

全场高分辨生物组织光学层析成像

朱 越 高万荣

(南京理工大学光电学院光学工程系, 江苏 南京 210094)

摘要 建立了一套全场光学相干层析(FFOCT)系统,以实现对生物组织和细胞的高分辨层析成像。该光学系统基于 Linnik 干涉显微结构。不同于现有 FFOCT 系统采用光纤束照明方式,采用卤钨灯照明和大数值孔径显微物镜成像,压电陶瓷(PZT)移相,面阵电荷耦合器件(CCD)采集干涉信号,由 5 步移相算法获取层析图,最终合成三维图像。对整套系统的性能进行了详细的阐述与分析,并通过对洋葱表皮细胞和盆栽树叶的光学层析实验,验证了本系统的可行性和精确度。通过对集成电路内部芯片(英特尔奔腾 4, 横向分辨率达 $0.8 \mu\text{m}$)成像,证明了该系统的分辨率可达到 $0.7 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ (横向 \times 纵向)。提出的系统分辨率高、成本低、结构简单便于调节,为实现高分辨率光学相干层析成像提供了简单易行的方法。

关键词 成像系统; 全场光学相干层析术; 移相干涉术; 生物组织

中图分类号 TN247 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.0804002

High-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography for Biological Tissue

Zhu Yue Gao Wanrong

(Department of Optical Engineering, School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China)

Abstract A novel full-field optical coherence tomography (FFOCT) system with low cost and high resolution is developed for imaging of cells and tissues. Different from other FFOCT systems illuminated with optical fiber bundle, the improved Köhler illumination arrangement with a halogen lamp is used in the proposed FFOCT system. High numerical aperture microscopic objectives are used for imaging and a piezoelectric ceramic transducer (PZT) is used for phase-shifting. En-face tomographic images can be obtained by applying the five-step phase-shifting algorithm to a series of interferometric images which are recorded by a smart charge coupled device (CCD) camera. Three-dimensional images can be generated from these tomographic images. Imaging of the chip of Intel Pentium 4 processor demonstrates the ultrahigh resolution of the system (lateral resolution $0.8 \mu\text{m}$), approaching the theoretical resolution $0.7 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ (lateral \times axial). En-face images of cells of onion surface and potted plant leaves cells show the excellent performance of the system for generating en-face images of biological tissues. The system is characterized by its high resolution, low cost and simple arrangement for adjustment, providing a practical method of performing FFOCT imaging.

Key words imaging systems; full-field optical coherence tomography; phase-shifting interferometry; biological tissue

OCIS codes 110.4500; 170.6900; 180.3170; 170.3880

1 引 言

光学相干层析成像(OCT)是近二十年发展起来的一种新型成像技术^[1-2],它利用生物组织的后向散射光与参考光发生弱相干干涉以获得生物组织

的深度信息,结合扫描成像方式,可实现对生物组织三维结构微米量级的层析成像。与传统层析成像技术相比,OCT 具有低侵入、高灵敏度、实时成像、成本低、微米量级的分辨率和 1~3 mm 穿透深度等众

收稿日期: 2014-01-15; **收到修改稿日期**: 2014-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(61275198,60978069)、国防基础科研资助项目

作者简介: 朱 越(1991—),女,博士研究生,主要从事生物医学成像方面的研究。E-mail: daoxiaomi1991@163.com

导师简介: 高万荣(1961—),男,博士生导师,主要从事生物医学光学方面的研究。

E-mail: wgao@njust.edu.cn(通信联系人)

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

多特点^[3-5]。因此, OCT 在陶瓷内部裂痕检测、眼科及肿瘤临床诊断方面具有重要应用价值^[6-7]。

1998 年, Beaurepaire 等^[8-9]提出了全场光学相干层析(FFOCT)系统。这是一种基于面阵电荷耦合器件(CCD)探测器的并行成像技术,不需要横向扫描就可以一次性得到样品的横断面信息,不必采用复杂的二维扫描振镜组,这也是“全场”的优势所在。该系统可看作是全场照明显微镜与弱相干干涉仪的结合。使用卤钨灯作为光源,其超宽光谱可使系统获得超高的纵向分辨率,同时极大减少了系统的成本,而大数值孔径显微物镜的使用也保证了系统的超高横向分辨率。非相干光源很好地避免了信号的串扰,使用该成像方式,系统的横、纵向分辨率甚至都可以达到亚微米量级,在国际上大量运用于活体生物组织和细胞的成像^[10],如清华大学物理系薛平组对小鼠胚胎的三维动态成像^[11],法国 Boccara 与 Dubois 小组对蝌蚪眼睛等生物组织的实验^[2,5,12]。此类对生物组织亚细胞结构的探究,可对人体医学临床诊断提供相应帮助^[13]。

FFOCT 系统可以采用多模光纤实现照明^[14],但光纤的尺寸限制了其照明的样品区域。也可以购

买使用柯勒照明器,但增加了系统的成本。另外 FFOCT 系统的照明也可以采用超发光二极管光源^[15],但相对于普通的卤钨灯光源,其光谱带宽窄,且昂贵得多。本文搭建的 FFOCT 系统基于 Linnik 结构干涉显微系统,采用普通显微物镜,并用自由空间卤钨灯照明,利用视场光阑可以调节或选择要成像的样品的范围,利用孔径光阑可以控制入射到样品上的光照度的大小。利用实验系统,可获得高分辨率的样品横断面信息(180 nm 工艺的芯片、洋葱表皮细胞和盆栽树叶细胞)。由移相算法可得到对应 XY 方向的 FFOCT 图像^[16]。

