

基于脉冲激光二极管的小型化光学分辨式 光声显微成像系统

曾吕明¹ 刘国栋¹ 杨迪武² 纪轩荣³ 黄振¹ 董健¹

¹ 江西科技师范大学光电子与通信重点实验室, 江西 南昌 330038
² 湖南工业大学理学院, 湖南 株洲 412000
³ 广州多浦乐电子科技有限公司, 广东 广州 510663

摘要 采用具有价格低、体积小、寿命长、重复率高等优点的脉冲激光二极管, 搭建了一套光学分辨模式的小型化光声显微成像系统, 并获得了碳纤维原丝和微血管网络样品的光声显微成像。实验中, 脉冲激光二极管光源由三维平移台驱动做 C 型扫描逐点激发, 产生的光声信号由 1-3 复合材料超宽带超声传感器接收。实验表明, 接收的光声数据信噪比可达约 11 dB, 该系统的横向分辨率在上一代系统样机 500 μm 的基础上提高到 1.5 μm , 有望发展成为一种低成本、实时、便携式的高分辨率光声显微成像技术。

关键词 生物光学; 光声显微成像; 激光二极管; 光学分辨

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.1004001

Compact Optical-Resolution Photoacoustic Microscopy System Based on a Pulsed Laser Diode

Zeng Lüming¹ Liu Guodong¹ Yang Diwu² Ji Xuanrong³ Huang Zhen¹ Dong Jian¹

¹ Key Lab of Optic-Electronic and Communication, Jiangxi Sciences and Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330038, China
² Department of Physics & Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou, Hunan 412000, China
³ Doppler Electronic Technologies Company Limited, Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract A compact optical-resolution photoacoustic microscopy system is designed with a pulsed laser diode, which has the properties of being low cost, small size, robust and high repetition frequency. Typical photoacoustic images of carbon fiber and blood vessel phantoms are reconstructed clearly. During the experiments, the pulsed laser diode excitation is droved to implement C-mode scanning excitation with three-dimensional translation stage, and the excited photoacoustic signal is captured by a 1-3 composite ultra-bandwidth ultrasonic transducer. The photoacoustic signal-to-noise ratio is recorded of approximate 11 dB, and the lateral resolution of the current system is improved up to 1.5 μm from 500 μm of the first-generation system. The experimental results demonstrate that the proposal method has the potential to be developed as a configuration of inexpensive, real-time, portable, and high-resolution photoacoustic microscopy technique.

Key words biotechnology; photoacoustic microscopy; laser diode; optical-resolution

OCIS codes 170.0110; 170.3880; 170.5120; 110.5120

1 引言

光声成像(PAI)是一种集光学成像和超声成像优势于一体的新型无损生物医学影像技术,可实现

厘米级探测深度和微米级成像精度的结构与功能成像,近年来在国内外获得了突飞猛进的发展^[1-8]。尤其是光声显微成像(PAM),以其细胞至亚细胞水

收稿日期: 2014-04-08; **收到修改稿日期**: 2014-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(11304129, 11374094)、江西省科技支撑计划(20132BBG70033, 2009BSA12700)、江西省教育厅科技计划(GJJ13581)、江西科技师范大学青年拔尖人才计划(2013QNBjRC003)

作者简介: 曾吕明(1981—),男,硕士,讲师,主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: zenglvming@163.com

