

文章编号: 0258-7025(2003)Supplement-0211-04

# 对混浊介质深层进行单、双光子显微成像中 数值孔径的影响

鲁强, 骆清铭, 曾绍群

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉, 430074)

**摘要** 发展了蒙特卡罗方法用于模拟混浊介质深层的单、双光子激发荧光显微成像。针对横向分辨率的研究, 提出了基于点扩散函数的快速算法, 由于避免了成像中扫描过程的模拟, 大幅度地提高了效率。在此基础上, 研究了数值孔径对单、双光子显微成像的影响。结果表明, 数值孔径的增加将降低混浊介质深层显微成像的横向分辨率, 但有利于提高层析能力。

**关键词** 生物物理学; 显微成像; 混浊介质; 蒙特卡罗模拟; 数值孔径

中图分类号 R318.51

文献标识码 A

## Effects of Numerical Aperture on Single-, Two- Photon Microscopic Imaging Through Turbid Media

LU Qiang, LUO Qing-ming, ZENG Shao-qun

(The Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education,  
Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

**Abstract** Monte Carlo method is enhanced to simulate single-, two-photon excitation fluorescence microscopic imaging through turbid media. Furthermore, a rapid modeling method, which is based on point spread function, is developed to study lateral resolution. Since simulation of scanning process in imaging is avoided, high efficiency is obtained. With this model, effects of numerical aperture (NA) on single- and two-photon microscopic imaging through turbid media are researched. Results show that higher NA brings lower lateral resolution but higher axial sectioning ability.

**Key words** biological physics; microscopy; turbid medium; monte carlo simulation; numerical aperture

### 1 引言

单、双光子激发荧光共焦扫描显微成像术(1, 2-p)具有超分辨的三维层析能力, 是目前生命科学中细胞、亚细胞结构研究重要的活体观察手段<sup>[1]</sup>。如何提高单、双光子成像的横向分辨率和轴向层析能力, 特别是样品表面下深层成像能力一直是其相关光学研究的重要问题。数值孔径 NA 是显微光学系统的重要参数。来自标量衍射理论的结果认为显微成像的分辨极限为  $0.61\lambda/NA$ , 其中  $\lambda$  为照明光波长<sup>[2]</sup>。这意味着更高的数值孔径能获得更高的成像分辨率。Gu 和 Sheppard 等<sup>[3]</sup>对共焦光学系统进行三维光学传

递函数的研究也认为更高的数值孔径带给成像更高的横向分辨率和纵向层析能力。事实上对生物样品成像而言, 由于生物组织对光具有混浊特性, 因而对生物组织(混浊介质)表面以下深层目标进行成像时, 携带信息的光子往往经历多次散射才到达探测器。多次散射的特性, 使分辨率的问题变得复杂。来自组织光学的研究认为, 经历多次散射的光子往往使分辨率变低。而更大数值孔径的显微物镜将收集到更多的经历多次散射的光子<sup>[4]</sup>。这意味着更高的数值孔径将带给成像更低的分辨率。下面研究数值孔径对单、双光子激发显微成像的影响。

由于混浊介质和光学系统参数的影响,采用光学系统分析中常用的标量衍射理论或组织光学研究中常用的辐射传输理论进行研究都显得不足。因此,发展了蒙特卡罗法。其中,采用几何光线追踪法模拟光在显微光学系统中的传输,采用蒙特卡罗法模拟光子在混浊介质中的迁移。由于受蒙特卡罗法计算效率的局限,采用直接成像模拟需要非常多的计算资源。提出了一种基于蒙特卡罗法的点扩散函数计算的快速算法<sup>[6]</sup>。该算法由于避免了扫描的模拟而使效率成倍地提高。基于以上模型,对埋在混浊介质深层的荧光锐边模型进行成像模拟,探讨了数值孔径对成像横向分辨率和纵向层析能力的影响。

