

基于声光可调滤波器的肺癌组织快速显微光谱成像

原江伟, 张春光, 王号, 石磊

福建师范大学光电与信息工程学院医学光电科学与技术教育部重点实验室,
福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007

摘要 相比于传统的分光元件, 非共线声光可调滤波器(AOTF)具有小巧、稳定性强、调谐灵活快速、信号接收和处理方便等诸多优点, 在光谱成像领域具有很高应用价值。将非共线 AOTF 与倒置光学显微镜有机结合, 构建了显微光谱成像系统, 在可见光范围内开展了肺癌组织的快速显微光谱成像研究。通过实验获得了加载在 AOTF 上的超声频率与衍射光波长的调谐关系, 与理论计算结果符合较好; 获得了一系列中心光波长下的肺癌组织的显微图像和对应的窄带光谱。实验结果表明, 系统在工作波段内均保持较好的光谱分辨性能; 对不同光波长肺癌组织图像进行对比, 结果未见图像明显漂移, 表明图像稳定性高; 各中心波长下获得的肺癌组织图像均呈现较好的清晰度; 不同波长肺癌组织图像的对比以及亮度、透射率曲线的分析结果显示, 在 503.45~590.12 nm 范围内, 肺癌组织图像呈现最佳的对比度和清晰度, 这主要是源于不同区域的内在组分和结构不同使得肺癌组织对于不同波长光信号的吸收程度不同。

关键词 生物光学; 声光可调滤波器; 肺癌组织; 超光谱成像

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0407003

Rapid Microscopic Spectral Imaging of Lung Cancer Tissue Based on Acousto-Optic Tunable Filter

Yuan Jiangwei, Zhang Chunguang, Wang Hao, Shi Lei

Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education,
Fujian Provincial Key Laboratory of Photonics Technology, College of Photonic and
Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Compared with the traditional beam-splitting elements, the noncollinear acousto-optic tunable filter (AOTF) has many special merits, such as small size, high stability, flexible and easy to tune, convenient for signal reception and processing. It has high application value in spectral imaging field. In this study, the noncollinear AOTF is connected with the converted microscope, and a hyperspectral microscopy imaging system is built. With the system, the rapid microscopic spectral imaging for lung cancer tissue is studied in the visible range. In the experiments, the relationship between the acoustic frequency and the diffracted optical wavelength loaded on AOTF is got, and the theoretical results coincide well with the experimental data. A series of microscopy images and corresponding narrow band spectra of lung cancer tissue are received at central wavelength. The results indicate that the system keeps a well spectral resolution performance in the working waveband. By comparing the lung cancer tissue images under different wavelengths, it is found that obvious image drift is not observed, which indicates that the image has high stability. Lung cancer tissue images of each central wavelength all present good clarity. The comparison of lung cancer tissue image and the analysis results of luminance curve and transmissivity curve show that the best contrast and clarity performance of the images are in the range of 503.45-590.12 nm. It is mainly because the different intrinsic constituents and structures in different areas induce different absorptivities of the signals with different optical wavelengths in lung cancer tissues.

收稿日期: 2017-07-18; 收到修改稿日期: 2017-08-09

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目滚动支持计划(IRT_15R10)、福建省自然科学基金(2017J01745)

作者简介: 原江伟(1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事声光滤波光谱成像应用方面的研究。E-mail: 878290572@qq.com

导师简介: 张春光(1980—), 女, 博士, 副教授, 主要从事声光器件理论、设计和应用方面的研究。

E-mail: cgzhang@fjnu.edu.cn(通信联系人)

Key words biotechnology; acousto-optic tunable filter; lung cancer tissue; hyperspectral imaging