平的高分辨率优势,正成为近 5 年来光声成像研究领域的热点分支,并已初步应用于眼科、皮肤科、肿瘤科、神经科等领域的无损诊断与成像^[9-20]。

根据光声激发和传感方式,光声显微成像技术可划分为声学分辨模式(AR-PAM)和光学分辨模式(OR-PAM)两大类。AR-PAM 模式的原理源于高频超声显微成像技术,通常采用超高频(通常大于等于 30 MHz)聚焦超声传感器扫描接收光声信号,其空间分辨率主要由超声传感器的主频决定(超声焦斑小于激光光斑),即 $R = 0.71\lambda_1/NA_1$ (λ_1 和 NA_1 分别为超声传感器的中心波长和数值孔径),目前只能达到几十至几百微米的水平。例如,2010 年骆清铭课题组开发了主频为 46 MHz 的 AR-PAM 系统应用于脑结构成像,其系统横向分辨率约为 $45\ \mu\text{m}$ ^[13]。OR-PAM 模式采用聚焦激光束扫描激发光声信号(激光光斑小于超声焦斑),并以较低频率(通常小于等于 50 MHz)的超声传感器接收光声信号,其系统横向分辨率只决定于聚焦光斑的直径,即 $R = 0.51\lambda_2/NA_2$ (λ_2 和 NA_2 分别为激光波长和聚焦透镜的数值孔径),可实现几百纳米到十几微米的空间分辨率,将在生物医学领域应用潜力巨大。国际上,Lihong 等于 2008 年率先开发了横向分辨率达 $5\ \mu\text{m}$ 的 OR-PAM 系统^[14],并先后于 2010~2012 年间在空间分辨率(220 nm)、探测灵敏度(18.4 dB)、探测深度(2 mm)、内窥微径(3.8 mm)和 B 型扫描速率(40 Hz)等方面取得了长足进步^[15-19]。在国内,2012~2014 年间 Yuan 等^[9-11,20]亦相继开发了类似的 OR-PAM 系统。但为了获得高可探测性的光声效应,以上研究中的光声激励源通常采用大型高功率的纳秒脉冲固体激光器,如调 Q 开关 Nd:YAG 激光器。虽然作为一种常用的实验室激光源被广泛使用,但该类型固体激光

器具有价格高、体积大、重复率低、需冷却等缺点,难以满足现实中的临床需求而推广应用。

作为一种极具潜力的新型光声激励源,半导体激光器具有价格低、体积小、寿命长、重复频率高、无需冷却等众多优点,并已探索性地应用于光声成像领域^[21-25]。不幸的是,目前激光二极管仅被应用到声学分辨模式的光声成像领域。一方面,由于激光二极管的输出功率较低,致使可探测的光声信号通常需要平均上万次以提高信噪比(SNR);另一方面,激光二极管的长脉冲时间性(几十至上百纳秒)导致激发的光声信号频率一般低于 10 MHz,致使其系统空间分辨率被局限在几百微米的水平^[26-30]。例如,本课题组于 2012 年搭建了一套基于脉冲激光二极管的声学分辨模式光声成像系统(AR-PAI),其横向分辨率仅为 $500\ \mu\text{m}$ ^[29-30]。现将激光二极管光束改进为光学分辨模式显微激发,通过光学透镜组把激光二极管光斑直径聚焦到微米级(远小于超声焦斑),并结合 1-3 复合材料超带宽的超声传感器接收光声信号,实现了系统横向分辨率高达 $1.5\ \mu\text{m}$ 的 OR-PAM 模式成像,有效解决了采用传统固态光声激励源的系统体积庞大和成本居高问题,将有助于推进 OR-PAM 技术产品的集成化、一体化和通用化而走出实验室。

2 实验装置

实验装置示意图如图 1 所示。光声激励源采用波长为 905 nm 的脉冲激光二极管(905D4S16C),其频带半峰全宽(FWHM)为 5 nm,脉冲宽度 100 ns,单脉冲能量输出 $14\ \mu\text{J}$,重复频率 0.8 kHz。图 2(a)和(b)分别为激光二极管的光谱分布曲线和驱动电脉冲形状。脉冲激光二极管光源热机 20 min 后,输

