究著重於體外的模型，如

今為了能更貼近疾病的真實性及可靠性，遂將研究重心轉往活體來發展，才能更有效的了解及近一步的進行治療，筆者的實驗室做了一連串有關活體的



圖 1. 背部皮膚固定器實圖。

研究，在各方面都有了初步的收穫。活體研究是近年來科學家的研究重點，為了能順利的在活體上進行實驗，研究人員發展出了一些輔助系統，如背部皮膚固定器 (dorsal skinfold chamber, DSC) 來讓活體上的實驗能順利進行。除了輔助系統的發展，主要的觀測技術也在提昇，其中包含了各個層面的學理，如光學、磁學、電學等等。本實驗室發展了一套活體研究的平台且能與多光子顯微技術作密切配合，並應用在生醫研究的領域之中，將在下文做介紹。當然體外的實驗仍然有其重要的貢獻，在活體實驗發展的同時，體外的研究成果成了重要的對照組，將活體成果與體外成果做比較才能更有效的研究複雜生物體的微妙生理結構。

## 二、多光子顯微術於活體中的利基

非線性光學的發展始於 1931 年時 Maria Gopper-Mayer 在她的博士論文中首次提出了物質同時和兩顆光子交互作用的可能性<sup>(1)</sup>，卻在缺乏適合的激發光源下而久久未能得到證實，一直到了雷射技術發展之後，非線性光學的效應才得以應證。至於將非線性光學運用於顯微影像中者，則為 Colin J. Sheppard 等人<sup>(2)</sup>。1990 年 Denk 等人用飛秒脈衝雷射 (femtosecond laser) 加上快速掃描系統<sup>(3)</sup>，成功的運用了非線性光學的特性在生物體上形成了非破壞性的光學自然生物切片，也因為近紅外光光

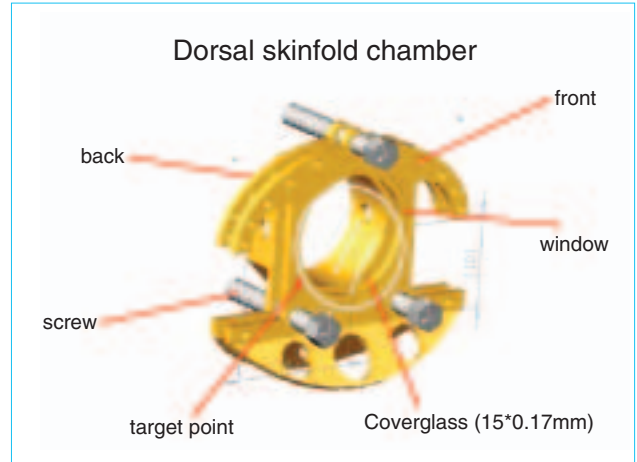


圖 2. 背部皮膚固定器。

源較不被生物體所散射而得到了較高的穿透性，能有效的對生物樣品做深度的掃描，再經由電腦軟體將每一個切片重新組合，進而得到完整而容易觀測的生物三維顯像。

## 三、活體研究平台簡史

有鑑於細胞培養及觀察長久以來一直停留在體外，若想要貼近細胞真正生長環境，真實呈現細胞間的內部效應，所謂不入虎穴焉得虎子，故於活體中來進行各項研究及觀察，才能於最逼真的情境中體會生物體的奧妙。活體觀察平台最早是在 1924 年 Sandison 活體實驗當中所用<sup>(4)</sup>，之後陸續的被改良及因應不同的實驗而重新設計，其中一項便是背部皮膚固定器 (dorsal skinfold chamber, DSC) 在 1940 年代被用來研究癌症活體中血管的增生<sup>(5-7)</sup>。但在他們配合顯微鏡使用時，所使用的物鏡皆為空氣鏡，解析度不如油鏡好，為了求得更佳的解析度，本實驗室改良了 DSC (請參考圖 1 至 3)，使得這個平台可以使用油鏡來觀察，而且是採質輕、生物相容性高的「6AL/4V-Ti ELI」合金所製作。有了活體觀測平台，再與多光子顯微技術結合，才能真正做到非侵入式的研究，將實驗時對活體所造成的傷害及干擾降到最低，才是做活體研究的重要關鍵。

