

文章编号: 0258-7025(2009)10-2552-05

# 基于透射和反射时间分辨测量数据的 荧光参数三维重建

张丽敏 高峰 李娇 赵会娟

(天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072)

**摘要** 提出了一种同时重建荧光参数的全三维时域荧光分子层析方法,通过选择一对合适的拉普拉斯变换因子提取时间扩展曲线的特征信息,求解时域耦合扩散方程。在图像重建过程中,应用代数重建技术求解线性逆问题,且引入归一化玻恩比方法。基于多通道时间相关单光子计数系统对模拟仿体进行了透射和反射式时间分辨数据测量,利用所提方法同时重建了荧光产率和寿命的三维图像。实验结果表明利用反射式测量数据目标体位置、大小、形状等方面具有一定的偏差,透射式达到了较好的重建效果,而两种模式相结合重建效果最优。

**关键词** 生物光学;荧光分子层析;图像重建技术;时间分辨

中图分类号 Q63 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2552

## Reconstructing Three-Dimensional Fluorescent Parameters Using Time-Resolved Data Based on Transmittance and Reflection Measurements

Zhang Limin Gao Feng Li Jiao Zhao Huijuan

(College of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract** We present a full three-dimensional algorithm for time-domain fluorescence molecular tomography. A pair of appropriate transform-factors is employed to extract the featured information on the temporal profiles for time-domain coupled diffusion equations. The linear inversions at two distinct transform-factors are solved with an algebraic reconstruction technique, and the normalized Born ratio is proposed. The simulate phantom is measured in reflection and transmittance modes by use of multi-channel time-correlation single photon counting system. We experimentally validate that the proposed scheme can achieve simultaneous three-dimensional reconstruction of the fluorescent yield and lifetime. The results show that for the positions, sizes and shapes of the targets, there are some deviation in reflection measurement, the quality in transmittance one is better and in the two-mode is more satisfied.

**Key words** photobiology; fluorescence molecular tomography; image reconstruction techniques; time-resolved

### 1 引 言

随着荧光分子探针技术在生物医学研究中的深入和广泛应用,荧光分子层析(FMT)技术作为一种新颖的分子成像方式得到了不断发展。其主要优势在于能够进行疾病过程的在体检测、基因治疗的在体示踪、药物的在体疗效测评、功能分子的在体活动规律研究等方面<sup>[1~6]</sup>。FMT 图像重建方法在稳态和频域模型下已通过模拟和实验验证<sup>[7~11]</sup>。在稳

态模型中应用连续光激发组织体,在边界位置探测出射光的强度,可用于重建荧光产率(荧光吸收系数和量子效率之积)图像。由于荧光寿命独立于荧光剂浓度、光漂白等非本征因素,对荧光剂所处微环境的生化信息,如 pH 值、黏度、氧合度等信息特别敏感,因此在重建荧光产率的基础上再对荧光寿命重建可极大地提高癌症的早期诊断能力<sup>[11,12]</sup>。频域系统可通过测量光的振幅和相位变化实现荧光产率

收稿日期: 2009-07-02; 收到修改稿日期: 2009-08-10

基金项目: 国家 863 计划(2009AA02Z413)、国家自然科学基金(60578008)、天津市自然科学基金(07JCYBJC06600)和高等学校学科创新引智计划(B07014)资助课题。

作者简介: 张丽敏(1980—),女,博士,讲师,主要从事生物医学光电成像方面的研究。E-mail: zhanglm@tju.edu.cn

和寿命的同时成像。由于典型的荧光寿命在纳秒量级,几百兆赫兹的调制频率仍不能提供足够高的相位差,而当调制频率高至吉赫兹时,在实际应用中则不可行<sup>[13,14]</sup>。时域方法能克服上述两种模式的缺点,具有多参数和多组分荧光图像同时重建能力。因而,FMT 成像技术研究在时域模式下逐渐开展<sup>[15~17]</sup>。由于直接应用时域测量数据计算量庞大,因而重建算法一般采用变换数据类型的方法。如傅里叶变换、梅林变换以及拉普拉斯变换等。其中拉普拉斯变换方法在噪声鲁棒性、稳定性和计算速度等方面具有优势<sup>[17]</sup>。