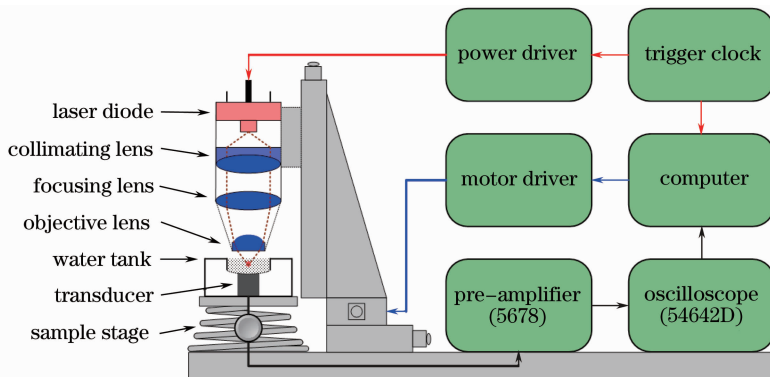


图 1 光学分辨式光声显微成像系统结构示意图

Fig. 1 Schematic of optical-resolution photoacoustic microscopy system

出的脉冲激光束首先经光学准直和聚焦(孔径 10 mm, 发散角 3.0 mrad, 焦长 15 cm), 然后由非球面透镜(数值孔径 0.62, 孔径 5.0 mm, 有效焦长 4.0 mm)进行显微聚焦到样品上激发光声信号。1-3复合材料超宽带超声传感器(I5P10N)置于前向位置接收光声信号, 其中心频率为 4.53 MHz, -6 dB 带宽 152.8%, 相对脉冲回波灵敏度 -33.7 dB。图 2(c)和(d)分别为超声传感器的脉冲

响应回波及其频谱曲线。超声传感器接收的光声信号经前置放大器(5678)放大 40 dB 后, 通过混合信号示波器(54642D)多次平均采集到个人计算机中, 最后采用最大值投影成像(MAP)重建出样品的光学吸收分布。整套系统样机的自动控制和数据处理分别采用 Labview 和 Matlab 软件平台开发完成。实验中, 测试样品和超声传感器均置于水槽中, 并假设样品与耦合液媒介中声速均匀为 $1.5 \mu\text{m}/\text{ns}$ 。

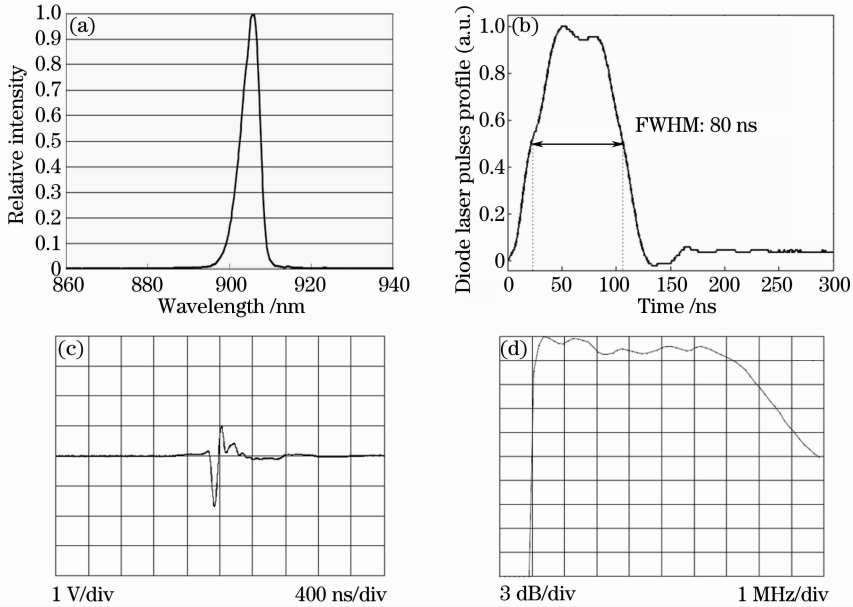


图 2 激光二极管的(a)光谱分布曲线和(b)电脉冲形状; 超声传感器的(c)脉冲响应回波及(d)其频谱曲线

Fig. 2 (a) Spectral plot distribution and (b) pulsed profile of laser diode; (c) pulsed echo signal and (d) its frequency spectrum of ultrasonic transducer