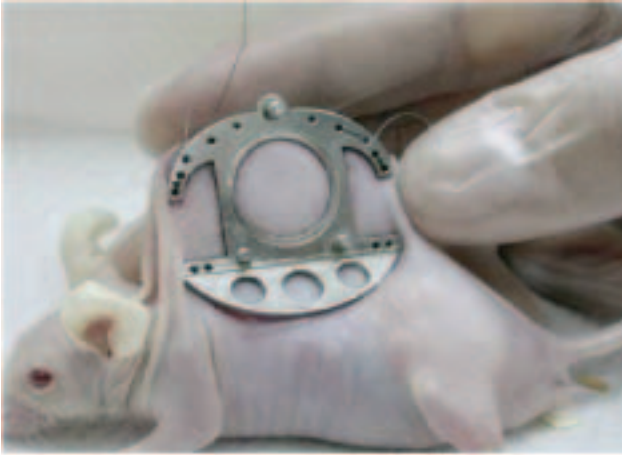


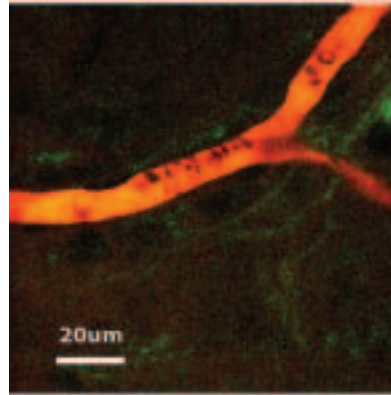
圖 3. 背部皮膚固定器。

#### 四、背部皮膚固定器

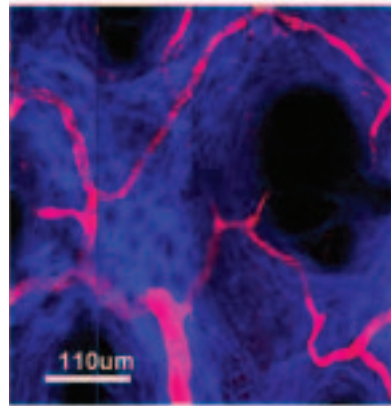
活體觀察是最熱門的研究之一，其中 chamber 的使用，有效地增進了動物樣本及人體的研究，背部皮膚固定器為活體觀察實驗提供了一個更有利的管道，利用本實驗所改良之 chamber 使用於活體觀察時，能捕捉具有較高解析度的影像，且為了符合生物相容性，特別使用醫療級的鈦合金來製造。其構造如下所述。

所謂背部皮膚固定器<sup>(5-7)</sup>也就是在老鼠的背部上安裝一組原件，然後在原件中將所欲觀察的因子植入，再與顯微鏡結合而形成可以在活體中做持續觀察的技術。老鼠背部的皮膚較其他部位鬆弛，故我們運用這樣的特性，可以輕易的在老鼠背上安裝 chamber，降低對老鼠的傷害。這個 chamber 是由具生物相容性材質的鈦合金 (6AL/4V-Ti ELI) 所製作，重量輕 (約未 5 g) 且質地硬。為了允許高解析度物鏡觀察，在這個 chamber 上可安裝一個直徑為 1 mm 厚度為 0.17 mm 的蓋玻片，其用意是為了能得到高解析度的影像。同時為了要在每次觀察時都能重回到同一個位置，也就是特定點的定位，我們特定在 chamber 上設計了一個定位孔以幫助定位，使得在做癌細胞血管增生或癌細胞增生觀察時，能更快速及準確的追蹤及掌握。