2 实验装置与原理

图 1 是搭建的光学系统,包含科勒照明和 Linnik 干涉显微系统。卤钨灯光源发出的光束经 L_1 会聚后,灯丝第一次成像于孔径光阑 AS 处, L_2 将该处成像于显微物镜的后焦面,形成二次灯丝像。这样被检物体获得的是均匀照明光,即使经过长时间照射,生物组织亦不会被灼伤。实验中,改变视场光阑 FS 的大小可以控制照明范围,光斑大小的调整变得简单易行。

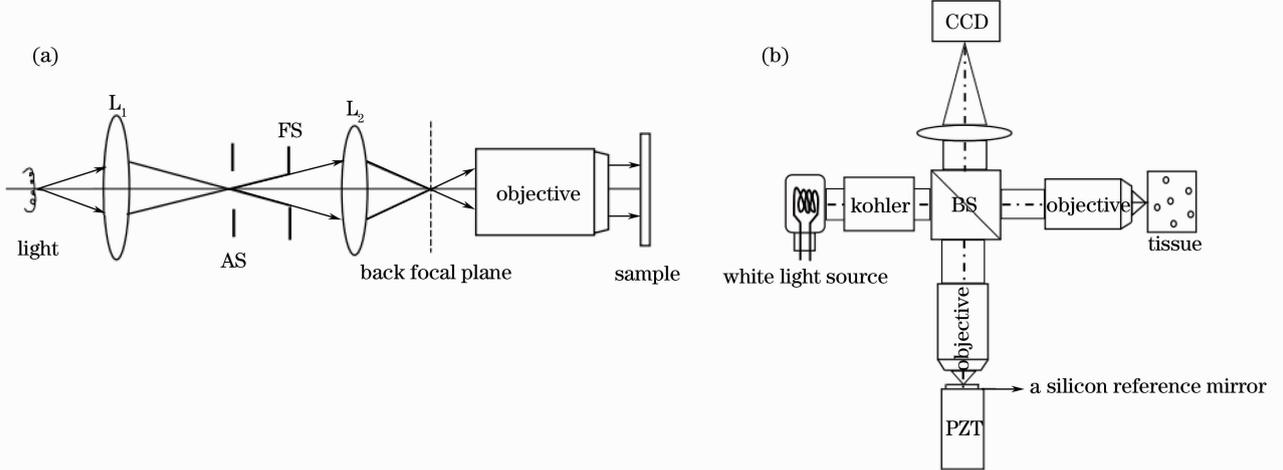


图 1 (a) 科勒照明原理图; (b) FFOCT 系统整体结构图

Fig. 1 (a) Schematic of Köhler illumination; (b) schematic of full-field optical coherence tomography (FFOCT) system

采用卤钨灯光源(12 V/20 W),光谱范围约为 200 nm,中心波长为 550 nm,理论纵向分辨率为 $0.5 \mu\text{m}$ 。一对完全相同的显微物镜(Olympus RMS20X-PF, 20 倍, $\text{NA}=0.5$)放置于干涉系统的两臂,理论横向分辨率为 $0.7 \mu\text{m}$ 。依次使用反射镜、载玻片和 YAG 晶体作为参考镜,使其附着在压电陶瓷(PZT)前端,使用 PZT 调制光程进行五步移相,获得干涉信号^[17-18],用面阵 CCD(Matrox Iris GT300, $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$, 像元大小为 $7.4 \mu\text{m} \times$

$7.4 \mu\text{m}$, 帧率为 110 fps)采集干涉信号。

均匀光照射样品时,样品不同层面都存在反射或后向散射光信号,因此样品光实际上包含着由多层组织反射或后向散射的光信号。但白光光源的相干长度极短,只有当样品臂和参考臂之间的光程差接近完全相等时才能发生干涉并具有最大的相干强度。因此,参考镜在纵向移动过程中,可以对样品中光程匹配的对应该层进行成像,而其他层的信息将被滤掉。最后把 CCD 采集到的干涉图进行分析处理,

可到样品的横断面结构图。

当样品臂和参考臂之间的光程差小于光源的相干长度并满足干涉条件时,面阵 CCD 探测器上 (x, y) 点接收到的光强信号可表示为^[19]

$$I_d(x, y) = I_0(x, y) + A_i(x, y)\cos[\varphi(x, y)], \quad (1)$$

式中 $I_0(x, y)$ 为直流项,表示由非相干光形成的背景图像, $\cos[\varphi(x, y)]$ 表示干涉图像,它随样品和参考镜上对应点 (x, y) 的相位差 $\varphi(x, y)$ 而变化, $A_i(x, y)$ 表示第 i 层组织的层析图像,应用5步移相公式即可求出样品图像信息。CCD采集的5幅干涉图分别为^[20]

$$I_n(x, y) = I_0 + A_i(x, y)\cos[\varphi(x, y) - (n-3)\delta], \quad n = 1, 2, 3, \dots, \quad (2)$$