3 实验结果

图 3(a)~(c)为一根头发丝于相同位置被激发的光声信号, 其中信号平均次数分别为 8、32 和 128 次。由此看出, 通过激光二极管光束的显微聚焦来提高敏感区域的光能流密度, 可有效弥补激光二极管能量不足的优点, 获得可接受的探测信噪比和系统时间分辨率。从图中可得, 有效光声信号的峰峰值可达 18 mV, 信号图左端起始位置为触发信号导致的测量盲区为 1.5 mm。图 3(d)为头发丝有效光声信号的频谱曲线, 其频谱半峰全宽为 6.3 MHz。由实验结果可得, 系统激发的有效光声信号频率低于 10 MHz, 与激光二极管脉冲半峰全宽 80 ns 的导数基本相吻合, 并且其组织超声衰减系数 $[0.81 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz})]$ 将远小于目前 30 ~ 75 MHz 主频的光声显微成像系统。

为了测试该光声显微成像系统的横向分辨率,

选用两根相交的 T300-1K 碳纤维原丝(直径 $|D| \approx 4 \mu\text{m}$)进行实验, 其直径约为人体最小的毛细血管管径。图 4(a)是对该样品进行光声显微的最大值投影成像, 其扫描成像区域为 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 。图 4(b)为沿着 $y=10 \mu\text{m}$ 处截取的一维灰度值归一化分布曲线。由实验结果可看出, 系统探测的有效光声信号幅值最大可达 11 mV, 碳纤维原丝重建的形状和相对位置清晰完整, 其系统可分辨的最小距离为 $1.5 \mu\text{m} (|AB| - |D|)$ 。

为了进一步验证系统的成像性能, 设计了如下模拟微血管成像实验。样品为盖玻片上压印有蓝墨水的模拟微血管网络, 其扫描成像区域分别为 $2.1 \text{ mm} \times 3.5 \text{ mm}$ 和 $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$ 。实验中, 步进电机驱动激光二极管光源在 $x-y$ 平面的扫描步距分别为 0.2 mm 和 0.5 mm。图 5(a)和(b)分别为两个模拟微血管网络样品的最大值投影成像。由

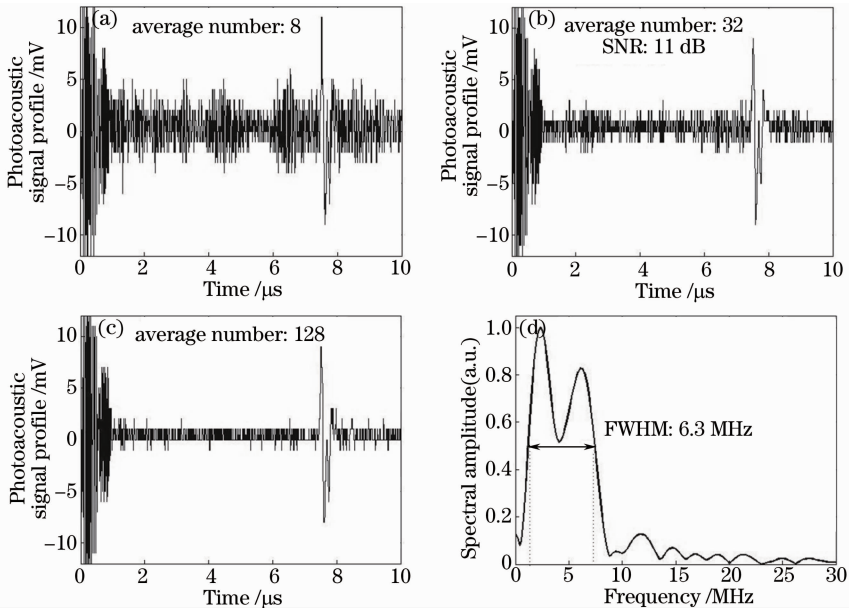


图 3 A 型扫描信号分析。(a)~(c) 光声信号分别平均 8、32、128 次的结果；(d) 有效光声信号频谱
 Fig. 3 A-scan signal analysis. (a)~(c) Photoacoustic signal with averaging 8, 32 and 128 pulses, respectively; (d) frequency spectrum of effective photoacoustic signal