OCIS codes 170.0110; 120.4820; 220.4830; 230.1040; 230.1950

1 引 言

作为分光元件,声光可调滤波器(AOTF)是基于各向异性介质内的反常布拉格衍射原理工作的。声光晶体和加载在它上面的压电换能器是AOTF的主要组成部分。控制系统将电信号加载到AOTF中的压电换能器上,将其转换成同频率的超声波;超声波在声光晶体内传播,会与入射光波发生相互作用,只有满足布拉格衍射条件时,入射光才会产生布拉格衍射,此时,衍射光波长与电驱动信号的频率之间呈一一对应的关系,因而可以通过改变电驱动信号频率来改变衍射光中心波长^[1]。应用中,可以通过计算机精准地控制驱动电信号的频率,从而方便、快速地操控光波长的扫描过程,显著提高了相关应用的程序化水平。TeO₂晶体是用于制作可见光至近红外波段AOTF的优良声光材料,其声光性能很出色,声光优值很高,在工作波段均保持较高的透射率;采用TeO₂材料制成的AOTF一般工作非共线模式下,衍射光和入射光不同向,极大地方便了衍射光的接收。

TeO₂非共线AOTF具有体积小、振动不敏感、快速电调谐(几微秒量级)、操作灵活、再现性好、光谱分辨率较高等诸多优点,体现了AOTF用于光谱成像研究的巨大潜力。生物医学是光谱成像的重要应用领域之一。通过生物组织的光谱成像研究,获得基于组织内在成分的图像信息和光谱信息,对于正确判断被测组织的生理、病理状态具有指导意义。

肺癌作为危害人类生命的主要癌症之一,一直受到相关学者、医生的关注,特别是近年来随着空气污染问题的加剧,肺癌患病比率逐年上升,使得对于肺癌快速诊断等相关技术的需求日渐显著。

本研究通过将尼康倒置显微成像系统和非共线AOTF有机结合,设计了AOTF显微光谱成像系统;以肺癌组织切片为研究对象,获得了可见光波段肺癌组织的大量准单色光谱及对应的显微图像,整个波段内,光谱分辨率较高;图像稳定性和清晰度较好,能够分辨出肺癌组织内部的精细结构;研究了肺癌组织图像的透射率随波长变化的关系,据此分析了在特定波段内图像清晰度、对比度等的变化规律,分析结果与直接观察结论一致。通过对不同的衍射光中心波长下的肺癌组织的显微光谱图像的比较和

分析,可以发现一些很明显的差异。本研究可为肺癌相关的快速诊断和研究提供一种新的技术手段。

2 基本原理

非共线AOTF的工作原理如图1所示。超声波与光波的相互作用平面是 $[1\bar{1}0]$ 。TeO₂为单轴晶体(忽略该晶体的旋光性),其中可有两种本征模式的光线传播,即寻常o光(波面为圆形)和反常e光(波面为椭圆形)。o光波面和e光波面在光轴方向相切。当满足布拉格衍射条件时,在TeO₂晶体内的入射光与超声波发生相互作用,从而产生衍射光波。非共线工作情况下,衍射光与入射光以不同的本征模式在晶体中传播,并且入射光波矢和衍射光波矢不平行,入射光波矢 \mathbf{k}_i 、超声波矢 \mathbf{K}_a 和衍射光波矢 \mathbf{k}_d 呈矢量三角形关系(即动量匹配条件)。通常在AOTF的设计中,为实现较大的入射角孔径,令入射光波矢和衍射光波矢在相应波矢曲面的切线相互平行(即切线平行条件)^[2-3]。

基于AOTF上述工作原理,主要设计参数的关系如下:

$$n_i = \left[\frac{\cos^2 \theta_i}{n_o^2} + \frac{\sin^2 \theta_i}{n_e^2} \right]^{-1/2}, \quad (1)$$

$$n_d = n_o, \quad (2)$$

式中 n_i 为入射光折射率, n_d 为出射光折射率; θ_i 为入射光极角, θ_a 为超声极角, θ_d 为衍射光极角; n_o 和 n_e 为垂直于光轴的o光和e光的折射率,它们是光波长的函数。

根据切线平行条件,衍射光极角与入射光极角的关系为

$$\tan \theta_d = (n_o/n_e)^2 \tan \theta_i. \quad (3)$$

根据动量匹配条件,超声波频率和衍射光波长的调谐关系为

$$f_a = (V_a/\lambda_0) [n_i^2 + n_d^2 - 2n_i n_d \cos(\theta_i - \theta_d)]^{1/2}. \quad (4)$$

结合(1)~(3)式,进一步可将(4)式简化为

$$f_a = (V_a/\lambda_0) (n_i - n_d) (\sin^4 \theta_i + \sin^2 2\theta_i)^{1/2}, \quad (5)$$