## 2 模型

一个典型的单、双光子激发荧光共焦扫描反射式显微成像系统光路如图 1 所示。物镜  $L_1$  与集光镜  $L_2$  共轭放置,光源  $S$ ,探测器 PMT 以及样品置于共轭焦点。光源  $S$  发出的照明光经物镜  $L_1$  会聚在样品表层深度为  $d$  的焦点,激发该处荧光团发出荧光。荧光经过混浊样品散射与吸收,逃逸出样品表面的为集光镜  $L_2$  收集,会聚于探测平面。通过针孔的光为探测器 PMT 所探测,为信号荧光,即聚焦点处荧光点物的像。当物体或成像光学系统进行三维扫描时,就可以获得样品的三维像(探测器与光源的扫描与物的扫描等效,在以下分析中采用物扫描以简化描述)。采用不同波长的照明光,激发荧光的过程可以是每吸收一个照明光子激发一个荧光光子的单光子激发( $p=1$ ),也可以是每吸收两个照明光子激发

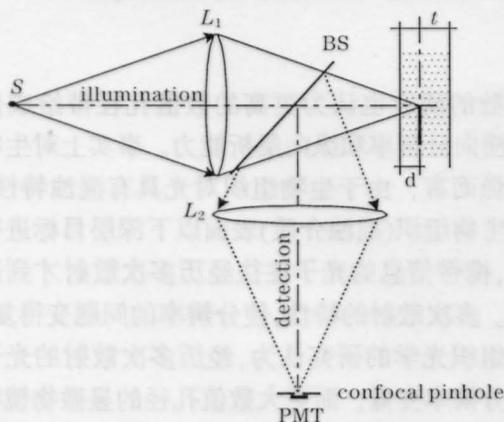


图 1 用单、双光子激发显微成像系统示意图。S:光源;PMT:光电倍增管; $L_1$ :物镜; $L_2$ :集光透镜;BS:分束器;Confocal Pinhole:共焦针孔; $d$ :入射深度; $t$ :样品厚度

Fig.1 Schematic of 1,2-p microscopic imaging system. S: light source;  $L_1$ : objective lens;  $L_2$ : collection lens; BS: beam splitter;  $d$ : incident depth;  $t$ : sample thickness

一个荧光光子的双光子激发( $p=2$ )。该不同阶次的激发成像过程分别被称为单光子或双光子成像。光路中引入有滤光片组 BS 区分照明光路和荧光光路。共焦针孔的引入,焦区以外被激发的荧光被针孔屏蔽而不能为探测器所探测,共焦针孔给成像系统带来探测选择性。对双光子而言,由于激发过程是非线性光学过程,仅在焦点处才有足够的光子密度激发荧光,因此双光子激发给成像系统带来照明选择性。正是这两种选择性给单、双光子扫描成像带来横向高分辨与纵向高层析能力。

在单、双光子成像的蒙特卡罗模拟中,几何光学用于描述样品以外照明光与荧光在显微光学系统中的传播,蒙特卡罗方法用于模拟照明光与荧光在混浊样品中的传播。照明光子的生成服从聚焦高斯光束的特征。荧光激发过程由于是受激自发辐射过程,生成的荧光光子在照明光子入射荧光团处产生,传播方向  $4\pi$  空间角度均匀分布。光子在样品表面服从菲涅耳定律。样品内的散射采用 Henyey-Greenstein 相函数模拟,吸收服从指数分布。成像研究中横向分辨率用可分辨距离  $\Gamma$  来衡量, $\Gamma$  定义为埋藏于混浊介质中的荧光锐边所成像归一化后 0.1~0.9 间的横向距离, $\Gamma$  越大分辨率越低。

单、双光子激发成像需要扫描过程,扫描点数直接影响了成像的分辨率,获得满意的分辨率要求扫描点数足够多。对蒙特卡罗法而言,单点成像往往就需要  $10^7$  个光子的模拟(PII366 64M PC 下计算时间约 30 min),计算资源的要求则几乎与扫描点数成线性递增关系。由于生物样品横向尺寸远远大于成像深度,对单、双光子横向扫描二维成像时,就可以将成像过程近似认为是线性过程从而满足成像卷积关系

$$I(X) = \int O(X')H(X;X')dX'$$

其中, $O(\cdot)$ 为物函数, $H(\cdot)$ 为系统点扩散函数, $I(\cdot)$ 为像函数, $X$ 为二维空间坐标。因此对 $H(\cdot)$ 的计算即可以得到像及其分辨率。对嵌于无限大均匀混浊介质中的点物而言,扫描过程中探测到的成像信号光即构成点扩散函数 $H(\cdot)$ 。对具有旋转对称的成像系统而言,该系统点扩散函数等价于对无限大荧光面物非扫描成像时成像信号光在荧光面上的分布<sup>[5]</sup>。也就是说,通过求取对荧光面物进行非扫描成像时,成像信号光在物面上的分布即可以获得包含有混浊介质的单、双光子成像系统的点扩散函数。基于此,