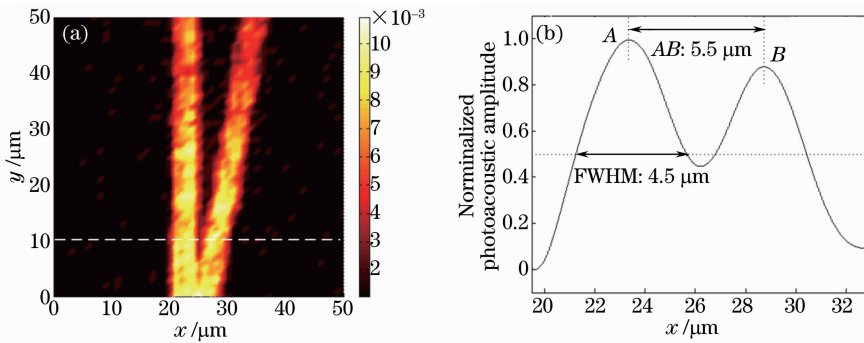


图 4 系统分辨率测试。(a) 碳纤维原丝光声成像；(b) 图(a)中 $y=10\ \mu\text{m}$ 处的像素灰度值空间分布曲线
 Fig. 4 System resolution test. (a) Photoacoustic imaging of carbon fiber; (b) pixel gray value spatial distribution curve at $y=10\ \mu\text{m}$ of fig. (a)

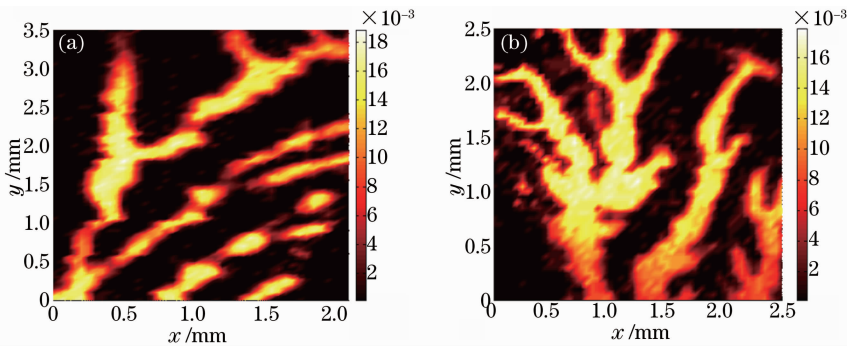


图 5 (a)和(b)模拟微血管网络光声成像
 Fig. 5 (a) and (b) photoacoustic imaging of small blood vessel phantom