每步引入的移相量为 δ ,则层析图像可由下式给出:

$$A_i(x, y) = \left\{ \left[\frac{I_2(x, y) - I_4(x, y)}{2\sin\delta} \right]^2 + \left[\frac{2I_3(x, y) - I_5(x, y) - I_1(x, y)}{4\sin^2\delta} \right]^2 \right\}^{1/2}. \quad (3)$$

这里需要指出,样品与参考面若能发生干涉,其光程差必须在相干长度以内,即实验中相干长度以外的区域不会产生条纹。若是移相超出相干范围,干涉条纹就会在超出范围处消失,如图2所示,蓝色线条是参考镜正确移相过程,红色线条是超出相干长度的错误移相过程。

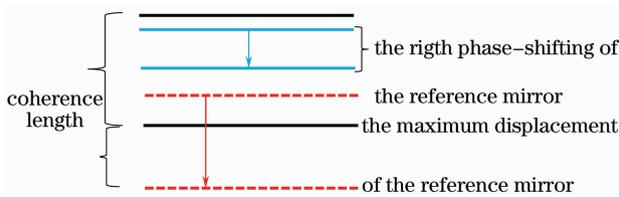


图2 相干长度与移相范围的关系

Fig. 2 Relationship between the coherence length and the phase shift range

在实验中,五步移相量对应的移动距离 $\Delta S = 0.6875 \mu\text{m}$,小于相干长度 $1.512 \mu\text{m}$,所以在实验中只要保证初始移相位置足够远离相干边缘区域即可。

3 系统性能分析

3.1 纵向分辨率

在高斯型照明光源情况下,系统纵向分辨率一般为相干长度的一半,这里使用超宽带宽的光源,纵向分辨率需要重新计算。

假设系统入射光波为 $u(x, y)$,其空间傅里叶变换为^[21]

$$U(\kappa_x, \kappa_y) = \int_{-\infty}^{+\infty} u(x, y)\exp[-j(\kappa_x x + \kappa_y y)]dx dy, \quad (4)$$

则距离物体前表面下 z 的反射光 $U_S(\kappa_x, \kappa_y)$ 可表示为

$$U_S(\kappa_x, \kappa_y) = B(-\kappa_x, -\kappa_y)\exp[-j(2\kappa_z z + \phi)], \quad (5)$$

式中 ϕ 是光波由物体反射回来的相位改变, $\kappa_x, \kappa_y, \kappa_z$ 分别为波矢量在 x, y, z 方向上的分量。这样,反射波的另一部分 $U_R(\kappa_x, \kappa_y)$,由位于参考焦平面 $z = z_0$ 处的参考镜所反射的光场可表示为^[22]

$$U_S(\kappa_x, \kappa_y) = A(-\kappa_x, -\kappa_y)\exp(-2j\kappa_z z_0), \quad (6)$$

式中 $A(\kappa_x, \kappa_y)$ 和 $B(\kappa_x, \kappa_y)$ 分别表示平面镜和参考镜的反射系数。为了简便表达式而统一成柱坐标系,于是有 $\kappa_z = \sqrt{\kappa^2 - \kappa_x^2 - \kappa_y^2} = \kappa\cos\theta, \kappa_r = \sqrt{\kappa_x^2 + \kappa_y^2} = \kappa\sin\theta, \theta$ 为光线与纵向的夹角,沿着传播常数 k_r, k_z 方向传播,其中 k_r 为柱坐标系中波矢在 xy 平面上的投影。系统通光孔径由数值孔径 NA 决定, $NA = \sin\theta_0$ 。

由CCD获取的信号表示为

$$i(z) = 2\pi \int |U_S + U_R|^2 \kappa_r d\kappa_r = 4\pi\kappa^2 |U|^2 \int_0^{\theta_0} \{A^2 + B^2 + 2AB\cos[2\kappa(z - z_0 + \phi)]\} \sin\theta \cos\theta d\theta, \quad (7)$$

主要关心相关函数和被积函数的乘积项。当照明光谱是伴随着强度 $F(k)$ 变化且具有有限的带宽,那么相关函数由下式给出:

$$I_{AB}^b(z) = 4\pi AB |U|^2 \int_{\text{bandwidth } 0}^{\theta_0} \int \kappa^2 \times \{\cos[2\kappa(z - z_0)\cos\theta + \phi] \sin\theta \cos\theta d\theta\} F(\kappa) d\kappa, \quad (8)$$

这里的上标 b 代表了带宽。当 $\phi = 0$ 或 $\phi = \pi$,上式被sinc函数调制,其包络在 $z = 0$ 处取最大值并随着 $|z - z_0|$ 单调减小。只要得到上式纵向响应函数曲线包络平方的半峰全宽(FWHM),即为系统的纵向分辨率。

假设系统光源为窄带光,那么 $\phi = 0$,光谱为 $F(\kappa) = \delta(\kappa_0), \delta(\kappa_0)$ 即为 δ 函数,那么有

$$I_{AB}(z) = 2AB |W|^2 \int_0^{\theta_0} \exp[-2jk_0(z-z_0)] \sin \theta \cos \theta d\theta, \quad (9)$$