式中 $n_i - n_d$ 为双折射所引起的折射差, λ_0 为AOTF输出光波在真空中的中心波长。 f_a 和 V_a 分别为超声波的频率和波速。从中可以看出,调节超声波频率 f_a 可以调谐衍射光输出波长^[4-6]。

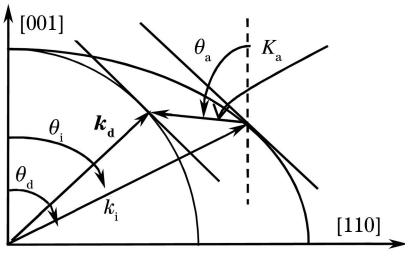


图 1 非共线声光相互作用矢量图

Fig. 1 Vectorial diagram of noncollinear acoustic-optic interaction

基于 AOTF 工作原理,设计了基于大孔径的非共线 AOTF^[7-8]。表 1 给出了 AOTF 的主要设计参数。

表 1 AOTF 的主要设计参数

Table 1 Main design parameters of AOTF

Item	Design parameter and performance
Acoustic polar angle θ_a	80.0°
Incident polar angle θ_i	23.80°
Range of the optical wavelength	400-700 nm
Range of acoustic frequency f_a	107.5-233.5 MHz
Driving power	1.0-1.5 W
Designed diffraction efficiency	>75% at 632.8 nm
Incident aperture angle	2.85°
Length of acousto-optic interaction L	4.0 mm
Spectral bandwidth	2.9 nm at 632.8 nm

3 实验结果与分析

本研究中,将自行设计的非共线 AOTF 与尼康倒置显微镜(TE2000-U)相结合,构建了一套超光谱显微成像系统,系统整体光路如图 2 所示。根据倒置显微镜的工作原理,处于系统上方的卤素灯作为宽带光源,卤素灯发出的光经过聚焦后,照射到下方载物台上的组织切片,携带组织切片光谱、图像信息的透射光经过显微物镜等器件后,从倒置显微镜底

部出口出射;出射光束首先通过缩索、准直,而后再经过偏振片 1(偏振方向和主平面平行)来获得 e 光,然后再经过双胶合透镜的聚焦后垂直射入 AOTF 滤波器中;利用计算机控制射频驱动电源,调谐加载在 AOTF 上的超声频率;从 AOTF 出来的两束光(一束为零级 e 光,另外一束为衍射 o 光)经过偏振片 2(偏振方向和主平面垂直)时,零级光被遮挡,只有衍射光可以通过,这样只留下需要的衍射 o 光;利用分光镜将衍射光分成两束,一束用 CCD(尼康公司定制)接收,获得被测组织的图像,另一束由光谱仪(Avaspec-Mini-VIS)接收,用于光谱分析^[9-12]。

实验中,为测试光谱成像系统的光谱分辨性能,在 120~170 MHz 范围内以一定频率间隔调节超声波频率,通过光谱仪不断记录衍射光谱。图 3 给出了超声波频率分别为 127, 134, 148, 155, 162, 169 MHz 时测得的衍射光光谱,从中明显看出 AOTF 具有很高的光谱分辨率。利用获得的衍射光谱,得到了衍射光谱带宽随着相应的光波长的变化关系[图 4(a)],以及超声波频率和衍射光波长的调谐关系[图 4(b)]。从图 4 可以看出,衍射光中心波长随着超声频率的增加而不断向短波变化,此规律较好地符合 AOTF 的理论调谐关系[(5)式];衍射光谱带宽随着光波长的增加而不断增加,且理论计算值与实验值符合得很好。表 2 列出了一系列不同超声波频率下衍射光谱的具体信息。根据表 2 可知,超声频率在 120~170 MHz 内变化,相应的光波长变化范围为 629.20~482.85 nm,反映出设计的 AOTF 具有较宽的工作波段。在整个工作波段内, AOTF 均保持较高的光谱分辨性能,例如,当衍射光中心波长为 516.10 nm 时,其带宽仅为 0.93 nm,很好地体现了此 AOTF 可以用于目标精细光谱信息的识别。