本文基于时域耦合扩散方程,通过拉普拉斯变换提取时间信号特征信息,结合代数重建技术及归一化玻恩比方法同时重建荧光产率和寿命图像。采用多通道时间相关单光子计数系统对模拟仿体进行透射式和反射式测量,对所提方法进行实验验证,并对重建结果进行讨论。

## 2 理论方法

在荧光分子层析中,一般需用一种荧光生化标记物(荧光染料,如 ICG)作为对比剂,将其注射到生物组织后,在外部光源的激发下,上述标记物发出近红外荧光,通过对组织表面溢出的光信息进行检测,进而采用重建方法得到标记物荧光参数在组织中的分布图像<sup>[18]</sup>。荧光在组织体中的传播模型需考虑如下过程:1)激发光  $\lambda_x$  由组织体表面进入内部;2)被荧光团吸收;3)激发出荧光  $\lambda_m$ ,且有  $\lambda_m > \lambda_x$ ;4)荧光在组织体中传播后传出组织体表面。当介质在光学传播厚度范围内,且荧光光源和探测面达到一定距离时,扩散方程可很好地描述光在高散射、低吸收介质中的传输过程。对于时域荧光分子层析,激发光和荧光的传播可由时域耦合扩散方程表示,对此方程进行拉普拉斯变换,有<sup>[17]</sup>

$$\begin{cases} [-\nabla \cdot \boldsymbol{\kappa}_x(\mathbf{r})\nabla + (\mu_{ax}(\mathbf{r})c + \beta)]\Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_s) \\ [-\nabla \cdot \boldsymbol{\kappa}_m(\mathbf{r})\nabla + (\mu_{am}(\mathbf{r})c + \beta)]\Phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta) = c\Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta)\eta\mu_{af}(\mathbf{r})/[1 + \beta\tau(\mathbf{r})] \end{cases}, \quad (1)$$

式中  $x$  和  $m$  分别表示激发波长和发射波长; $\Phi_\nu(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta) = \int_0^\infty \Phi_\nu(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t)\exp(-\beta t)dt$ ( $\nu \in [x, m]$ ),为与时间相关的光子密度  $\Phi_\nu(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, t)$  的拉普拉斯变换, $\beta$  表示拉普拉斯变换因子; $c$  为光子在介质中的传播速度; $\boldsymbol{\kappa}_\nu(\mathbf{r}, t) = c/[3\mu'_{s\nu}(\mathbf{r})]$  为扩散系数, $\mu'_{s\nu}(\mathbf{r})$  表示约化散射系数;荧光产率  $\eta\mu_{af}(\mathbf{r})$  和寿命  $\tau(\mathbf{r})$  表示荧光参数。

本文引入归一化玻恩比方法,它具有与光源强度无关,对系统误差具有较小敏感性等优点<sup>[19]</sup>,且与文中所提的拉普拉斯变换方法相结合能够克服测量系统的零点校正问题。归一化玻恩比即用激发源在  $\mathbf{r}_s$  处激发、探测器在  $\mathbf{r}_d$  处测得的荧光光流量除以相应的激发光的光流量,结合(1)式可得

$$I_m(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_s, \beta)/I_x(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_s, \beta) = \Theta \int_{\Omega} cG_m(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}, \beta) \times \Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta) d\Omega / I_x(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_s, \beta), \quad (2)$$

式中  $I_\nu(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_s, \beta)$  为边界测得的光子流量;在实验过程中, $\Theta$  是与激发光和荧光的归一化强度以及滤光片衰减系数相关的因子; $G_m(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}, \beta)$  表示发射光的格林函数; $x(\mathbf{r}, \beta) = \eta\mu_{af}(\mathbf{r})/[1 + \beta\tau(\mathbf{r})]$ 。由于

需重建的荧光参数个数远远大于测量数据个数,使得对荧光参数的求解过程变为欠定问题,且计算过程通常导致需计算大型矩阵。在正规化方法中可采用代数重建技术通过对矩阵进行逐行计算,有效快速地对方程进行求解。