(9)式等同于共焦显微镜振幅随距离 z 变化的函数。

对于一个窄带宽系统,进行近轴近似 $\cos \theta \approx 1$,且简化函数有 $\phi=0$,输出信号归一化振幅,在 $z=z_0$ 处有

$$I(z) = \frac{\sin [\kappa_0(z-z_0)(1-\cos \theta_0)]}{\kappa_0(z-z_0)(1-\cos \theta_0)} \times \exp[-j\kappa_0(z-z_0)(1+\cos \theta_0)]. \quad (10)$$

对于窄带激励, $I^2(z)$ 最大值的一半即为纵向分辨率:

$$d_z = \frac{0.45\lambda}{1-\cos \theta_0}, \quad (11)$$

式中 $\kappa_0 = 2\pi/\lambda$, λ 为光源波长。如果对 $z-z_0$ 进行空域傅里叶变换,结果是一个空间频率为 $\kappa_0(1+\cos \theta_0)$ 的载频被一个宽度 $\Delta\kappa = \kappa_0(1-\cos \theta)$ 方形脉冲调制。

假设系统为宽带光源,对于波数 κ_0 ,波数带宽 $\Delta\kappa$ 的均匀照明光源,包络函数 $g(z)$ 由下式给出:

$$g(z-z_0) = \frac{\sin [(\Delta\kappa/2)(z-z_0)(1+\cos \theta_0)]}{(\Delta\kappa/2)(z-z_0)(1+\cos \theta_0)}, \quad (12)$$

那么,宽带光源纵向分辨率由下式所示:

$$d_z = \frac{1.78\pi}{\Delta\kappa(1+\cos \theta_0)}. \quad (13)$$

当单色光以最大入射角 θ_0 入射,并且以镜面角度反

射回来,波数的改变为 $\delta\kappa_z = 2\kappa_0 \cos \theta_0$,轴上反射光束波数的变化为 $\delta\kappa_z = 2\kappa_0$,因此,最大范围的空间频率为 $\Delta\kappa_z = 2\kappa_0(1-\cos \theta_0)$ 。另外,由于系统带宽较大,必须把波数带宽 $\Delta\kappa$ 考虑在内,(12)式中有 $\Delta\kappa' = \frac{\Delta\kappa}{2}(1+\cos \theta_0)$ 。总的空间频率范围为

$$\Delta\kappa_z = 2\kappa_0(1-\cos \theta_0) + 2\Delta\kappa' = 2\kappa_0(1-\cos \theta_0) + \Delta\kappa(1+\cos \theta_0). \quad (14)$$

所以系统纵向分辨率应该结合(13)与(14)式计算。数值孔径和带宽的增大对系统的影响是一个特别值得讨论的问题。经过计算系统纵向分辨率约为 $0.5 \mu\text{m}$ 。

为了测试系统的纵向分辨率,在样品臂和参考臂放置同样的载玻片,得到等厚干涉条纹,在干涉条纹的垂直方向上进行拟合,如图3所示。

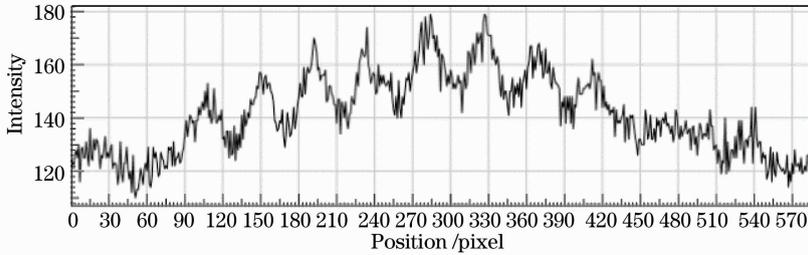


图3 干涉条纹强度

Fig. 3 Interference fringe intensity curve

对于折射率均匀的载玻片,两臂在空间上形成一个楔角,等厚干涉条纹平行于楔棱,由亮纹公式 $\Delta = 2nh + \frac{\lambda}{2} = m\lambda$ 容易导出,从一个条纹过渡到另一个条纹,厚度变化为 $\Delta h = \lambda/(2n)$ 。纵向分辨率的定义是纵向两点之间能分辨的最小距离,从图3可知在偏离等光程处的两侧,振荡迅速衰减,这说明表面起伏已经超出相干长度,即超出该系统能分辨的纵向距离。干涉条纹包络的 FWHM 即为该种方法的纵向分辨率,所以当 FWHM 为五条条纹时,系统的实际纵向分辨率可由下面公式得出^[23]:

$$\Delta Z = \frac{2.5\lambda}{n}, \quad (15)$$

式中 n 为空气折射率。由于介质是空气,对应折射率为 $n = 1$,中心波长为 550 nm ,得出纵向分辨率约为 $1.3 \mu\text{m}$ 。理论计算为 $0.5 \mu\text{m}$ 。

3.2 横向分辨率

横向分辨率通常定义为点扩展函数 (PSF) 的 FWHM。在衍射极限情况下,PSF 是 Airy 函数,其表达式为^[24]

$$h(u) = \frac{2J_1(u)}{u}, u = \frac{2\pi}{\lambda} \gamma NA, \quad (16)$$

式中 $\gamma = A/\bar{I}$ 为干涉条纹对比度, $h(u)$ 为点扩展函

数。由相位算法可知 PSF 是 $h(u)$ 的平方。根据瑞利判据, FFOCT 横向分辨率表达式为

$$\delta_x = \delta_y = \frac{\lambda}{2NA}. \quad (17)$$

可见, 相移干涉测量系统横向分辨率取决于显微镜的数值孔径, 同时还与 CCD 的像素大小有关。传统的 OCT 系统, 通过扫描样品表面的每个点来获取深度曲线图, NA 的大小必须保证视场深度至少与样品的深度一样, 但只有数值孔径较小时才满足此条件。FFOCT 继承了 OCT 的优点, 且采用了 Linnik 干涉结构, 可使用较大数值孔径物镜, 因此可获得高分辨率。