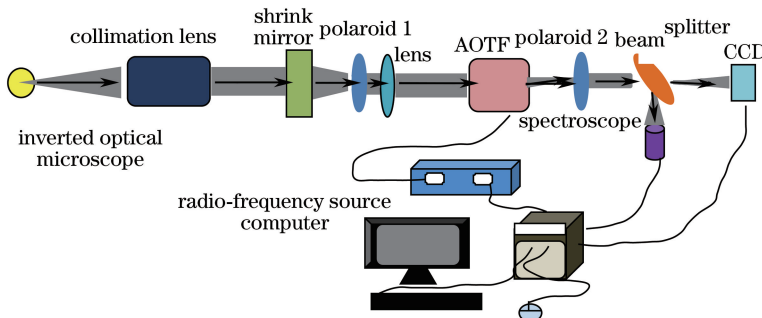


图 2 AOTF 显微光谱成像系统光路图

Fig. 2 Experimental setup of the AOTF-based microscopic spectral imaging system

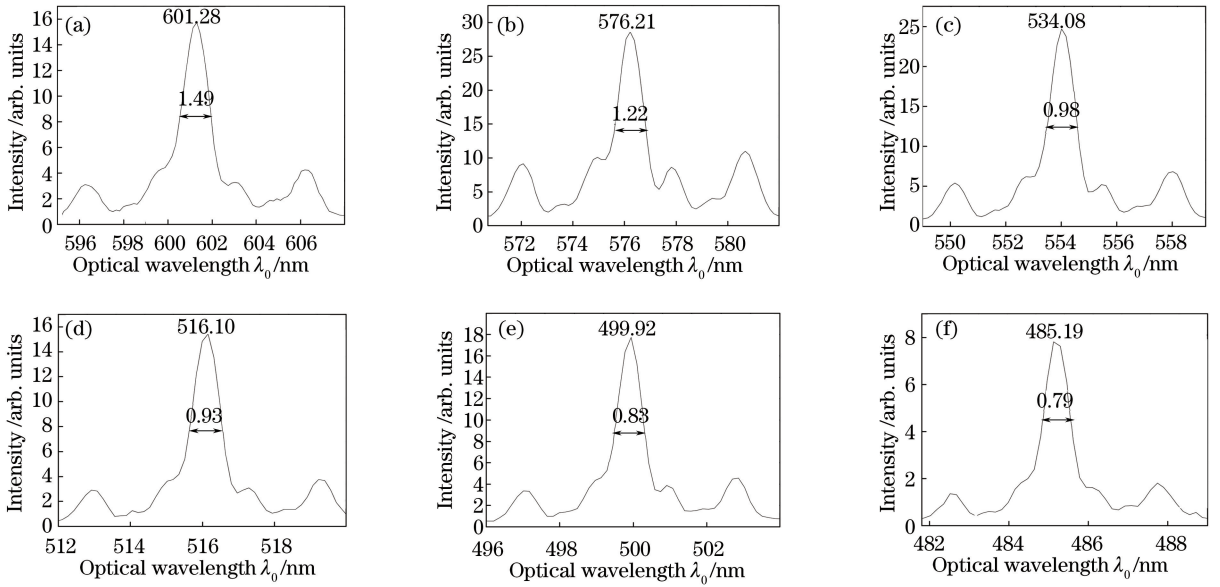


图 3 不同超声波频率下的 AOTF 衍射光光谱图。

(a) 127 MHz; (b) 134 MHz; (c) 148 MHz; (d) 155 MHz; (e) 162 MHz; (f) 169 MHz

Fig. 3 Diffraction spectra of AOTF at the different acoustic frequencies.