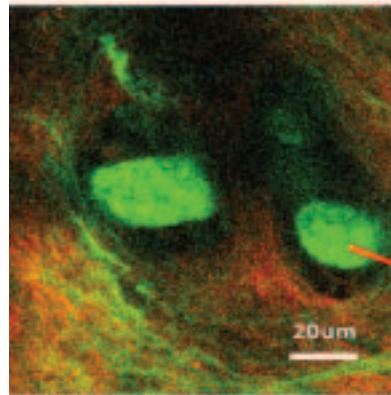
本實驗室將固定器裝老鼠背部皮膚上，進行活體觀察實驗，可以清楚的觀察到血管與膠原蛋白及癌細胞 (圖 4)；若是固定一個深度的平面做掃



這張圖片是在活的老鼠皮上的血管，在其中紅色為血管，在血管中的圓盤狀物質為紅血球，它隨著血液在血管中滾動著。



紅色部分為血管，分布在皮膚的真皮層，藍色部分為膠原蛋白，而較大的黑色圓形孔洞為真皮乳頭。在這張圖中，可以清楚的看見，血管被膠原蛋白所建造的支架固定住，而能成良好的三維結構。



被植入皮膚下的一團具 GFP (green fluorescence protein) 癌細胞。

癌細胞

圖 4. 運用 DSC 所擷取到之影像。

描，亦可以得到一組類似動態的影像，如血管裡的組成分子順著血液在血管中流動 (圖 5)。經由上述所做的描述，可以清楚的了解活體實驗的趣味及有別以往。除了介紹本實驗室所做的活體研究外，下文將介紹其他領域運用 DSC 所進行的研究。