一般来说不同的变换因子  $\beta$  强调时间分辨曲线的不同部分。经拉普拉斯变换的时域扩散方程与稳态扩散方程表示形式类似,其中  $[\mu_{av}(\mathbf{r})c + \beta]$  项相当于稳态问题中的吸收系数项  $[\mu_{av}(\mathbf{r})c]$  为吸收系数,因此在物理意义上必有  $[\mu_{av}(\mathbf{r})c + \beta] \geq 0$  ( $\nu \in \{x, m\}$ ),且对于发射扩散方程的光源项应有  $S_m(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta) = c\Phi_x(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \beta)\eta\mu_{af}(\mathbf{r})/[1 + \beta\tau(\mathbf{r})] \geq 0$ 。因而使上述两个条件同时成立的条件为  $\beta \geq \max\{-\mu_{av}c, -1/\tau\}$ ,这样可使与时间相关的扩散方程在物理上有意义,同时在数学上是稳定的。基于以上说明,经验地选择一对变换因子  $\beta_{1,2} = \mp 1/[1/(\mu_{ax}^{(B)}c) + 1/(\mu_{am}^{(B)}c) + \tau^{(B)}]$ (上标  $B$  表示背景)<sup>[20]</sup>。由于需重建的未知量  $x(\mathbf{r}, \beta)$  是荧光产率、寿命和拉普拉斯变化因子  $\beta$  的函数,相应的重建量为  $x(\mathbf{r}, \beta_1)$  和  $x(\mathbf{r}, \beta_2)$ ,通过如下公式即可获得荧光产率和寿命的分布

$$\begin{cases} \eta \mu_{af}(\mathbf{r}) = (\beta_1 - \beta_2)x(\mathbf{r}, \beta_1)x(\mathbf{r}, \beta_2) / [\beta_1 x(\mathbf{r}, \beta_1) - \beta_2 x(\mathbf{r}, \beta_2)] \\ \tau(\mathbf{r}) = - [x(\mathbf{r}, \beta_1) - x(\mathbf{r}, \beta_2)] / [\beta_1 x(\mathbf{r}, \beta_1) - \beta_2 x(\mathbf{r}, \beta_2)] \end{cases} \quad (3)$$

### 3 实验验证

为验证上述方法,采用透射和反射两种模式对模拟仿体进行时间分辨测量。图1为透射模式下多通道时间分辨测量装置。实验过程为:皮秒脉冲激光器(BLHP-700, Becker & Hickl Gmbh)发出波长660 nm的激发光,经直径62.5  $\mu\text{m}$ ,数值孔径0.22的光纤导出,之后由1:16光开关将激发光源依次导入16个源位置。对于每次源入射,4个4:1光开关分4次,每次选择4个相邻检测点作并行时间相关单光子计数(TCSPC, SPC-134, Becker & Hickl Gmbh)检测,探测光纤直径500  $\mu\text{m}$ ,数值孔径0.37。随后切换源位置重复上述测量,直至16个源位置“扫描”完毕。在测量荧光时,探测光纤需经3片长通滤波器将激发光滤除。整个系统由计算机控制,为消除外界光对系统测量的影响,将装置置于黑暗状态下。对于反射模式则在上述装置基础上进行了单通道测量。

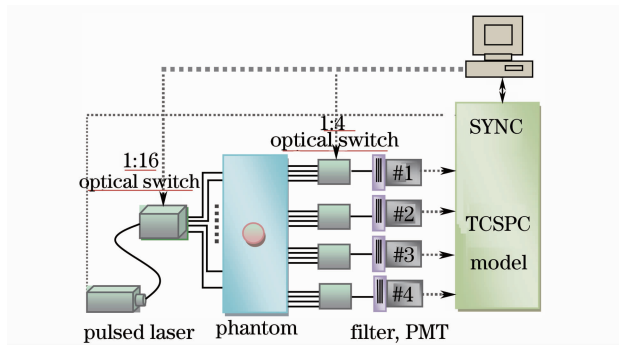


图1 实验装置示意图

Fig.1 Sketch map of experimental setup

模拟仿体为长100 mm $\times$ 25 mm $\times$ 70 mm的长方体,由聚甲醛(Polyformaldehyde)组成。采用基于反射模式的光学参数时域测量方法测得其吸收系数 $\mu_a(\mathbf{r}) = 0.0038 \text{ mm}^{-1}$ ,约化散射系数 $\mu'_s(\mathbf{r}) = 0.938 \text{ mm}^{-1}$ 。目标体由仿体上开出直径5 mm,高60 mm的圆柱型孔模拟,孔内注入1% Intralipid溶液和Cy5.5荧光染料(激发和发射峰值分别在670 nm和710 nm)。用同样方法测得其吸收系数 $\mu_a(\mathbf{r}) = 0.0017 \text{ mm}^{-1}$ ,约化散射系数 $\mu'_s(\mathbf{r}) = 0.87 \text{ mm}^{-1}$ [21]。由于设计的模拟仿体较大,为减小计算量,在目标体周围截取较小的计算模型用于图像重建。在外推边界条件下计算模型如图2