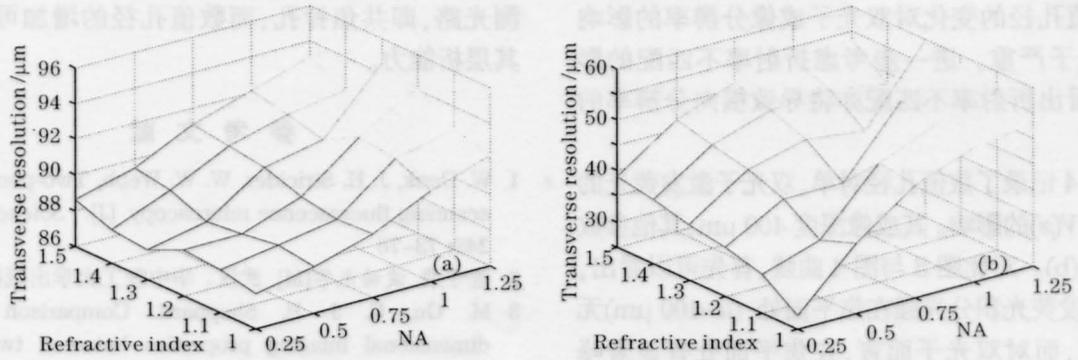


图2 单光子激发(a)和双光子激发(b)时分辨率与数值孔径的关系(不同样品折射下)

Fig.2 Resolution of 1-p (a) and 2-p (b) for various NA and refractive indices

定义以下步骤获取系统的点扩散函数:1) 通过蒙特卡罗模拟获取照明光光强分布,而后计算所激发荧光的分布;2) 按荧光分布生成荧光光子,同时记录生成位置  $P_0$ ;3) 通过再一次蒙特卡罗过程确定生成的荧光光子是否成像信号光;4)最后计算成像信号光按生成位置  $P_0$  的分布,即为多光子成像系统的点扩散函数  $H(\cdot)$ 。

对轴向层析能力的分布,则通过计算照明光  $I_i(x,y,z)$ 及信号荧光  $I_f(x,y,z)$ 的轴向积分分布

$$V(z)=Q[I(x,y,z)]$$

来表征,算子  $Q(\cdot)$ 为

$$H[f(x,y,z)]=\int_{-\infty}^{\infty} f(x,y,z)dx dy$$

### 3 结果与讨论

记录共焦点孔半径  $50 \mu\text{m}$ ,透镜浸物为空气(折射系数为1),照明光波长分别为  $800 \text{ nm}$ ,荧光波长  $600 \text{ nm}$  时,成像系统对吸收系数  $10 \text{ cm}^{-1}$ ,散射系数  $100 \text{ cm}^{-1}$ ,各项异性因子 0.9 的样品表面下  $500 \mu\text{m}$  的

荧光锐边进行单、双光子成像时,数值孔径 NA 在  $0.25 \sim 1.25$ ,样品折射系数  $1 \sim 1.5$  的分辨率,如图 2(a),(b)所示,其中忽略了混浊介质照明光、荧光波长不同引起的光学特性差异。从图 2 中可以看出在给定样品情况下,数值孔径的增加引起分辨率的提高,例如样品折射系数为 1 时,数值孔径从 0.25 增加到 1.25 时,单光子分辨率从  $88 \mu\text{m}$  增加到  $92 \mu\text{m}$ ,双光子分辨率从  $28 \mu\text{m}$  增加到  $53 \mu\text{m}$ 。这也

