

利用偏振光散射方法检测癌细胞*

孙翔宇^{1,2)**} 王 勇^{1,2,3)**} 廖 然^{4,5)***} 孙树清^{1,2)***} 马 辉^{1,2)}⁽¹⁾ 清华大学深圳研究生院生命与健康学部, 光学成像与检测实验室, 深圳 518055;⁽²⁾ 清华大学物理系, 北京 100084; ⁽³⁾ 青岛理工大学理学院, 青岛 266033;⁽⁴⁾ 清华大学深圳研究生院, 广东省偏振光学检测与成像工程技术研究中心, 深圳 518055;⁽⁵⁾ 清华大学深圳研究生院, 海洋科学与技术学部, 深圳 518055)

摘要 血液中病变细胞的检测是疾病诊断的重要依据. 在癌症的诊断过程中, 血液中存在癌变细胞说明身体已经有癌变组织. 因此, 识别和检测这些细胞在医学上具有重要的意义. 偏振是光的固有属性, 可以通过检测光与物质相互作用后的偏振变化来检测物质的性质. 本文首次利用偏振光散射方法对悬浮在磷酸缓冲液中的癌细胞进行研究, 利用红细胞和癌细胞以及活着的癌细胞和死亡的癌细胞在偏振特征上的不同, 对其进行了成功的分辨. 该方法具有非侵入、无损伤、高灵敏、高分辨的特点. 为癌症诊断和治疗效果评估提供新思路.

关键词 癌细胞, 偏振散射, 识别**中图分类号** Q632, Q279**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0045

目前, 癌症是最致命的疾病之一, 严重威胁人类的健康^[1-2]. 临床上常见的癌症检测方法包括X射线成像、超声成像、磁共振成像、内窥、血液检测和组织切片检测等^[3-8]. 其中, X射线成像、超声成像、磁共振成像、内窥和组织切片检测都是针对病变组织的检测, 血液检测主要是通过检测血液中肿瘤标志物来实现的, 而光学检测方法可以实现非侵入、无损伤、高灵敏和高分辨率的诊断^[9].

目前常用的光学检测细胞技术有荧光染色法、显微镜、流式细胞仪检测和表面增强拉曼光谱. 荧光染色法通过对细胞标记上特征荧光物质, 检测细胞结构、内含物质等; 显微镜通过高分辨成像获得细胞的形态、结构信息, 判断细胞的种类、状态; 流式细胞仪利用鞘流系统把细胞分离成单个通过光检测区, 测量细胞的前向和侧向散射光强度, 获得细胞的大小和结构信息; 表面增强拉曼光谱是一种强大的检测低浓度分析物的痕量分析技术^[10-12]. 相较而言, 本文的方法光学结构简单、无需复杂样品准备和标记, 利用了偏振方法信息量大、细微结构敏感的优势^[13], 通过测量单个悬浮细胞的散射光偏振态, 获得单个细胞的形态、结构信息, 从而实

现不同(状态)细胞的检测.

偏振是光的固有属性, 光的偏振态可以用斯托克斯向量表示, 如式(1)所示, 其中 I 表示光强; Q 和 U 分别表示水平分量与竖直分量的差, 45° 分量与 -45° 分量的差; V 表示右旋分量与左旋分量的差. 其中偏振参数 q , u , v 表示用光强 I 归一化后的偏振分量, 如式(2)所示.

$$S \equiv \begin{bmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{bmatrix} \quad (1)$$

$$q \equiv \frac{Q}{I}, u \equiv \frac{U}{I}, v \equiv \frac{V}{I} \quad (2)$$

偏振散射方法已经被用于研究生物组织的癌变

* 国家自然科学基金面上项目(21874082, 21573124), 深圳市科技创新委基础研究学科布局项目(JCYJ20170413104646428, JCYJ20170817172150505)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0755-26036026

孙树清. E-mail: sun.shuqing@sz.tsinghua.edu.cn

廖然. E-mail: liao.ran@sz.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2019-07-18, 接受日期: 2019-08-20

和海洋微藻的识别与分类^[14-17]. 本文中, 我们尝试把偏振散射方法用于区分癌细胞和正常红细胞, 并监测癌细胞的生长状态. 文中所用偏振测量装置可以实现对处于悬浮状态的单个粒子散射光偏振态的同时测量. 利用这套装置, 我们对小鼠红细胞、宫颈癌癌细胞散射光偏振态进行测量, 并对处于不同阶段的癌细胞进行测量, 测量结果显示了偏振散射方法用于癌症检测的潜力.