所示。在所坐标系下,目标体的中心坐标为 $X = 32 \text{ mm}, Z = 15 \text{ mm}$ 。对于透射式测量,16个光源入射点位于 $Z = 0$ 的 $XY$ 平面,探测点位置与其相对,间隔为7 mm $\times$ 7 mm,视场范围(Field of View, FOV)为21 mm $\times$ 21 mm。对于透射式测量,光源与探测器则具有相同的位置分布。

在图像重建过程中,根据经验选择仿体背景的荧光产率 $\eta \mu_{af}(\mathbf{r}) = 0.00001 \text{ mm}^{-1}$ ,荧光寿命 $\tau(\mathbf{r}) = 10000 \text{ ps}$ 。计算过程中采用有限元方法将仿体离散成边长1.5 mm的立方体。代数重建技术的迭代次数固定为20,松弛因子选为0.1。

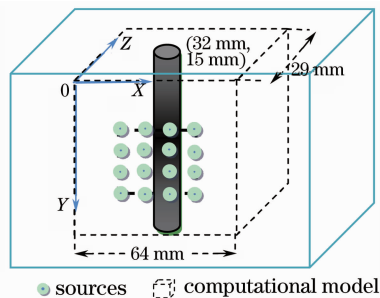


图2 仿体计算模型

Fig.2 Computational model of phantom

### 4 实验结果及讨论

利用本文所提的时域荧光分子重建方法,分别进行了基于透射式、反射式以及透射、反射相结合测量数据的三维图像重建。图3(a),(b),(c)分别给出了荧光产率和寿命在 $Z = 15 \text{ mm}$ 时, $XY$ 平面(左)以及 $X = 32 \text{ mm}$ 时, $XZ$ 平面(右)的重建图像。

由图3(a)可以看出,在 $XY$ 平面中,荧光产率进行了较好的重建,重建目标的形状、位置、大小均与实际目标相符;而荧光寿命图像、重建目标的形状和位置与实际情况符合,但大小上有较大的膨胀。 $XZ$ 平面的剖面图则显示荧光产率和寿命的重建结果在 $Z$ 方向有较大的拉伸,这是由于此测量方式缺乏横向信息的测量。

图3(b)显示,在反射测量方式下,图像重建算法虽然对于荧光产率和寿命均有明显的重建结果,但由 $XY$ 平面图像可以看出重建目标高度比实际情况偏小,重建位置相对于实际位置有明显的向外偏移,大小上有较大的膨胀。因而反射式测量在目标体

距测量表面较深时位置偏差加大,更适于浅表测量。 $XZ$  平面的剖面图则显示重建结果在  $X$  方向有较大的拉伸,其主要原因为测量数据缺乏纵向信息。

图 3(c)显示结合两种测量数据重建时,由于测量数据和角度的增加,对于  $XY$  平面,此算法对荧光产率图像进行了很好的重建,重建目标的形状、位

置、大小均与实际目标相符;重建目标的荧光寿命形状和位置与实际情况符合,但大小上仍有膨胀。 $XZ$  平面的剖面图可以看出相比于前两种方式,由于两种方式结合具有更多的角度信息,重建质量有所提高,尤其是荧光产率图像。另外荧光产率的量化度在同样参数下,反射透射相结合方式有明显的提高。