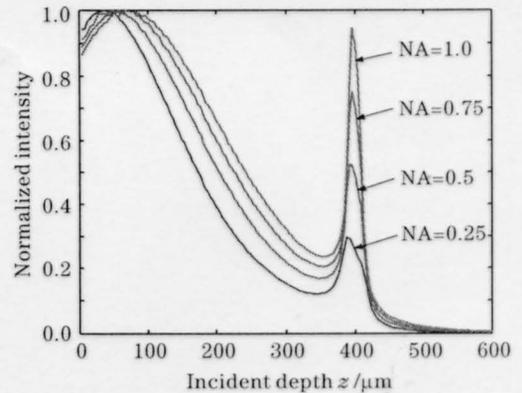


图4 不同数值孔径下双光子激发荧光归一化积分光强

Fig.4 Normalized integral intensity of 2-p excited fluorescence with different NA

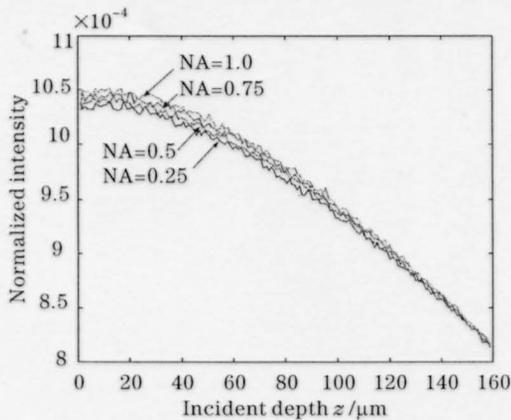


图3 不同数值孔径单光子激发荧光积分光强

Fig.3 Integral intensity of 1-p excited fluorescence with different NA

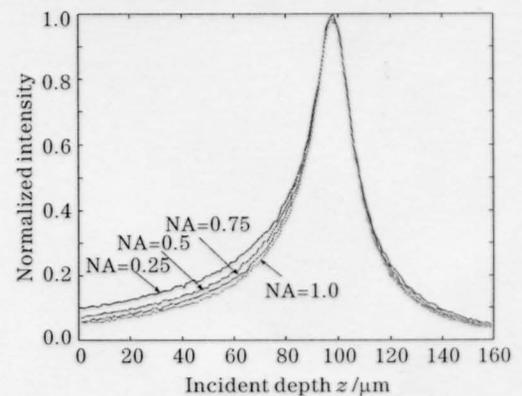


图5 不同数值孔径下双光子信号荧光积分光强

Fig.5 Normalized integral intensity of 2-p signal fluorescence with different NA

表明,数值孔径的变化对双光子成像分辨率的影响比对单光子严重。进一步考虑折射率不匹配的影响,可以看出折射率不匹配亦将导致横向分辨率的降低。

图3,4记录了数值孔径对单、双光子激发荧光的积分光强  $V(z)$  的影响。其成像深度  $400 \mu\text{m}$ ,其他参数同图2(a),(b)。对比图3与图4曲线,首先可以看出,单光子激发荧光积分光强在焦平面处 ( $\mu=400 \mu\text{m}$ ) 无明显峰值,而对双光子而言,在焦平面处有显著峰值,这表明单光子成像中激发本身不具有层析能力,而双光子非线性激发具有内在层析能力。此外从图4可见数值孔径的增加  $\text{NA}=0.25\sim 1.0$  带来峰值的增高,这意味着层析能力的提高。但对单光子激发本身并未见明显影响。进一步考察对单光子信号荧光积分光强的影响,如图5所示。其中可以看出,数值孔径的增加可以提高单光子成像的层析能力。这说明单光子激发显微成像层析能力来源于探

测光路,即共焦针孔,而数值孔径的增加可以提高其层析能力。

参考文献

- 1 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, **248**: 73-76
- 2 董守荣. 波动光学[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1988
- 3 M. Gu, C. J. R. Sheppard. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy [J]. *J. Microsc.*, 1995, **177**(2):128-137
- 4 X. Gan, S. P. Schilders, M. Gu, Image formation in turbid media under a microscope[J]. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1998, **15**(8):2052-2058
- 5 Q. Lu., S. Zeng, Q. Luo *et al.*. Rapid modeling of two-dimensional multi-photon excitation microscopic imaging through turbid medium [J]. *Opt. Commun.*, 2001, **189**:227-234