1 试验方法和样品

1.1 实验装置

我们设计了一套微粒散射光偏振态测量装置, 它可以对处于悬浮状态的粒子进行单个测量, 这套装置和文献 [16] 中提到的类似. 其结构简图如图 1 所示, 包括照明端、样品池和探测端 3 部分. 在照明端, 所用光源为 $0.532\ \mu\text{m}$ 绿光激光器, 功率为 200 mW, 出射光偏振态为竖直线偏振. 其后为一旋转可调衰减片 (attenuator, ATT), 用来控制入射光强度. 然后是起偏装置 (polarization state generator, PSG), 用来调节入射光偏振态. 光圈 (diaphragm, DP) 和透镜 (lens1, L1) 用来控制

会聚光斑大小和位置.

悬浮颗粒物被放在一个玻璃烧杯中, 通过磁性搅拌器使之处于悬浮状态. 玻璃烧杯被放在一个截面为正十二边形的玻璃容器中心, 容器间用水填充, 以匹配内外折射率, 同时满足 120° 的测量需求.

在探测端, 粒子的散射光被一个焦距为 50 mm 的凸透镜 (lens2, L2) 收集, 然后聚焦到一个直径为 $100\ \mu\text{m}$ 的圆形针孔 (circular pinhole, PH) 上, 其位置由探测体积位置也就是 L1 会聚光斑位置和 L2 共同决定, 同时 PH 的大小决定了探测体积的大小. 照明端和探测端共同决定的交叉体积就是散射体积^[18]. 我们通过减小探测体积来保证粒子的单个测量. 通过 PH 的散射光最后被准直透镜 L3 收集, 最后通过检偏装置 (polarization state analyzer, PSA) 测量其偏振态.

图中的 PSG 包括 45° 放置的 $1/4$ 波片 QW1 (45° fixed quarter wave-plate), 可旋转偏振片 P (rotatable linear polarizer) 和可旋转 $1/4$ 波片 QW2 (rotatable quarter wave-plate). QW1 用来把光源出射的竖直线偏振光变成圆偏振光, 然后通过 P 和 QW2 变成所需的偏振光.

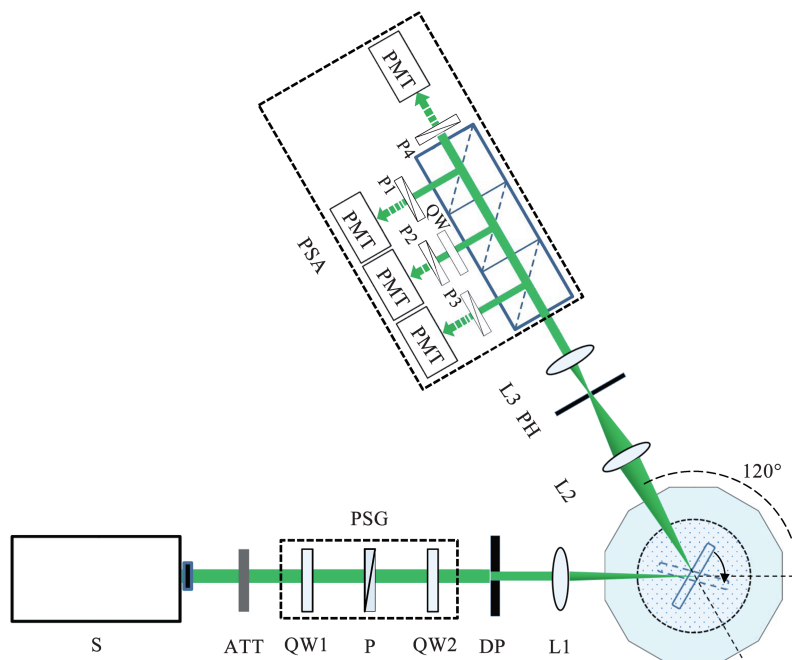


Fig. 1 The schematic of the experimental setup

S: Light source; ATT: Attenuator; PSG: Polarization state generator; QW1: 45° fixed quarter wave-plate; P: Rotatable linear polarizer; QW2: Rotatable quarter wave-plate; DP: Diaphragm; L1 L2 and L3: Lens; PH: Circular pinhole; PSA: Polarization state analyzer; P1: 0° linear polarizer; P2: 90° linear polarizer; P3: 45° linear polarizer; P4: 135° linear polarizer; QW: 135° -fast-axis quarter wave-plate; PMT: Photomultiplier tube. The combination of QW and P2 is a left circular analyzer.