#### 五、活體觀測平台之應用

本實驗室所重新設計的背部皮膚固定器，可以

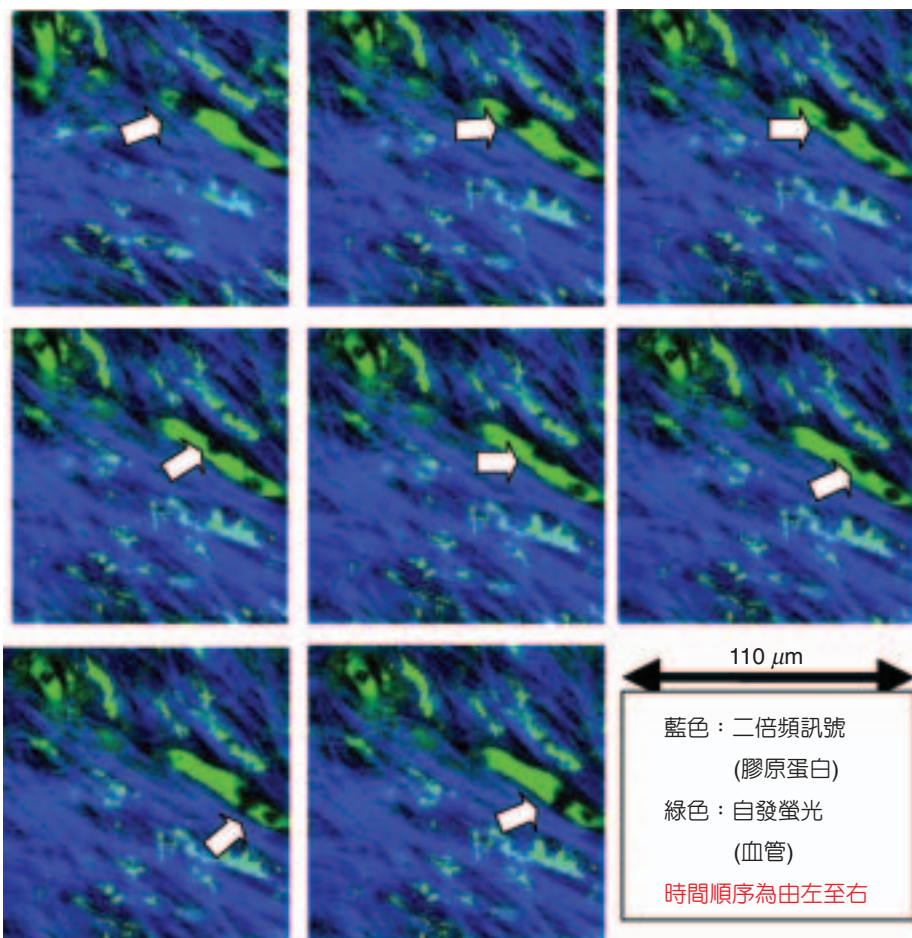


圖 5. 血管內的動態記錄。在這組圖中，可以看到套上藍色的膠原蛋白及套上綠色的血管，每張圖的大小為  $110\ \mu\text{m} \times 110\ \mu\text{m}$ ，在箭頭所指的地方為可能為白血球，它正攀爬血管壁往另一方前去，因為白血球像個變形蟲般可任意變換外形，這樣的特性是為了在發現異端時能迅速變形躡出血管然後攻擊異端分子。在此圖中，所包含的層面不止這些，如果讀者細心的話，在箭頭所指的那顆白血球的前後方，可以看到一些小黑點在翻滾著，那可能就是紅血球。

應用在各種層面上，而在其他研究團隊中曾使用類似的 chamber 進行的研究，簡要說明如下。

## 1. 生醫材料上的應用

- (1) Sebastian Strieth 等人將不鏽鋼、鋁及鈦合金植入生物體中，為了觀察這三種材料對生物體所造成的生理反應，何者能將發炎現象降到最低，結果發現鈦合金所造成的發炎現象最輕微，其次是不鏽鋼，最差的是鋁<sup>(8)</sup>。
- (2) Daniel Druecke 等人將不同大小具蜂巢狀結構的材料 (poly block-copolymer) 植入生物體，想要觀察血管增生與蜂巢結構大小的關係，結果是形狀越大者血管增生的速度越快且大小也越大<sup>(9)</sup>。

## 2. 癌症病理學研究

John Condeelis 等人將乳癌細胞植入生物體中，觀察在其間之細胞的移動及轉移行為，發現乳

癌細胞會沿著膠原蛋白往有血管地方爬行，當乳癌細胞在養分充足的血管生長一段時間後，便開始試圖鑽進血管壁而進行轉移的行為<sup>(10)</sup>。

## 六、活體研究的必要性

活體實驗的發展，絕對不能直接跳過體外實驗而獨自發展，體外實驗的結果與經驗是活體實驗不可或缺的重要基礎，所以要能先發展較為簡單化的體外實驗，再複製到活體實驗中來進行研究。所以筆者實驗室所進行之體外生物物理與生物醫學組織的研究，包含了組織工程、皮膚老化、眼角膜結構影像等等。有了這些研究成果，當然就可以順勢將研究推廣到活體中來進行。以下為本實驗室的體外實驗成果，日後亦將施行於活體之中，以比較其間之差異。