图 4 是横向分辨率测量图, 采用国家专业标准分辨率图案测量系统的横向分辨率。由于视场较小, 每次视场中只能出现一组分辨率图案, 图 4(a) 由几组图案拼接而成。图 4(b) 正中央黑色部分的第 25 组放大部分在图 4(a) 中央显示, 测得分辨率约为 $2.5 \mu\text{m}$ 。

由于实验室条件有限, 可使用的最高分辨率只有 A_5 号板, 最高测量分辨率为 $2.5 \mu\text{m}$, 这与理论值 $0.7 \mu\text{m}$ 有一定差距。为此进行了第二种测量横向分辨率的补充实验。

将 1951 USAF 标准分辨率板放置于样品台进行成像, 如图 5 所示。标准分辨率板中红色方框放大的部分为测量图。取蓝色线条处理光强拟合, 得到图 6。

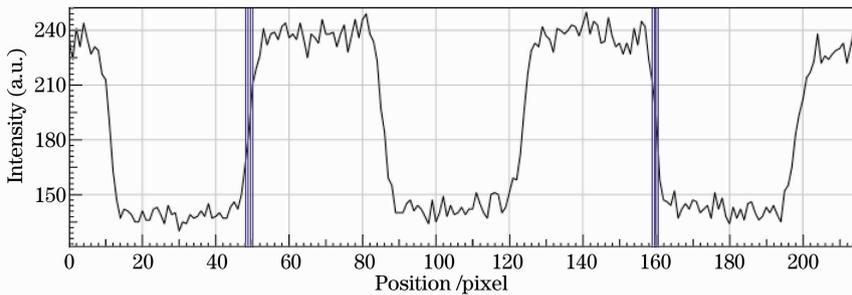


图 6 横向光强分布

Fig. 6 Transversal intensity distribution

3.3 视 场

视场测量值约为 $400 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$, 视场大小与光学系统放大倍数有关, 在探测器的像素个数和大小固定的情况下, 为了扩大视场而减小放大倍数可能会减小横向分辨率, 所以在调节放大倍数时要权衡横向分辨率和视场的关系, 使其满足成像要求即可。考虑到这点, 使用 XY 二维位移平台放置样品, 可以通过 XY 方向移动样品扩大视场, 最终采用相

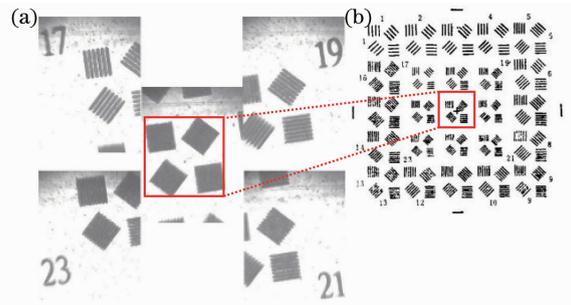


图 4 (a) A_5 号分辨率板图像; (b) 标准 ZBN35003-1989 分辨率图案

Fig. 4 (a) Image of A_5 resolution target; (b) ZBN

35004-1989 National professional standard resolution target

峰谷之间光强的 20%~80% 所占有的距离即为系统横向分辨率, 多次测量取平均值, 测得横向分辨率为 $1.65 \mu\text{m}$, 明显优于图 4 测得的分辨率。由于系统本身及人为引入误差, 依然略大于理论值, 属正常现象。后期的移相算法能有效地消除此类干涉测量系统中的系统误差, 从而得到高分辨的 FFOCT 图。

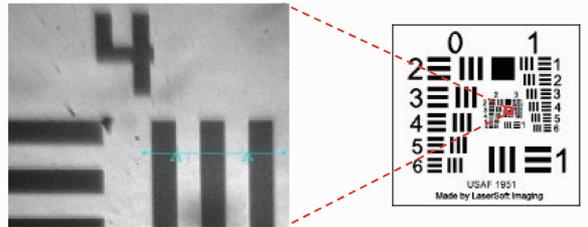


图 5 1951 USAF 标准分辨率板(第四组第一个)

Fig. 5 1951 USAF standard target (group 4, number 1)

应算法拼接合成大视场 FFOCT 图。

4 样品成像与分析

对英特尔奔腾 4 处理器内部芯片进行了成像。图 7(a) 是样品显微图, 图 7(b) 是样品干涉图, 图 7(c) 是恢复出的 FFOCT 图。图 7(c) 能看清芯片上部白色箭头指向的横向线条, 而图 7(a) 则是模糊一片。经过计算, 图 7(c) 中箭头指向的横线宽度约为

0.8 μm , 整个小芯片的大小约为 $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ 。图 7(c) 是 FFOCT 图像, 故比图 7(a) 要清晰。