在PSA中, 准直光束依次经过3个偏振无关分光棱镜被分成4束, 分别经过 0° (P1)、 45° (P3)、 135° (P4) 线检偏器和一个由 135° 快轴方向的 $1/4$ 波片和 90° 的偏振片组成的左旋检偏器, 之后被4个光电倍增管 (photomultiplier tube, PMT) 分别接收, 通过计算可以获得斯托克斯向量^[15, 19]. 最后, 通过公式(2)获得偏振分量. 具体方法如下:

在已知PSA仪器矩阵的情况下, 我们可以通过下式计算散射光偏振态 S_{out} :

$$S_{out} = A \times I_{out} \quad (3)$$

其中, $I_{out} = [I_1; I_2; I_3; I_4]$, I_1, I_2, I_3, I_4 分别是4个PMT测得的光强. A 为仪器矩阵, 是一个 4×4 的矩阵.

A 可以通过如下方法提前测得. 通过PSG产生一系列已知偏振态的偏振光 S_{in}^i , 并入射到PSA, i 的范围为 $[1, N]$, 可以获得相应的 I_{out}^i , 由公式(3)可得如下关系式:

$$[S_{out}^1, S_{out}^2, \dots, S_{out}^N] = A \times [I_{out}^1, I_{out}^2, \dots, I_{out}^N] \quad (4)$$

由此可得:

$$A = [S_{out}^1, S_{out}^2, \dots, S_{out}^N] \times \text{pinv}([I_{out}^1, I_{out}^2, \dots, I_{out}^N]) \quad (5)$$

pinv为求伪逆.

文中用线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 来寻找 $[q, u, v]$ 的最佳线性组合方式, 以实现不同细胞的最佳区分效果, 并对其定量衡量.

线性判别分析是一种监督学习的降维技术, 它通过一个参数 L 来衡量类内离散程度以及类间距离, 数值越大代表区分效果越好, 数值越小代表区分效果越差^[20]. 如下式所示:

$$L = \left| \mu_1 - \mu_2 \right|^2 / (\delta_1^2 + \delta_2^2) \quad (6)$$

其中, μ_1 和 μ_2 分别为两种细胞散射偏振态 $[q, u, v]$ 线性组合后的平均值, δ_1 和 δ_2 为标准差. Lm 为最佳区分效果对应的 L 值.

1.2 实验样品

1.2.1 实验动物

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级10周龄C57BL/6J雌性小鼠, 由广东省医学实验动物中心提供. 符合国家及提供实验动物单位制订的有关实验动物福利的规则和制度.

1.2.2 细胞培养

宫颈癌细胞 (HeLa) 用加入10%胎牛血清

(fetal calf serum, FBS) 的DMEM培养基 (dulbecco's modified eagle medium) 培养.

1.2.3 红细胞的提取

从小鼠眼端取血, 加入抗凝血剂柠檬酸钠. 离心分离, 提取红细胞层, 用生理盐水洗涤3次, 待用.

2 实验结果

2.1 小鼠红细胞与宫颈癌细胞 (HeLa)

我们首先对小鼠红细胞和宫颈癌细胞进行实验, 入射光为左旋偏振光, 实验结果如图2所示. 可以看出, 在由 q, u, v 组成的三维偏振空间中, 红细胞和宫颈癌细胞散射偏振态分布在不同的区域. 图2中的曲线, 是用LDA将偏振分量 q, u, v 的组合按照虚线所示一维坐标方向进行投影, 使得两种细胞的偏振分量分布区分得最大, 以寻找两种细胞区分效果最好的一维投影方向^[20]. 经过计算图2中曲线的 Lm 值为1.63 (>1), 可知, 两种细胞的偏振分量可以被区分开来^[16]. 由此, 我们可以用此方法识别红细胞和宫颈癌细胞.