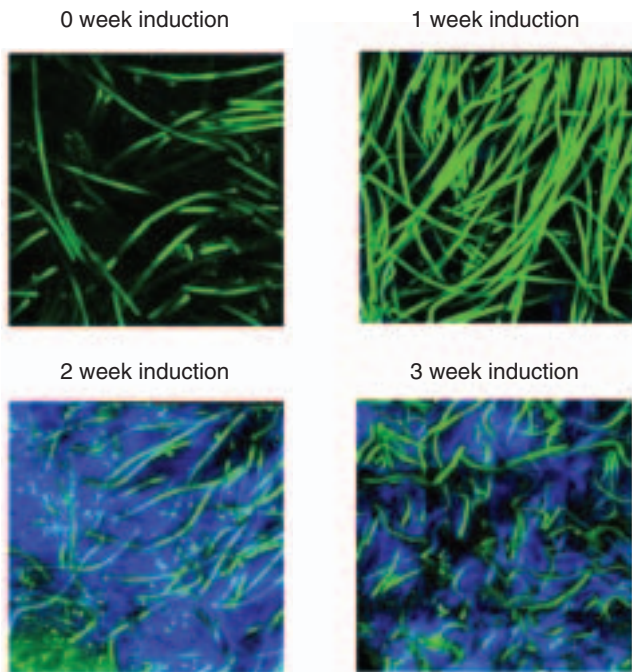


圖 6. 圖中綠色的條狀物為 PGA 所產生的自發螢光，而藍色為膠原蛋白所發出的二倍頻訊號。在第四週可以清楚的看見 PGA 受到膠原蛋白的推擠而產生扭曲。

### 1. 組織工程

本實驗將生物可分解性材料 (poly glycolic acid, PGA) 所製的支架 (scaffold) 置於養有細胞的培養皿中，待一段時間後再取出置於顯微鏡下觀察，發現細胞會分泌細絲狀的膠原蛋白附著於支架上，而這些膠原蛋白在多光子顯微術的作用下呈現出二倍頻的訊號，且因為膠原蛋白密佈而對支架產生一張力，造成了支架的扭曲變形，這樣的訊息代表著組織增生的過程中與支架的相互作用 (圖 6)。

### 2. 皮膚老化<sup>(7)</sup>

皮膚包覆著人體以防止大部分的有害物質及紫外光，並維持恆溫的功能，是人體最大的器官。因為暴露於外在環境之中，直接面對著的就是有害與無害的因子，當皮膚保衛人體時，也同時造成了本身的損壞及老化。老化的最大殺手是紫外光，老化造成了皮膚內二倍頻訊號與自發螢光比值的變化，這樣的差異在不同的年紀會有不同的值，藉由這樣的差異來量化皮膚的老化及損壞程度，該判斷結果

也較為客觀。我們針對三個樣品做了分析，分別為二十歲、四十歲及七十歲之人類臉部皮膚，在圖 7 中所呈現者，為三個樣品的自發螢光與二倍頻訊號影像，其中可以清楚的發現，隨著年紀的增長，自發螢光與二倍頻訊號之間的比值會有明顯的差異，因為這樣的結果而定義了一個皮膚老化指數 (skin aging index) 來量化 (圖 8) 皮膚。

### 3. 眼角膜的掃描<sup>(8)</sup>

眼角膜是天然的透鏡，用來輔助眼睛將光線聚焦在視網膜上成像，使得生物體能夠看得見這個世界。大部分的眼角膜是由膠原蛋白所組成，在角膜的表層及下層則由內皮細胞所構成。使用多光子螢光顯微技術來觀察角膜，無需經過標定染色就能清楚的分辨表皮細胞與膠原蛋白。圖 9 為眼角膜的縱