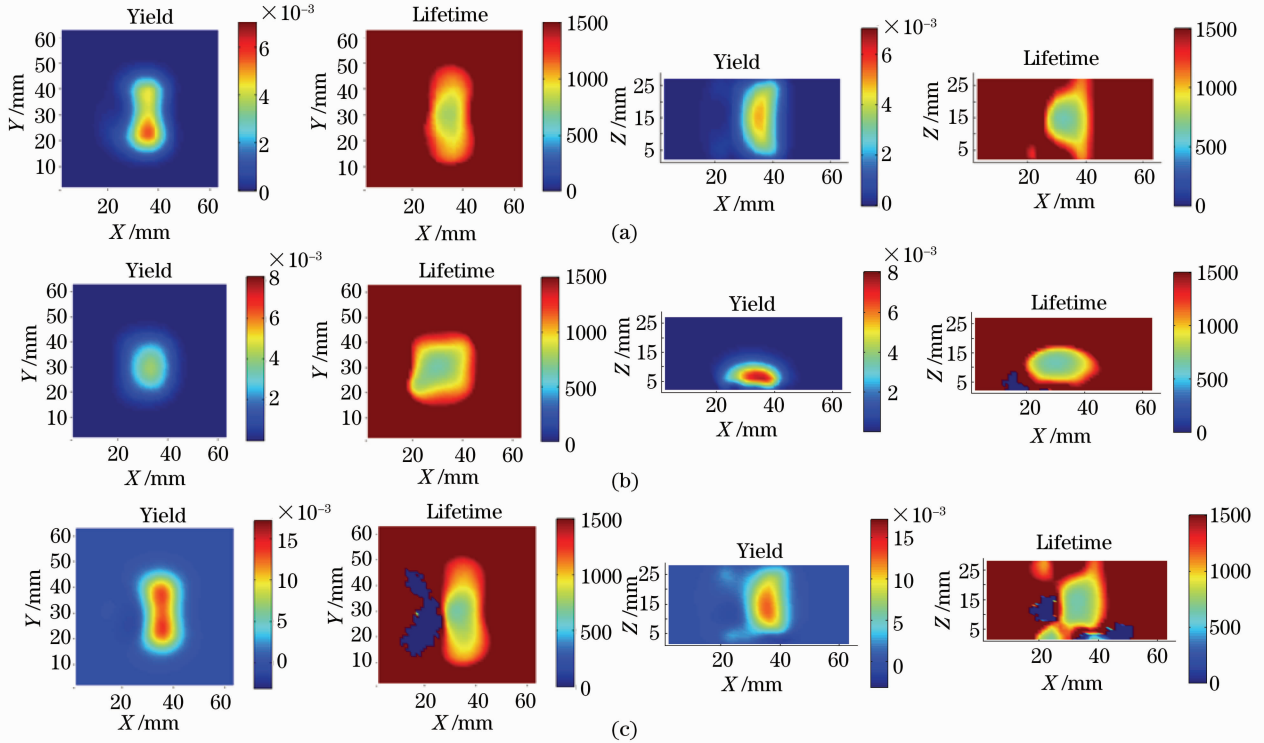


图 3 基于透射式(a)、反射式(b)以及透射、反射相结合(c)测量下重建荧光产率和寿命在  $Z=15$  mm 的  $XY$  剖面图(左)以及  $Y=30$  mm 的  $XZ$  剖面图(右)。

Fig. 3 Reconstructed images of fluorescent yield and lifetime for the vertical slice at the  $Z=15$  mm (left) and the horizontal slice at the  $Y=30$  mm (right) based on the (a) transmittance, (b) reflection and (c) the two-mode measurements

## 5 结 论

基于时域耦合扩散方程,通过选择一对合适的拉普拉斯变换因子提取时间扩展曲线的特征信息,利用归一化玻恩比方法与光源强度无关、对系统测量误差敏感性小等特点,结合代数重建技术同时重建荧光产率和寿命图像。为验证所提方法,采用多通道时间相关单光子计数系统对模拟仿体进行了透射式和反射式测量。实验结果表明,此方法能够同时重建荧光产率和寿命的三维图像。重建图形显示出利用反射式测量数据目标体位置、大小、形状等方面具有一定的偏差,透射式则达到了较好的重建效果,而两种模式相结合时由于增加了测量数据和角度重建效果最优。本方法有望今后用于小动物成像实验。另外随着时间相关的单光子计数系统及其他