同时, 在不同深度方向上对集成电路芯片进行第二次成像实验, 如图 8 所示。图 8(a) 是样品普通显微图, 图 8(b) 是干涉图, 图 8(c) 和 (d) 是同一样品表面不同深度得到的 FFOCT 图。通过对比可以发现图 8(c) 中能清晰可见的边框在 8(a) 中是看不见的。将图 8(c) 和 (d) 进行对照可以发现不同深度的信息不同, 虽然光线无法到达集成电路内部, 不能实现所谓的“层析”, 但表面的起伏可以通过恢复出的 FFOCT 图像表现出来。

全场实验使用最多的细胞就是洋葱表皮细胞^[25-26], 因而对洋葱表皮细胞进行了成像。洋葱表皮细胞一般为长条状, 其宽度一般为 $25 \mu\text{m}$ 到 $80 \mu\text{m}$ 不等, 长一般从 $100 \mu\text{m}$ 到 $300 \mu\text{m}$ 不等, 根据失水的不同大小也有变化。洋葱样品放置在垂直方向可调的微位移平台上。如图 9、10 是不同纵向深度得到的洋葱 FFOCT 图像, 数张重构即可构成三维图形。

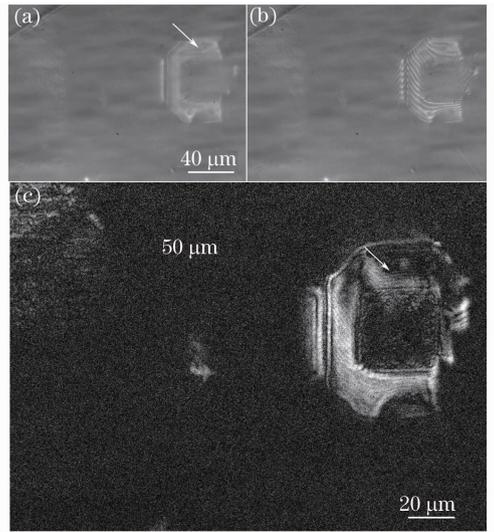


图 7 英特尔奔腾 4 处理器内部芯片。(a) 普通显微图; (b) 干涉图; (c) FFOCT 图(箭头指向的横向条纹宽度约 $0.8 \mu\text{m}$)

Fig. 7 Chip inside the Intel Pentium 4 processor. (a) Common microscopic image of sample; (b) interferogram; (c) FFOCT image (The width of the transverse stripe indicated by an arrow is about $0.8 \mu\text{m}$)

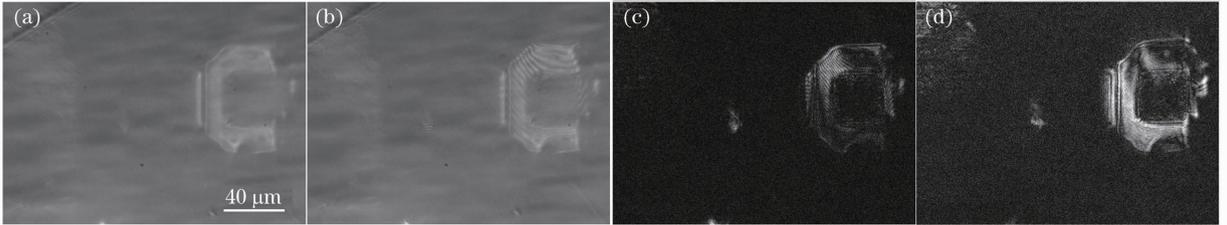


图 8 英特尔奔腾 4 处理器内部芯片。(a) 普通显微图像; (b) 干涉图; (c), (d) 样品表面不同深度的 FFOCT 图
Fig. 8 Chip inside the Intel Pentium 4 processor. (a) Common microscopic image of sample; (b) interferogram; (c) and (d) FFOCT images at different depths

做了两组洋葱细胞层析图。图 9 为第一组, 图 9(a) 为洋葱表皮细胞普通显微图, (b)、(c)、(d) 代表了洋葱细胞在三个不同深度方向的横断面。其中图

9(b) 中白色箭头指向的是恢复出的细胞核的轮廓, 而在图 9(a) 中无法分辨, 证明算法实现了分辨率的提高。

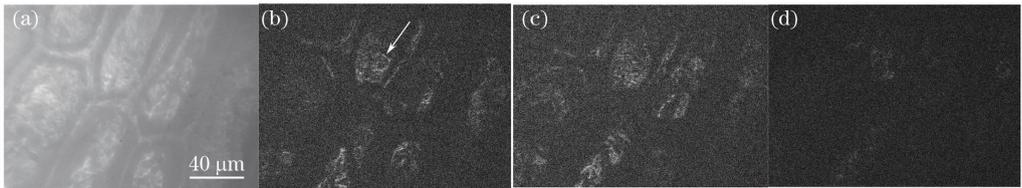


图 9 洋葱细胞图像。(a) 洋葱表皮细胞普通显微图像; (b)、(c)、(d) 洋葱表皮细胞不同纵向深度方向上的三幅横断面图像
Fig. 9 Images of onion cells. (a) Common microscopic image of onion cells; (b), (c), (d) XY en-face images of the onion cells at different depths

图 10 为第二组, 图 10(a) 是洋葱表皮细胞普通显微图像, 图 10(b)、(c) 是不同深度的洋葱表皮细胞 FFOCT 图像。其中图 10(b) 为细胞壁, 图 10(c) 为细胞质。将细胞壁与细胞质分别恢复出, 证明了