(a) 127 MHz; (b) 134 MHz; (c) 148 MHz; (d) 155 MHz; (e) 162 MHz; (f) 169 MHz

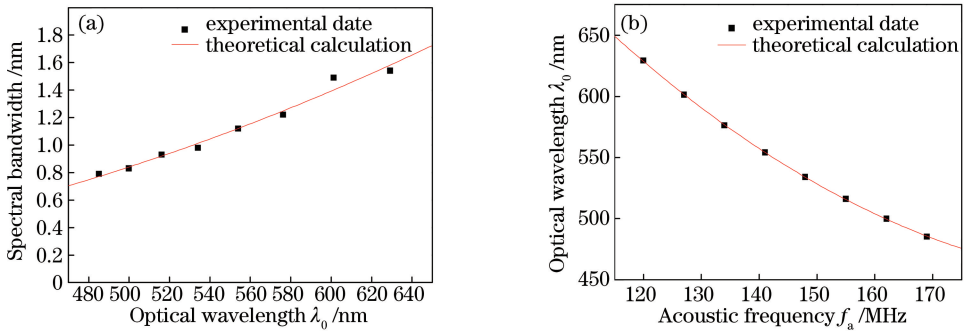


图 4 AOTF 显微光谱成像系统的性能曲线。

(a) 衍射光光谱带宽随中心光波长的变化关系; (b) 非共线 AOTF 的频率调谐关系

Fig. 4 Performance of AOTF-based microscopic spectral imaging system. (a) Relationship between spectral bandwidth of diffracted beam and central optical wavelength; (b) frequency tuning relation of noncollinear AOTF

表 2 不同超声波频率下的衍射光光谱参数

Table 2 Parameters of diffraction light spectra under different ultrasonic frequencies

Acoustic frequency /MHz	127	134	148	155	162	169
Central optical wavelength /nm	601.28	576.21	534.08	516.10	499.92	485.19
Spectral bandwidth /nm	1.49	1.22	0.98	0.93	0.83	0.79
Spectral resolution R	403.54	472.30	544.98	554.94	602.31	614.16

在研究中,采用肺癌组织切片为研究对象,利用 AOTF 显微光谱成像系统,获得了可见光波段肺癌组织的准单色图像及对应光谱。实验中,在 120~170 MHz 超声频率范围内,以 1 MHz 为扫描间隔,实时获取、记录肺癌组织的显微光谱图像和光谱。图 5 给出了光波长分别为 629.20, 576.21, 567.91, 542.12, 529.45, 503.84, 482.85 nm 以及声光滤波前

的肺癌组织显微图像。由图 5 可以看出,在整个波段内,肺癌组织图像均呈现较好的清晰度,组织精细结构明显可辨,体现了本实验系统可以用于肺癌组织结构的精细研究。通过不同光波长下肺癌组织图像区域的比较,还可发现超声频率在 120~170 MHz 快速扫描过程中,接收到的光谱图像未见明显的漂移,显示了该光谱系统具有较好的图像稳

定性。进一步观察图 5 可见,肺癌组织在不同中心光波长下的图像存在比较明显的差别:图像的亮度、每幅图上肺癌组织精细结构的清晰度、对比度直观上均有不同。为证实图 5 直观得到的现象并深入分析,图 6 给出了 629.20~482.85 nm 内组织图像的整体亮度随光波长的变化曲线。从图 6 看出,图像亮度分别在 503.84 nm 和 576.21 nm 出现峰值,表明此两处图像具有很高的亮度,对比图 5(g)和

(c),同样可以看到在这两个波长下具有高的图像亮度,表明图 6 分析结论与图 5 直观图像结果具有较好的一致性。图 6 中,529.45 nm 处达到亮度谷值,图 5(f)上也观察到该波长下的图像很暗。进一步分析图 6,在 629.20~482.85 nm 变化范围内,图像亮度先升高再减小,再升高到峰值,而后减小,这种变化趋势与观察到的图像明暗亮度变化过程基本一致。

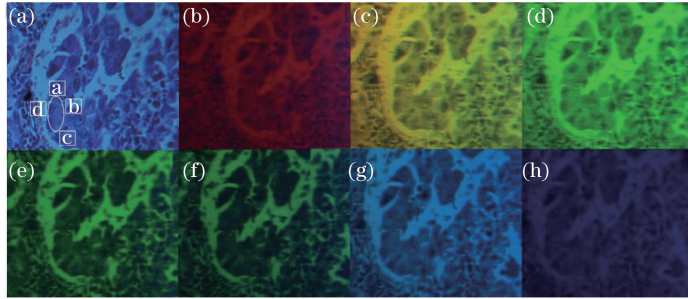


图 5 不同中心波长衍射光下的肺癌组织超光谱图像。(a) 未经过滤波;(b) 629.20 nm;(c) 576.21 nm;(d) 567.91 nm;(e) 542.12 nm;(f) 529.45 nm;(g) 503.84 nm;(h) 482.85 nm