实验结果可看出,探测的有效光声信号幅值最大可达 18 mV,模拟微血管网络的整体和分叉结构都得到了完整再现。

4 结 论

在本系统中,该型二极管激光经过光学透镜组准直和聚焦后的能量约为 $4.9\ \mu\text{J}$,可计算得其在焦

点处的峰值功率密度约为 $2.7 \times 10^9 \text{ W/cm}^2$, 低于通常双光子显微成像系统的 $10^{10} \sim 10^{12} \text{ W/cm}^2$ 。假设成像深度为组织皮下 $100 \mu\text{m}$ 时, 可计算出组织表面的激光能量密度约为 22.3 mJ/cm^2 , 仍处在美国 ANSI Z136.4-2010 激光安全标准 33.6 mJ/cm^2 范围内[计算公式为 $20 \times 10^{0.002(\lambda-700)} \text{ mJ/cm}^2$, 其中激光波长 $\lambda \in (400 \sim 1050 \text{ nm})$]。通过模拟样品实验结果可看出, 该基于脉冲激光二极管的光学分辨模式光声显微成像系统可有效地反应出吸收体的二维光学吸收分布, 具备了较好的系统横向分辨率和信噪比, 相比于采用固体激光器的常见光声系统, 具有体积小、价格低、结构紧凑等众多优点。由于采用的激光二极管波长处在人体组织透射窗口 ($700 \sim 1100 \text{ nm}$), 相对于可见光波段 OR-PAM 系统将具有更大的探测深度, 有望在生物组织内源性物质(例如黑色素)成像和探测上得到应用。不过其对血红蛋白(Hb)和含氧血红蛋白(HbO_2)的光学吸收率只有约可见光的 $1/40$, 并不完全适合于诸如血管类吸收体的光声探测。目前项目研究还处于起步阶段, 存在许多问题有待改进, 例如: 发展更便捷的背向光声激发与传感模式、采用针对 Hb/HbO₂ 吸收强的可见光波段激光二极管等。后续实验工作的跟进开展, 将会进一步完善和推进该技术的发展成熟。

参 考 文 献

- Lihong V Wang, Song Hu. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs [J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458–1462.
- Lihong V Wang. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography[J]. *Nature Photon*, 2009, 3(9): 503–509.
- Diwu Yang, Lüming Zeng, Changning Pan, *et al.*. Noninvasive photoacoustic detecting intraocular foreign bodies with an annular transducer array[J]. *Opt Express*, 2013, 21(1): 984–991.
- Xie Wenming, Zeng Zhiping, Li Li, *et al.*. Signal compensation in long-focal-zone photoacoustic imaging systems[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(1): 0104001.
谢文明, 曾志平, 李莉, 等. 长焦区光声成像系统中的信号补偿[J]. *中国激光*, 2012, 39(1): 0104001.
- Diwu Yang, Lüming Zeng, Xuanrong Ji, *et al.*. Fast photoacoustic imaging of blood vessels based on an annular transducer array[J]. *Chin Phys Lett*, 2012, 29(10): 104302.
- Zhang Jian, Yang Sihua. Photoacoustic component imaging based on multi-spectral excitation[J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(1): 0104001.
张 建, 杨思华. 基于多波长激发的光声组分成像[J]. *中国激光*, 2011, 38(1): 0104001.
- Zeng Lüming, Liu Guodong, Ren Zhong, *et al.*. Design of high-resolution photoacoustic imaging system based on LabVIEW station[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, 37(7): 1436–1440.
曾吕明, 刘国栋, 任 重, 等. 基于 LabVIEW 平台的高准确度光声成像系统设计[J]. *光子学报*, 2008, 37(7): 1436–1440.
- Lüming Zeng, Da Xing, Huaimin Gu, *et al.*. High antinoise