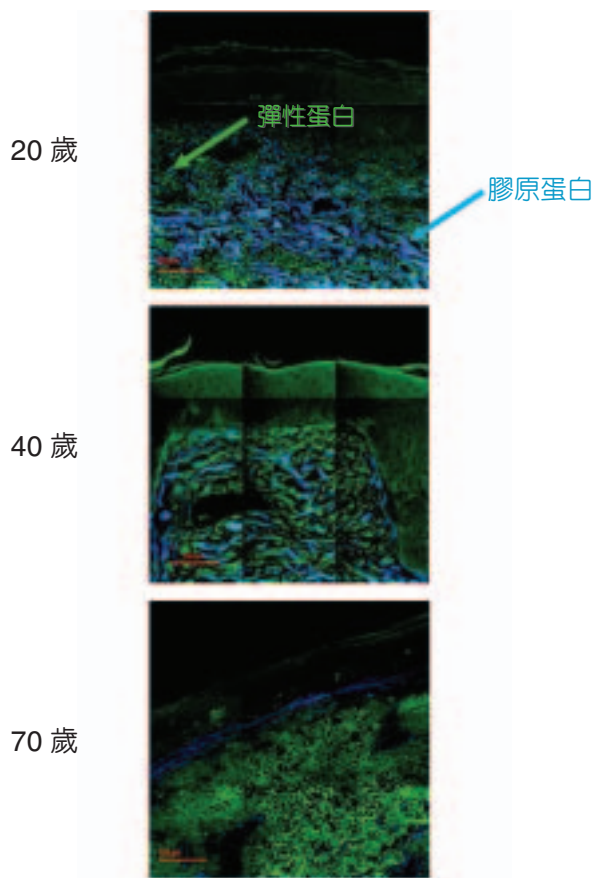


圖 7. 由圖中可以清楚的看見，隨著年齡的增長，彈性蛋白 (綠色) 增加了，而膠原蛋白 (藍色) 卻減少了。

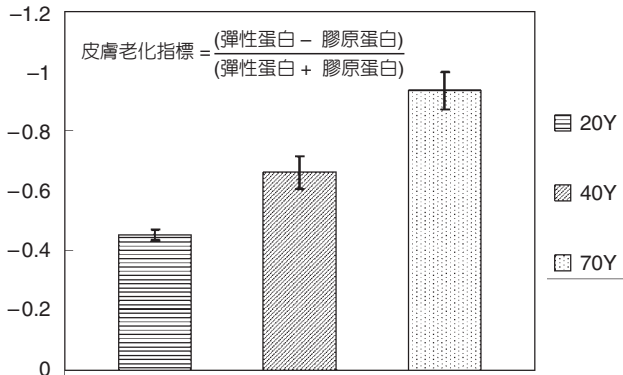


圖 8. 從這圖可以看見皮膚老化指標隨著年齡增長，指數越往 -1 的方向成長。

向組織切片，上下兩層內皮細胞夾著中間的膠原蛋白；圖 10 為多光子螢光顯微鏡所拍得的角膜自發螢光與二倍頻訊號，其中可清楚的分辨角膜的結構。甚至還可以得到眼睛的其他結構，如鞏膜 (膠原蛋白組成) 及輪部 (limbus) (介於角膜與鞏膜之間的過渡結構) (參見圖 11)。

先前這些實驗，只知道其最終或在體外的結果，面對卻不了解其背後的機制，若想要觀察這整個過程及效應，唯有將場景拉到最貼近該狀態的環境來進行觀測，才能更具說服力。活體實驗主要分為在實際與最接近實際活體中環境兩種，例如肺癌活體實驗，我們可以將癌症細胞植入皮膚下來做觀察，雖然不是在真正肺部組織中來進行，卻也算是接近實際環境。又如皮膚癌活體實驗，將皮膚癌細胞植入皮膚中，以進行一連串的研究，甚至治療，



圖 9. 眼角膜的縱向組織切片圖。

這樣的過程是最接近實際生長環境的研究，其研究結果也較具說服力。所以活體研究是生物研究的趨勢，也衍生出一些配合的週邊研究工具，我們所發展的背部皮膚固定器就是一例，本實驗室還發展了肝的活體影像平台。若是將先前論述屬體外實驗的研究，重新複製到活體中來進行觀察，膠原蛋白在活體中受熱破壞的程度是否會有什麼不同？細胞在體外與體內的生理行為是否一致？這就是我們極力想去了解處於活體與體外的差異。畢竟進行體外研