Fig. 5 Hyperspectral images of lung cancer tissue with different center wavelengths of diffraction beams. (a) Without filtering; (b) 629.20 nm; (c) 576.21 nm; (d) 567.91 nm; (e) 542.12 nm; (f) 529.45 nm; (g) 503.84 nm; (h) 482.85 nm

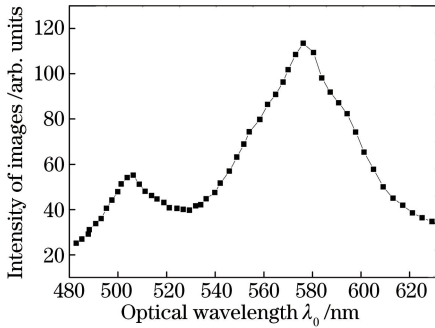


图 6 肺癌组织超光谱图像亮度随衍射光中心波长的变化曲线

Fig. 6 Relationship between the hyperspectral image intensity of the lung cancer tissue and the diffraction light center wavelength

为进一步分析、对比不同光波长下的肺癌组织切片的不同,在肺癌组织切片图像上选取几个相邻的目标区域进行细致的研究。图 7 给出了不同光波长下图 5(a)中参考区域(白色椭圆)与几个周围区域的透射光强对比曲线。

从图 7 可以看出,b、d 两条曲线比较接近,且与参考区域透射率差异比较明显,表明 b、d 两区域的组织与参考区域(白色椭圆)组织有较强的对比度,这可能源于 b、d 两区域的内在组分与参考区域有所不同,导致对相同光波长光信号的吸收程度不同。从图 5 同样可以看到,在各波长下 b、d 两区域和参

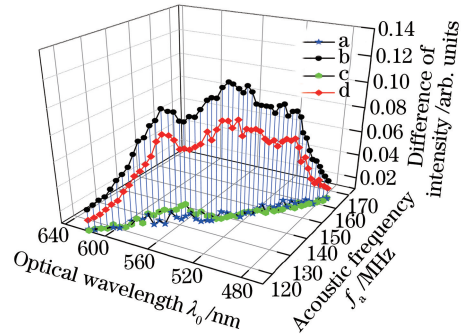


图 7 参考区域与临近组织的光强差异程度变化曲线

Fig. 7 Intensity difference curves of target area and adjacent tissue

考区域差别较明显,与图 7 分析结果基本一致。在图 7 中,a、c 曲线较低,均与参考区域组织的透射光强差别不明显,表明 a、c 两区域组织与参考区域对比不够显著,应该是由于 a、c 两区域组分与目标区域比较接近。同时从图 5 可观察到 a、c 两区域与参考区域间无明显界限,与图 7 结论一致。图 7 中,b、d 曲线在 576,542 nm 附近各出现了一个峰值,反映了这两个波长附近的参考区域与邻近组织(b、d 区域)的光谱图像强度差异较大,这点恰好从图 5(c)和(e)可以看出。综合来看,图 7 曲线在 529.45~542.12 nm 邻近组织与参考区域超光谱成像强度差异均较大,从图 5(e)和(f)也可以看出此区域图像清

晰度较好,说明在 529.45~542.12 nm 波长范围进行肺癌组织的显微光谱成像研究,更有利于对肺癌组织精细结构的深入识别。

5 结 论

通过将非共线 AOTF 这种优良的分光元件与倒置显微镜、计算机、CCD、光谱仪等有机结合,构建了基于 AOTF 的显微光谱成像系统。选取肺癌组织为研究对象,开展了显微光谱成像研究。结果显示:1) 在 629.20~482.85 nm 范围内,光谱成像系统具有很高的光谱分辨性能,且实验获得的超声频率调谐关系与理论分析结果相符合;2) 获得了不同光波长的肺癌组织显微图像,整个波段内图像清晰度较好,可以满足生物组织显微光谱成像需要,图像亮度、相邻区域透射率差异随光波长的变化规律与直接观察显微图像所得的结论在趋势上具有很好的一致性;3) 在 529.45~542.12 nm 范围内,图像清晰度、对比度较好,表明本系统适合用于对肺癌组织精细结构的研究;4) 本实验研究中将肺癌组织切片作为研究对象,充分表明所建立的 AOTF 显微光谱成像系统可以用于生物医学中相关疾病的快速诊断和研究。