该系统对生物组织具有很好的层析能力。

上述结果证明了系统的可行性和精确度。为了提高系统的信噪比, 针对不同的样品采用不同的参考镜。芯片样品成像时使用普通反射镜, 生物组织

细胞成像时则采用 YAG 晶体等作参考反射镜,得到了效果更好的干涉条纹。其次,利用二维位移平

台及后期图片拼接算法扩大成像视场。



图 10 洋葱细胞图像。(a) 洋葱细胞普通显微图像;(b) 细胞壁 FFOCT 图像;(c) 细胞质 FFOCT 图像

Fig. 10 Images of onion cells. (a) Common microscopic image of onion cells; (b) FFOCT image of cytoderm; (c) FFOCT image of cytoplasm

最终,获得的图 11 为 4 幅纵向每隔 $20\ \mu\text{m}$ 的洋葱表皮细胞 FFOCT 图像,图 12 为盆栽树叶普通显

微图和 FFOCT 图。与之前的结果(图 9、10)相比,视场与清晰度都有提高。

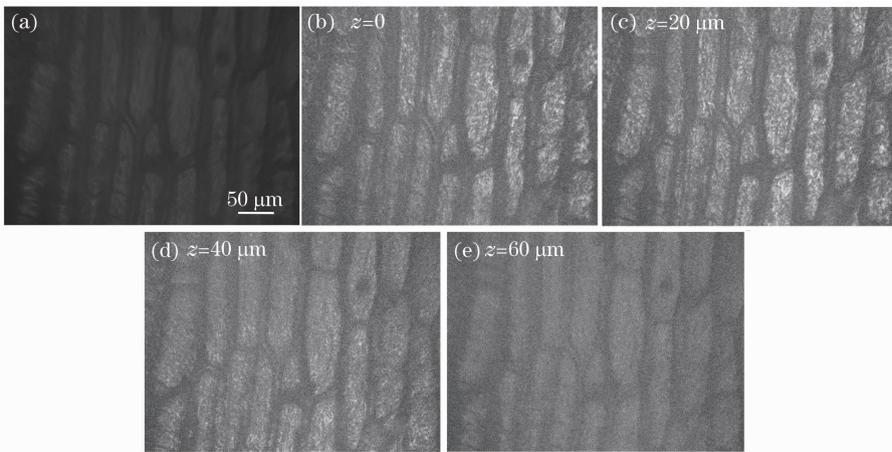


图 11 洋葱表皮细胞。(a) 洋葱表皮细胞普通显微图像;(b)、(c)、(d)、(e) 洋葱表皮细胞不同纵向深度的 4 幅 FFOCT 图像

Fig. 11 Images of cells of onion surface. (a) Common microscopic image of cells of onion surface; (b), (c), (d), (e) XY en-face images of the cells of onion surface acquired by FFOCT at different depths

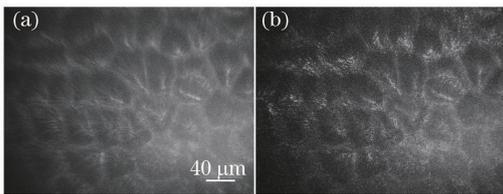


图 12 盆栽树叶叶片细胞。(a) 叶片细胞普通显微图像;(b) 叶片细胞 FFOCT 图像

Fig. 12 Images of potted plant leaf cells. (a) Common microscopic image of leaf cells; (b) FFOCT image of leaf cells

5 结 论

该全场光学相干层析系统具有超高的三维分辨能力。器件使用上,卤钨灯的使用不仅极大降低了成本,而且提高了系统的纵向分辨率。已有的 FFOCT 系统通常使用水浸显微物镜实验,使用普通物镜,避免浸液对样品造成二次污染的同时进一

步降低了成本。结构上,保持显微物镜数值孔径不变,对科勒照明部分进行微小的改动,交换孔径光阑与视场光阑的位置,采用改进的光路结构,更容易实现样品的均匀照明,且可充分利用光源的光功率。实验表明,采用相同光源的情况下,通过此类改进,到达样品表面的光强得到了增强。

搭建的基于 Linnik 干涉结构全场光学相干层析系统已经能够获取生物组织样品高分辨率光学断层图像。对洋葱表皮细胞及盆栽树叶细胞的实验结果证明了该系统对生物组织观察的可行性,低成本及高分辨率对临床医学乃至临床医学有着很大的意义。目前已在对系统的采集速度和深度方向进行优化和改进,以期能够对临床诊断样品实现三维实时成像。