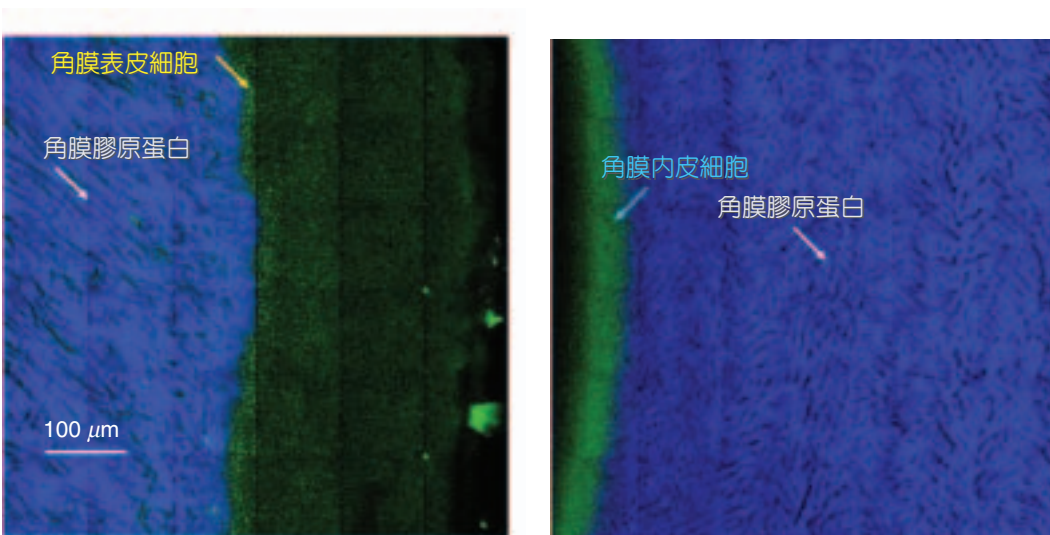


圖 10. 角膜的內外兩側是由內皮細胞 (綠色者) 所包圍著，被夾在中間者是由膠原蛋白 (藍色) 所組成。

究時所控制的實驗條件較為單純，而活體中會有很多意想不到的影響因子，也許這因子在體外時影響不大，但當它在活體中卻有連結放大的作用，造成各因子的綜合效應而產生不同的結果。

## 七、結論

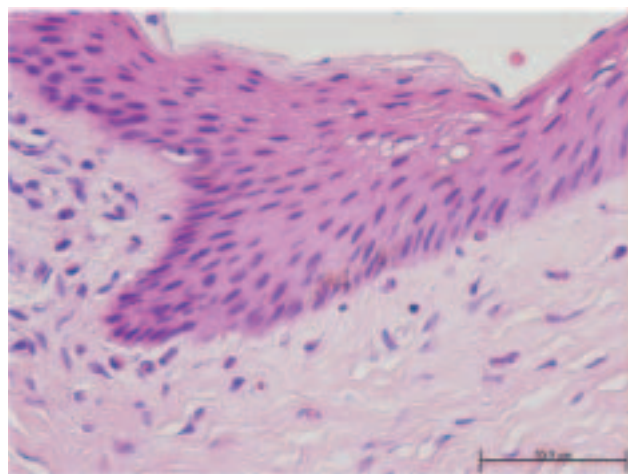
凡事總需觀察後才得知其法則，而對於生物體的認知也當是如此。體外實驗的研究是藉由降低產生變因的條件，以達到以簡馭繁的科學方法，但無論什麼樣的研究終將回歸到真正的情況。現實的環境之中，沙盤推演不斷的重複演練為了是不能有錯，生命不能重複所以珍貴，卻往往經不起看似輕微的一擊，活體研究才能真正的降低未考量之未知變因所造成的錯誤。活體研究以最貼近真實環境的方法來了解環境，而不操控環境，才能真正了解並解開藏於生物體的謎。背部皮膚固定器也確實做到了活體觀察的要求，高解析的影像使得我們能更輕易的探討發生於生物體的事件，本身生物相容性的材質大大的降低了不必要的干擾，隨意想起的活體研究大部分都能由該平台來進行，也因為此才能歷久彌新的延用了數十年，相信往後的數十年也是如此。

## 誌謝

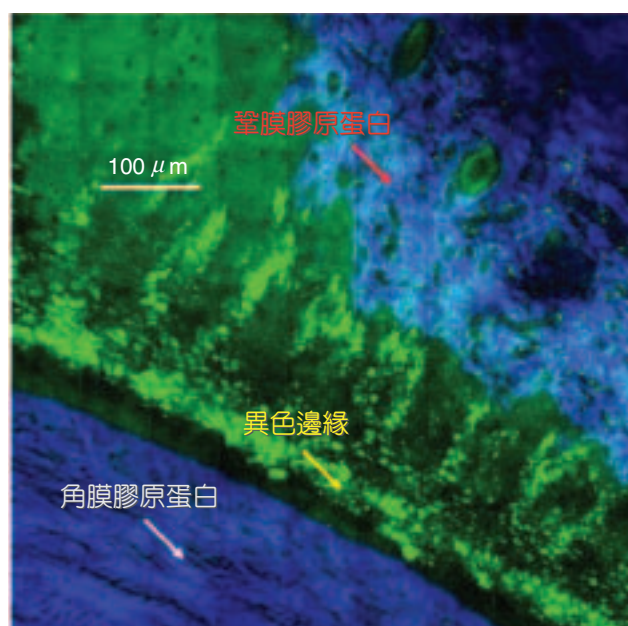
在本文中所提及之實驗與實驗結果，為本實驗室及合作者所共同提供，在此僅列合作者之名於後，以表感謝，包含台大醫院李宣書醫師、林頌然醫師、林文洲醫師、紀秀華醫師、邱玲玲小姐、陳筱青小姐、長庚醫院譚欣媛醫師、Ching-Chuan Jiang、Peter T. C. So、Ching-Chuan Jiang。