参 考 文 献

- [1] Zhang C G. The technology of the acousto-optic tunable filter based on the hyperspectral imaging system [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2008: 13-25.
张春光. 基于超光谱成像系统的声光可调滤波技术研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2008: 13-25.
- [2] Zhang C G, Wang H, Qiu Y S. Selection of design theory for near infrared noncolliner acousto-optic tunable filter[J]. Chinese Journal of Lasers, 2011, 38(9): 0916001.
张春光, 王号, 邱怡申. 近红外非共线声光可调谐滤波器设计理论的选取方法[J]. 中国激光, 2011, 38(9): 0916001.
- [3] Gupta N, Voloshinov V B. Development and characterization of two transducer imaging acousto-optic tunable filter with extended tuning range[J]. Applied Optics, 2007, 46(7): 1081-1088.
- [4] Gao Q, Zhang C G, Wang H, *et al.* Hyperspectral imaging of human gastric parietal cells based on narrow band AOTF [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(12): 122205.
高强, 张春光, 王号, 等. 基于窄带 AOTF 人体胃壁细胞组织的超光谱显微成像[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(12): 122205.

- [5] You J W, Ahn J, Kim S, *et al.* Efficient double-filtering with a single acousto-optic tunable filter[J]. Optics Express, 2008, 16(26): 21505-21511.
- [6] Xue P, Wang Z B, Zhang R, *et al.* Highly efficient measurement technology based on hyper-spectro polarimetric imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2016, 43(8): 0811001.
薛鹏, 王志斌, 张瑞, 等. 高光谱全偏振成像快捷测量技术研究[J]. 中国激光, 2016, 43(8): 0811001.
- [7] Li Y S, Wang Z B, Chen Y H, *et al.* Design of rear-imaging system for AOTF spectral imaging instruments [J]. Journal of University of Jinan, 2015, 29(2): 142-145.
李永帅, 王志斌, 陈友华, 等. 声光可调滤波器成像光谱仪后置成像系统设计[J]. 济南大学学报, 2015, 29(2): 142-145.
- [8] Wang H, Zhang C G, Huang J F, *et al.* Design and performance evaluation of a narrow band acousto-optic filter considering the rotatory property[J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(4): 0423002.
王号, 张春光, 黄峻峰, 等. 考虑旋光影响的窄带声光滤波器设计及其性能分析[J]. 光学学报, 2014, 34(4): 0423002.
- [9] Yang W, Liu Y, Xiao L F, *et al.* Suppression of sidelobe levels for acousto-optic tunable filters using cascaded single-stage acousto-optic tunable filters[J]. Chinese Journal of Lasers, 2009, 36(10): 2734-2739.
杨薇, 刘迎, 肖立峰, 等. 多级级联声光可调谐滤波器旁瓣的抑制[J]. 中国激光, 2009, 36(10): 2734-2739.
- [10] Huang J F, Wang H, Zhang C G, *et al.* Double-filtering performance of acousto-optic tunable filter with two crystals [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(9): 092301.
黄峻峰, 王号, 张春光, 等. 声光可调滤波器双晶体二次滤波的性能分析[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(9): 092301.
- [11] Kang Z X, Liu C, Sun J, *et al.* Investigation on the cladding etched single-mode fiber acousto-optic tunable filter and its axial strain characteristics [J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(12): 1206003.
康泽新, 刘超, 孙将, 等. 基于包层腐蚀的单模光纤型声光滤波器及其轴向应力特性的研究[J]. 光学学报, 2013, 33(12): 1206003.
- [12] Li J M, Ma Y C, Yan S B, *et al.* High precision and wide scale fiber Bragg grating sensor interrogation system based on tunable filtering[J]. Chinese Journal of Lasers, 2013, 40(9): 0905002.
李锦明, 马游春, 闫树斌, 等. 基于可调谐滤波器的高精度宽量程光栅传感解调系统[J]. 中国激光, 2013, 40(9): 0905002.