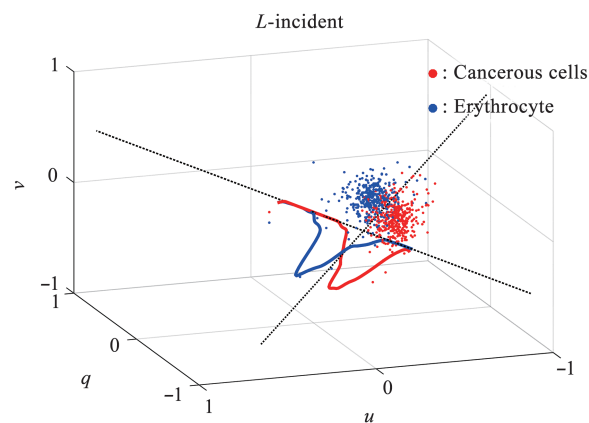


Fig. 2 The scattered $[q, u, v]$ (dots) and LDA distributions (lines in the dashed axes) of cancerous cells and erythrocyte

2.2 宫颈癌细胞 (HeLa) 生长状态监测

实验中我们使用左旋偏振光入射, 先测量宫颈癌细胞的散射光偏振态, 之后将其放置24 h后再次测量, 实验结果如图3所示. 可以看出, 癌细胞的散射光偏振态分布发生了改变. 从LDA计算结果可以看出, 两者的 Lm 值为1.04 (>1), 两种状态的癌细胞仍然可以被区分开^[16]. 实验过程中, 我们同

时拍下了癌细胞的显微照片 (图4). 可以看出癌细胞的形状由纺锤形 (图4a) 变成了圆形 (图4b), 而圆形是死亡之后的状态, 也就是说癌细胞的生长状态的确发生了改变. 这个实验显示, 偏振光散射方法可以对癌细胞生长状态进行监测.

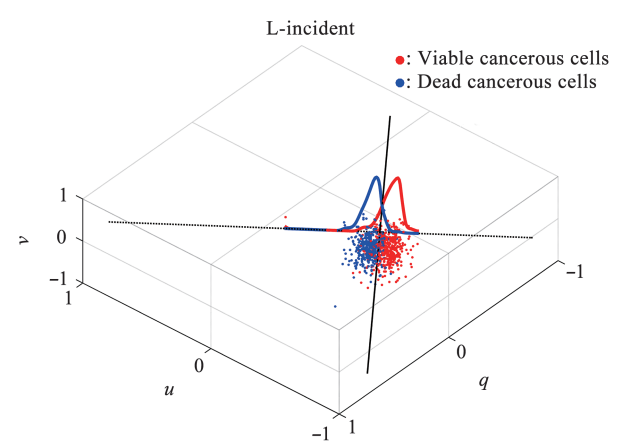


Fig. 3 The scattered $[q, u, v]$ (dots) and LDA distributions (lines in the dashed axes) of viable cancerous cells and the dead cancerous cells

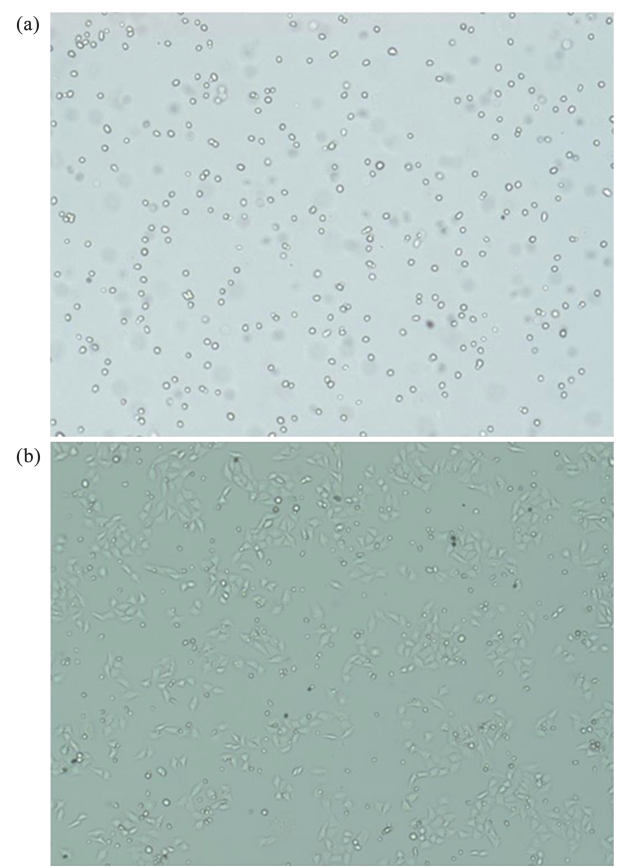


Fig. 4 Microscopic images of the two kinds of microalgae cells

(a) Dead cancerous cell. (b) Viable cancerous cell.