## 附註

科儀新知第 26 卷第 5 期 68—75 頁之「雙光子顯微術於生醫光電之應用」一文亦為本實驗室發表之文章，特於此感謝對其貢獻之所有合作者，包含台大醫院林頌然醫師、李宣書醫師、紀秀華醫師、黃冠棠醫師、駱文小姐、陳筱青小姐、邱玲玲小姐。



(a)



(b)

圖 11. (a) 角膜與鞏膜，而介於兩者之間的過渡組織為異色邊緣組織。(b) 經由雙光子螢光顯微鏡可以清楚的看到，介於角膜及鞏膜之界的異色邊緣。

## 參考文獻

1. M. Goppert-Mayer, *Ann. Phys.*, **9**, 273 (1931).
2. C. J. Sheppard and R. Kompfner, *Appl. Optics*, **17**, 2879 (1978).
3. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science*, **248**, 73 (1990).
4. J. C. Sandison, *Am. J. Anat.*, **41**, 447 (1928).
5. G. H. Algire and F. Y. Legallais, *J. Natl. Cancer Inst.*, **10**, 225 (1949).

6. R. Merwin, G. Algire, and H. Kaplan, *J. Natl. Cancer Inst.*, **11**, 593 (1950).
7. M. Dewhist, J. F. Gross, D. Sim, P. Arnold, and D. Boyer, *Biorheology*, **21**, 539 (1984).
8. S. Strieth, *Cancer*, **110**, 117 (2004).
9. D. Druecke. *Journal of Biomedical Materials Research*, part A, **68A** (1), 10 (2004).
10. J. Condeelis and J. E. Segall, *Intravital. Nature Revies/cancer*, **3**, 921 (2003).
11. S. J. Lin *et al.*, *Optics Letter*, **30**, 17 (2005).
12. Teng *et al.*, *IOVS*, accepted.

• 李峰杰先生為國立台灣大學物理學系博士班學生。

- 陳維良先生現國立台灣大學物理學系從事博士後研究。
- 董成淵先生為美國伊利諾大學物理博士，現任國立台灣大學物理學系副教授。
- Feng-Chieh Li is a Ph.D. student in the Department of Physics at Nation Taiwan University.
- Wesley Chen is a postdoctoral researcher 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.

# 光機電系統整合概論

## Introduction to Opto-Mechatronic Systems



本書邀集了光電、機械、電機及電子領域五十餘位專家學者共同執筆撰寫。全書共九章、五百六十頁，從系統概論開始，詳述光學基礎理論，接續介紹光電轉換與整合、機電整合及光機整合等技術，進而說明系統整合設計、模擬，以及相關組裝與檢測分析技術，並以投影機、雷射全像數位系統及視覺取像系統作實例介紹，最後則深入介紹光機電系統的遠景及未來發展。

**精裝本 900 元    平裝本 750 元**

國家實驗研究院

儀器科技研究中心出版

電話：03-5779911 轉 303、304

傳真：03-5789343

網址：<http://www.itrc.org.tw/Publication/OMS>

**第一本光機電整合專書**

郵政劃撥

帳號：00173431

戶名：財團法人國家實驗研究院儀器科技研究中心