硬件测量系统的发展,时域测量方法也将得到不断发展。

## 参 考 文 献

- 1 S. R. Cherry. In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2004, **49**(3): 13~48
- 2 T. F. Massoud, S. S. Gambhir. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light [J]. *Genes Development*, 2003, **17**(5): 545~580
- 3 V. Ntziachristos, C. Bremer, E. E. Graves *et al.*. In vivo tomographic imaging of near-infrared fluorescent probes [J]. *Molecular Imaging*, 2002, **1**(2): 82~88
- 4 Mao Zhengle, Wang Chen, Cheng Ya. Superresolution Far-field fluorescence bio-imaging breaking the diffraction barrier [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1283~1307
- 5 毛峥乐,王琛,程亚. 超分辨远场生物荧光成像—突破光学衍射极限[J]. *中国激光*, 2008, **35**(9): 1283~1307
- 5 Qu Xiaochao, Liang Jiaming, Yao Cuiping *et al.*. Optical properties of gold nanoparticle and its application in biological

- imaging and photothermal therapy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(11): 1459~1465
- 屈晓超, 梁佳明, 姚翠萍等. 金纳米微粒的光学性质及其在生物成像和光热疗法中的应用[J]. *中国激光*, 2007, **34**(11): 1459~1465
- 6 V. Ntziachristos, C. H. Tung, C. Bremer *et al.*. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo [J]. *Nature Medicine*, 2002, **8**(7): 757~760
- 7 H. Jiang. Frequency-domain fluorescent diffusion tomography: a finite-element-based algorithm and simulation[J]. *Appl. Opt.*, 1998, **37**(22): 5337~5343
- 8 A. B. Milstein, S. Oh, K. J. Webb *et al.*. Fluorescence optical diffusion tomography [J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(16): 3081~3094
- 9 A. X. Cong, G. Wang. A finite-element-based reconstruction method for 3D fluorescence tomography[J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(24): 9847~9857
- 10 E. M. Sevick-Muraca, J. P. Houston, M. Gurfinkel. Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agent[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, **6**(5): 642~650
- 11 M. A. O'Leary, D. A. Boas, X. D. Li *et al.*. Fluorescence lifetime imaging in turbid media[J]. *Opt. Lett.*, 1996, **21**(2): 158~160
- 12 A. T. N. Kumar, J. Skoch, B. J. Baeska *et al.*. Fluorescence-lifetime-based tomography for turbid media [J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(24): 3347~3349
- 13 V. Y. Soloviev, K. B. Tahir, J. McGinty *et al.*. Fluorescence lifetime tomography by using time-gated data acquisition [J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(30): 7384~7391
- 14 V. Y. Soloviev, J. McGinty, K. B. Tahir *et al.*. Fluorescence lifetime tomography of live cells expressing enhanced green fluorescent protein embedded in a scattering medium exhibiting background autofluorescence [J]. *Opt. Lett.*, 2007, **32**(14): 2034~2036
- 15 S. Lam, F. Lesage, X. Intes. Time domain fluorescent diffuse optical tomography: analytical expressions [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(7): 2263~2275
- 16 Zhang Limin, He Huiyuan, Gao Feng *et al.*. Image reconstruction in fluorescence molecular tomography based on full time-resolved scheme [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(7): 1262~1268
- 张丽敏, 和慧园, 高峰等. 荧光分子层析中的全时间分辨图像重建法[J]. *光学学报*, 2008, **28**(7): 1262~1268
- 17 F. Gao, H. J. Zhao, Y. Tanikawa *et al.*. A linear, featured-data scheme for image reconstruction in time-domain fluorescence molecular tomography [J]. *Opt. Express*, 2006, **32**(14): 7109~7124
- 18 Zou Wei, Wang Jiajun, Feng Dagan. Parallel computation of forward problem for fluorescence molecular tomography [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(3): 443~450
- 邹 玮, 王加俊, 冯大淦. 荧光分子断层成像正向问题的并行计算 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(3): 443~450
- 19 A. Soubret, J. Ripoll, V. Ntziachristos. Accuracy of fluorescent tomography in the presence of heterogeneities; study of the normalized Born ratio [J]. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 2005, **24**(10): 1377~1386
- 20 Limin Zhang, Feng Gao, Huiyuan He *et al.*. Three-dimensional scheme for time-domain fluorescence molecular tomography based on Laplace transforms with noise-robust factors [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(10): 7214~7213
- 21 Feng Gao, Limin Zhang, Jiao Li *et al.*. Experimental validation for time-domain fluorescence diffuse optical tomography of linear scheme [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12): 889~892