2.3 验证检测极限

首先准备PBS缓冲液120 ml, 测量背景信号, 然后逐渐加入稀释100倍后的癌细胞悬浮液 (原液浓度为 $5\times10^7/\text{ml}$), 使得混合液中癌细胞的浓度增加. 由于该装置测量的是单个细胞的散射信号, 所以可以通过测量相同时间内的脉冲数来检测样品中癌细胞增加的数量. 实验中, 搅拌速度均匀, 并且在每次加入癌细胞混合液后, 测量持续时间均为2 min, 所以这段时间内脉冲数与浓度之间具有相关性. 实验结果如图5所示, 可以看出, 去除背景干扰前提下, 随着癌细胞浓度的增加, 脉冲数呈现线性增长趋势. 而第一个点对应的癌细胞浓度为 $2.5\text{ }\mu\text{l}$, 也就是目前实验的检测极限.

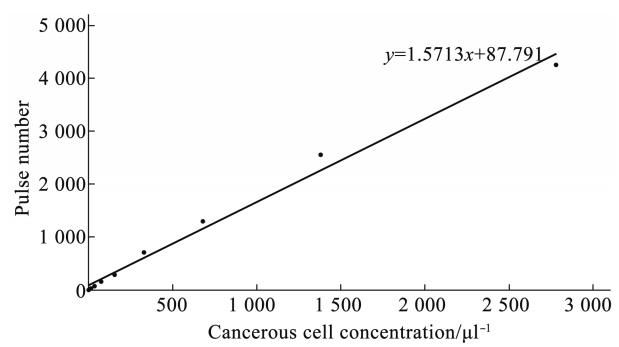


Fig. 5 The number of pulses varies with the concentration of cancer cells

3 结果与讨论

在本文中, 我们展示了一种用于癌症细胞检测的简单、快速的方法——偏振光散射方法. 这种方法针对形状不同的微粒偏振特征不同的特点^[16], 通过测量悬浮单粒子散射光的斯托克斯向量对形状不同的红细胞 (两面凸中央凹的圆饼状) 和癌细胞 (近纺锤形) 进行识别. 在实验室条件下, 我们首先针对红细胞、宫颈癌细胞进行了相关实验. 结果表明, 这种方法可以简捷、快速地识别红细胞和宫颈癌细胞, 展示了这种方法用于癌症检测的可行性. 然后对癌细胞的生长状态进行检测, 结果表明, 这种方法可以对宫颈癌细胞的状态即活细胞状态和死亡细胞状态进行识别, 并且可以通过脉冲数目精确计算出癌细胞的浓度. 因此, 可以根据此种方法来检验血液中的癌细胞浓度, 以及癌细胞的生长趋势. 该方法具有非接触、无损伤、无标记、快速、简单等优点, 可以作为癌变组织检测以及肿瘤

标志物检测等检测方法的补充手段, 在癌症发展趋势的快速检测以及诊疗效果监测等方面提供新思路.