参 考 文 献

1 Huang D, Swanson E A, Lin C P, *et al.*. Optical coherence

- tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178–1181.
- 2 Bian Haiyi, Gao Wanrong, Zhang Xianling, *et al.*. Reconstruction method based on the detected matrix for spectral-domain optical coherence tomography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(2): 0211003.
卞海溢, 高万荣, 张仙玲, 等. 基于观察矩阵的频域光学相干层析成像图像重构算法[J]. *光学学报*, 2014, 34(2): 0211003.
 - 3 Yang Liu, Hong Wei, Wang Chuan, *et al.*. Flow velocity measurement based on speckle in optical coherence tomography[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(5): 0504002.
杨柳, 洪威, 王川, 等. 基于光学相干层析散斑的流速测量方法[J]. *中国激光*, 2012, 39(5): 0504002.
 - 4 Zhou Lin, Ding Zhihua, Yu Xiaofeng. Axial superresolution in optical coherence tomography through the combination of apodization and coherence gating[J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, 25(9): 1181–1185.
周琳, 丁志华, 俞晓峰. 利用变迹术和相干门相结合实现光学相干层析成像术轴向超分辨[J]. *光学学报*, 2005, 25(9): 1181–1185.
 - 5 Ding Zhihua, Zhao Chen, Bao Wen, *et al.*. Advances in doppler optical coherence tomography [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(8): 080005.
丁志华, 赵晨, 鲍文, 等. 多普勒光学相干层析成像研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(8): 080005.
 - 6 Zhang Wei, Lu Yiming, Wu Linhui, *et al.*. Hemoglobin diffuse optical tomography for breast tumor diagnosis; phantom experiment and in vivo evaluation[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(6): 0617001.
张伟, 卢奕名, 武林会, 等. 面向乳腺诊断的血氧扩散光学层析方法: 仿体实验与在体评估[J]. *光学学报*, 2013, 33(6): 0617001.
 - 7 Li Jianghua, Huang Hai, Tang Zhilie, *et al.*. Measurement of enamel mineral density by optical coherence tomography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(8): 0817001.
李江华, 黄海, 唐志列, 等. 光学相干层析成像对牙釉质矿密度的定量测量[J]. *光学学报*, 2013, 33(8): 0817001.
 - 8 Beaufort E, Boccara A C, Lebec M, *et al.*. Full-field optical coherence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1998, 23(4): 244–246.
 - 9 Dubois A, Vabre L, Boccara A C, *et al.*. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope[J]. *Appl Opt*, 2002, 41(4): 805–812.
 - 10 Dubois A, Moneron G, Grieve K, *et al.*. Three-dimensional cellular-level imaging using full-field optical coherence tomography[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2004, 49(7): 1227–1234.
 - 11 Zheng J, Lu D, Chen T, *et al.*. Label-free subcellular 3D live imaging of preimplantation mouse embryos with full-field optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(7): 0705031.
 - 12 Vabre L, Dubois A, Boccara A C. Thermal-light full-field optical coherence tomography[J]. *Opt Lett*, 2002, 27(7): 530–532.
 - 13 Hariharan P, Roy M. White-light phase-stepping interferometry for surface profiling [J]. *Journal of Modern Optics*, 1994, 41(11): 2197–2201.
 - 14 Latrive A, Boccara C. Flexible and rigid endoscopy for high-resolution in-depth imaging with Full-Field OCT[C]. *Biomedical Optics*, OSA, 2012; BTu4B.4.
 - 15 Lu S H, Wang C Y, Hsieh C Y, *et al.*. Full-field optical coherence tomography using nematic liquid-crystal phase shifter [J]. *Appl Opt*, 2012, 51(9): 1361–1366.
 - 16 Dubois A, Grieve K, Moneron G, *et al.*. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography[J]. *Appl Opt*, 2004, 43(14): 2874–2883.
 - 17 Watanabe Y, Hayasaka Y, Sato M, *et al.*. Full-field optical coherence tomography by achromatic phase shifting with a rotating polarizer[J]. *Appl Opt*, 2005, 44(8): 1387–1392.
 - 18 Moreau J, Lorient V, Boccara A C. Full-field birefringence imaging by thermal-light polarization-sensitive optical coherence tomography II. Instrument and results[J]. *Appl Opt*, 2003, 42(19): 3811–3818.
 - 19 Zhu Rihong, Chen Lei, Wang Qing, *et al.*. Phase-shift interferometry and its application[J]. *Journal of Applied Optics*, 2006, 27(2): 85–88.
朱日宏, 陈磊, 王青, 等. 移相干涉测量术及其应用[J]. *应用光学*, 2006, 27(2): 85–88.
 - 20 Yang Yaliang. Full Field Optical Coherence Tomography[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008. 44–46.
杨亚良. 全场光学相干层析成像研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008. 44–46.
 - 21 Goodman J W. *Statistical Optics* [M]. New York: Wiley-Interscience, 1985.
 - 22 Kino G S, Chim S S C. Mirau correlation microscope[J]. *Appl Opt*, 1990, 29(26): 3775–3783.
 - 23 Wang Rui. *Optical Coherence Tomography and Its Application in Embryonic Development* [D]. Beijing: Tsinghua University, 2006. 38–39.
王瑞. 光学相干CT及其在胚胎发育学中的应用[D]. 北京: 清华大学, 2006. 38–39.
 - 24 Yu Daoyin, Tan Hengying. *Engineering Optics* [M]. Beijing: China Machine Press, 1991. 347–348.
郁道银, 谈恒英. *工程光学* [M]. 北京: 机械工业出版社, 1998. 347–348.
 - 25 Safrani A, Abdulhalim I. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography using spatial coherence gating and quasi-monochromatic illumination[J]. *Opt Lett*, 2012, 37(4): 458–460.
 - 26 Xiao Qing. Development of Ultrahigh-Resolution, Real-Time Optical Coherence Tomography System[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011. 30–31.
肖清. 高分辨实时光学相干层析成像系统的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011. 30–31.

栏目编辑: 张浩佳