- photoacoustic tomography based on a modified filtered backprojection algorithm with combination wavelet [J]. *Med Phys*, 2007, 34(2): 556–563.
- Yi Yuan, Sihua Yang, Da Xing. Optical-resolution photoacoustic microscopy based on two-dimensional scanning galvanometer [J]. *Appl Phys Lett*, 2012, 100(2): 023702.
- Zhenyuan Yang, Jianhua Chen, Junjie Yao, *et al.*. Multi-parametric quantitative microvascular imaging with optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Opt Express*, 2014, 22(2): 1500–1511.
- Cai Qiuxia, Tang Zhilie, Wu Yongbo, *et al.*. Microcavity photoacoustic detecting technology and imaging method[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(9): 0918001.
蔡秋霞, 唐志列, 吴泳波, 等. 微腔光声探测技术及其成像方法[J]. *光学学报*, 2013, 33(9): 0918001.
- Liu Yanyan, Yang Xiaoquan, Luo Qingming. Method of sliding focus photoacoustic microscopic[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(5): 0517002.
刘炎炎, 杨孝全, 骆清铭. 滑动焦点光声显微成像方法[J]. *光学学报*, 2012, 32(5): 0517002.
- Xiaoquan Yang, Xin Cai, Konstantin Maslov, *et al.*. High-resolution photoacoustic microscope for rat brain imaging *in vivo* [J]. *Chin Opt Lett*, 2010, 8(6): 609–611.
- K Maslov, Hao F Zhang, S Hu, *et al.*. Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of single capillaries [J]. *Opt Lett*, 2008, 33(9): 929–931.
- C Zhang, K Maslov, Lihong V Wang. Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption *in vivo* [J]. *Opt Lett*, 2010, 35(19): 3195–3197.
- S Hu, K Maslov, Lihong V Wang. Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed[J]. *Opt Lett*, 2011, 36(7): 1134–1136.
- J Yao, K Maslov, E R Puckett, *et al.*. Double-illumination photoacoustic microscopy [J]. *Opt Lett*, 2012, 37(4): 659–661.
- J Yang, C Favazza, R Chen, *et al.*. Simultaneous functional photoacoustic and ultrasonic endoscopy of internal organs *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2012, 18(8): 1297–1303.
- L Wang, K Maslov, J Yao, *et al.*. Fast voice-coil scanning optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Opt Lett*, 2011, 36(2): 139–141.
- Shuqi Ye, Ran Yang, Jingwei Xiong, *et al.*. Label-free imaging of zebrafish larvae *in vivo* by photoacoustic microscopy [J]. *Biomed Opt Express*, 2012, 3(2): 360–365.
- K Maslov, L V Wang. Photoacoustic imaging of biological tissue with intensity-modulated continuous-wave laser [J]. *J Biomed Opt*, 2008, 13(2): 024006.
- M P Mienkina, C S Friedrich, N C Gerhardt, *et al.*. Multispectral photoacoustic coded excitation imaging using unipolar orthogonal Golay codes [J]. *Opt Express*, 2010, 18(9): 9076–9087.
- Zhang Leihong, Ma Xiuhua. Study on influential factor of photoacoustic signal excited by intensity-modulated continuous-wave laser in biological tissue [J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(11): 1104002.
张雷洪, 马秀华. 生物组织中强度调制的连续激光激发的光声信号影响因素研究[J]. *中国激光*, 2011, 38(11): 1104002.
- S Y Su, P C Li. Coded excitation for photoacoustic imaging using a high-speed diode laser [J]. *Opt Express*, 2011, 19(2): 1174–1182.
- P LeBoulluec, H L Liu, B H Yuan. A cost-efficient frequency-domain photoacoustic imaging system [J]. *Am J Phys*, 2013, 81(9): 712–717.
- R Kolkman, W Steenbergen, T Leeuwen. *In vivo* photoacoustic imaging of blood vessels with a pulsed laser diode [J]. *Lasers Med*

- Sci, 2006, 21(3): 134–139.
- 27 T J Allen, P C Beard. Pulsed near-infrared laser diode excitation system for biomedical photoacoustic imaging[J]. Opt Lett, 2006, 31(23): 3462–3464.
- 28 K Daoudi, P J van den Berg, O Rabot, *et al.*. Handheld probe for portable high frame photoacoustic/ultrasound imaging system [C]. SPIE, 2013, 8581: 858121.
- 29 Lüming Zeng, Guodong Liu, Diwu Yang, *et al.*. 3D-visual laser-diode-based photoacoustic imaging[J]. Opt Express, 2012, 20(2): 1237–1246.
- 30 Zeng Lüming, Liu Guodong, Yang Diwu, *et al.*. Photoacoustic imaging system based on a pulsed laser diode excitation [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(s1): s104002.
- 曾吕明, 刘国栋, 杨迪武, 等. 基于脉冲激光二极管辐射源的光声成像系统[J]. 中国激光, 2013, 40(s1): s104002.

栏目编辑: 韩 峰