参 考 文 献

- [1] Sun M, Xu J, Shamul J G, *et al.* Creating a capture zone in microfluidic flow greatly enhances the throughput and efficiency of cancer detection. *Biomaterials*, 2019, **197**: 161-170
- [2] Sun W, Zhang X, Jia H-R, *et al.* Water-dispersible candle soot-derived carbon nano-onion clusters for imaging-guided photothermal cancer therapy. *Small*, 2019, **15**(11): e1804575
- [3] Koto M, Takai Y, Jingu K, *et al.* Stereo-tactic body radiotherapy using dual KV-XRAY on-board imaging system for stage I non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, **63**(2): S408-S409
- [4] Lin Y P, Li Z F, Li Z R, *et al.* Real-time photoacoustic and ultrasonic dual-modality imaging system for early gastric cancer: Phantom and *ex vivo* studies. *Opt Commun*, 2018, **426**: 519-525
- [5] Shi X Y, Wang S H, Swanson S D, *et al.* Dendrimer-functionalized shell-crosslinked iron oxide nanoparticles for *in-vivo* magnetic resonance imaging of tumors. *Advanced Materials*, 2008, **20**(9): 1671-1680
- [6] Choi Y, Yoon C, Kim M, *et al.* Scanner-free and wide-field endoscopic imaging by using a single multimode optical fiber. *physical review letters*, 2012, **109**(20): 20391-20395
- [7] You P-Y, Li F-C, Liu M-H, *et al.* Colorimetric and fluorescent dual-mode immunoassay based on plasmon enhanced fluorescence of polymer dots for detection of psa in whole-blood. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(10): 9643-10434
- [8] Spiciarich D R, Nolley R, Maund S L, *et al.* Bioorthogonal labeling of human prostate cancer tissue slice cultures for glycoproteomics. *Angew Chem-Int Edit*, 2017, **56**(31): 8992-8997
- [9] Yaroslavsky A N, Feng X, Muzikansky A, *et al.* Fluorescence polarization of methylene blue as a quantitative marker of breast cancer at the cellular level. *Sci Rep*, 2019, **9**(1):940-949
- [10] Paras N. Prasad, Introduction to Biophotonics. 1st edition. New York: Wiley-Interscience, 2003: 255
- [11] Lin J, Chen R, Feng S, *et al.* Rapid delivery of silver nanoparticles into living cells by electroporation for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **25**(2): 388-394
- [12] Lin D, Zheng Z, Wang Q, *et al.* Label-free optical sensor based on red blood cells laser tweezers Raman spectroscopy analysis for ABO blood typing. *Optics Express*, 2016, **24**(21): 24750-24759
- [13] T. Liu, T. Sun, He H H, *et al.* Comparative study of the imaging contrasts of Mueller matrix derived parameters between transmission and backscattering polarimetry. *Biomedical Optics Express*, 2018, **9**(9): 4413-4428
- [14] Sun M H, He H H, Zeng N, *et al.* Characterizing the microstructures of biological tissues using Mueller matrix and transformed polarization parameters. *Biomed Opt Express*, 2014, **5**(12): 4223-4234
- [15] Chang J T, He H H, Wang Y, *et al.* Division of focal plane polarimeter-based 3 x 4 Mueller matrix microscope: a potential tool for quick diagnosis of human carcinoma tissues. *J Biomed Opt*, 2016, **21**(5): 8-13
- [16] Wang Y, Liao R, Dai J C, *et al.* Differentiation of suspended particles by polarized light scattering at 120 degrees. *Opt Express*, 2018, **26**(17): 22419-22431
- [17] Wu Z J, Liao R, Sun X Y, *et al.* Digital quantification of DNA by mapping polarization degree related with coding gold nanorods. *Appl Opt*, 2017, **56**(33): 9301-9307
- [18] Kam Z. Absorption and scattering of light by small particles-bohren,c,huffman,dr. *Nature*, 1983, **306**(5943): 625-625
- [19] Chang J T, Zeng N, He H H, *et al.* Single-shot spatially modulated Stokes polarimeter based on a GRIN lens. *Opt Lett*, 2014, **39**(9): 2656-2659
- [20] Li M, Yuan B Z. 2D-LDA: A statistical linear discriminant analysis for image matrix. *Pattern Recognit Lett*, 2005, **26**(5): 527-532

Use Polarization Light Scattering to Detect The Cancer Cell*

SUN Xiang-Yu^{1,2)**}, WANG Yong^{1,2,3)**}, LIAO Ran^{4,5)***}, SUN Shu-Qing^{1,2)***}, MA Hui^{1,2)}

⁽¹⁾*Institute of Optical Imaging and Sensing, Shenzhen Key Laboratory for Minimal Invasive Medical Technologies,*

Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;

⁽²⁾*Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*

⁽³⁾*School of Science, Qingdao University of Technology, Qingdao 266033, China;*

⁽⁴⁾*Guangdong Engineering Center for Polarization Technologies, Graduate School at Shenzhen Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;*

⁽⁵⁾*Division of Ocean Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)*

Abstract The detection of diseased cells in blood is an important method in cancer diagnosis and treatment. The existence of cancerous cells in the blood indicates that the body have been already canceration. Therefore, the identification and detection of the cancerous cells has the significant meaning in the medical science. Polarization is an inherent characteristic of light. The properties of different substances can be detected by their different polarization characteristics of light. In this article, we discussed the property of the cancerous cells firstly used the polarized light scattering method. Base on the different character in polarized light, we successfully distinguished the cancerous cells and erythrocyte, the viable cancerous cell and the dead cancerous cell. This method is non-invasive, non-in, high-sensitive and high-resolution compared to other ones. It provide the new ideas for cancer diagnosis and treatment.

Key words cancerous cells, polarized light scattering, recognition

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0045

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21573124, 21874082) and Fundamental Research Program of Shenzhen (Committee of Scientific and Technological Innovation of Shenzhen) (JCYJ20170413104646428, JCYJ20170817172150505).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author. Tel: 86-755-26036026

SUN Shu-Qing. E-mail: sun.shuqing@sz.tsinghua.edu.cn

LIAO Ran. E-mail: liao.ran@sz.tsinghua.edu.cn

Received: July 18, 2019 Accepted: August 20, 2019