

基于光学相干层析成像散射量化表征细胞分布的研究

沈仁强¹, 王玲^{1,2*}, 徐铭恩^{1,2}, 彭世昌²

¹杭州电子科技大学自动化学院, 浙江 杭州 310018;

²浙江省医学信息与生物三维打印重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘要 采用一种基于光学相干层析成像(OCT)技术的深度分辨散射系数计算方法来量化表征细胞分布特性。该方法基于单散射模型获取深度分辨散射系数分布图,并通过散射系数直方图统计发现细胞分布规律。通过多层散射介质模型验证了该方法的有效性。实验结果表明:根据散射系数分布图可以深度分辨细胞分布特性,相比 OCT 强度图像,细胞和背景的对比更明显;不同浓度细胞悬浮液的 OCT 强度信号直方图无明显区别,散射系数直方图则出现了表征细胞浓度的特征峰,且该特征峰与背景散射特征峰的偏离程度与细胞浓度呈线性关系。利用 OCT 散射系数分布图检测到生物三维打印水凝胶支架内细胞分布与 H&E 染色结果有较好的对应关系,且相应的散射系数直方图分布中出现了表征细胞浓度的特征峰。

关键词 生物光学; 光学相干层析成像; 散射系数; 细胞分布

中图分类号 TN247

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207039

Characterization of Cell Distribution Based on Optical Coherence Tomography Scattering

Shen Renqiang¹, Wang Ling^{1,2*}, Xu Ming'en^{1,2}, Peng Shichang²

¹School of Automated, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China;

²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Information and Three-Dimensional Bio-Printing, Hangzhou, Zhejiang 310018, China

Abstract Cell distribution can be characterized quantitatively using a depth-resolved scattering coefficient calculation method based on optical coherence tomography (OCT). This method uses a single scattering model to obtain a depth-resolved scattering coefficient distribution map, and the law of cell distribution is verified using the histogram statistics of the scattering coefficient. A multilayer scattering medium model is used to verify the effectiveness of the proposed method. The experiments reveal that the scattering coefficient distribution maps can resolve the cell distribution depth and provide a more obvious contrast between the cell and background compared with an intensity map. There are no significant differences in the distributions of the OCT intensity signal histograms of various cell suspensions. The histogram of the scattering coefficient contains the characteristic cell concentration peak, and the degree of deviation between the characteristic peak and background scattering characteristic peak is linear with the cell concentration. The cell distribution in the bio-3D printed hydrogel scaffold detected by the OCT scattering coefficient distribution map corresponds well with the H&E staining results, and the corresponding scattering coefficient histogram distribution exhibits peaks characteristic of the cell concentration.

Key words biological optics; optical coherence tomography; scattering coefficient; cell distribution

OCIS codes 170.3880; 170.4500; 290.5820

1 引言

非侵入性、无标记的可视化和量化三维组织模

型中的细胞分布对组织工程领域的研究具有重要意义。使用先进的成像技术监测细胞变得越来越重要,如细胞的分布、运动及生长情况。目前,细胞分

收稿日期: 2019-11-06; 修回日期: 2019-12-08; 录用日期: 2019-12-16

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1103400)、国家自然科学基金(61675059)

* E-mail: lingw@hdu.edu.cn

布定量方法包括使用荧光共聚焦显微镜(CM)对经过冷冻切片的支架成像,然后进行数字图像重建^[1]。这种方法虽然精确,但具有破坏性,且耗时长,成像深度低于 300 μm ,因此,对大量样品进行深度分辨检测时无法实现实时在线检测。多光子显微镜扩展了 CM 的成像深度,但穿透深度仅为几百微米以下,并且使用的高功率激光可能损伤细胞^[2-4]。光声显微成像最大可以实现 10 mm 以上的成像深度,但其成像分辨率只有 30~100 μm ,无法分辨生物组织内部的精细结构^[5];此外,磁共振成像和微计算机断层扫描已被用于评估组织工程支架中的细胞分布,但成像分辨率有限,且这类技术具有高能辐射等危险,成本较高,不适合用于实时和连续成像^[6]。

光学相干层析成像(OCT)技术基于低相干干涉原理,依据后向散射特性和折射率差异来识别样品内的微观结构,无需荧光标记或其他外源对比剂,就能对活体样品进行非接触、非侵入的横断面实时成像^[7-8]。因此,OCT 技术非常适用于工程组织的无创监测,且已被用于表征组织工程支架中的细胞分布、生长和迁移。Bagnaninchi 等^[9]利用细胞在组织内的运动作为内源性对比,通过光学相干相位显微术(OCPM)探测细胞运动产生的相位浮动,根据相位区分组织材料和活细胞,从而得到细胞在三维组织模型中的分布情况。同样,Holmes 等^[10]利用 OCPM 实现了定量相位成像,将与活细胞运动相关的相位波动映射到图像中,实现了组织材料和细胞的区分。因此,利用 OCPM 探测由活细胞的运动性引起的光学波动的方法使得在三维组织模型实现细胞分布的可视化具有一定的可行性,但该类方法对于光学系统较为敏感,易受环境噪声影响,因此对系统灵敏度要求较高,从而使得系统成本较高。Tan 等^[11]使用 OCT 技术实现了三维组织模型微观结构的非侵入式成像,并探索了工程组织的生长过程。利用 OCT 技术能清楚地识别出组织微结构和细胞分布,且因为 OCT 技术依赖的是介质的折射率和光学散射特性的变化,所以不需要外源荧光团即可分辨组织材料和细胞之间的差异。同时,有研究表明,细胞和支架材料的散射特性不同,细胞在 OCT 图像中表现为明亮的区域,这初步证明了将基于散射差异的 OCT 技术用于检测工程化组织中细胞分布的可行性^[12]。此外,还有相关研究利用 OCT 技术测量细胞的散射系数,用于区分鼻咽癌细胞系光学特性的内在差异^[13],检测细胞的凋亡过程^[14],以及鉴别活细胞、坏死细胞、凋亡细胞^[15-16]。同时,对散射信号进

行测量和分析能够得到与粒子浓度和粒径等有关信息^[17]。这些应用表明了基于散射系数进行细胞检测的可行性。这类研究主要关注的是相对均匀的同种类型介质的散射系数或计算组织的整体散射系数,较少注意深度分辨散射系数的分布特性。

本文提出一种基于 OCT 干涉光谱信号确定深度分辨散射系数的方法,该方法利用 OCT 大部分光在成像深度范围内衰减成像的特性,基于单散射模型计算局部的衰减系数,将 OCT 干涉光谱信号数据集中的每个像素转换为衰减系数数据集中的相应像素,无需分割区域以及进行大量的平均,即可确定整个成像范围内每个像素的散射系数。本文首先构建多层散射模型,验证该方法深度分辨多层散射体模型的有效性。接着,计算不同浓度细胞悬浮液的散射系数分布,以及生物三维(3D)打印细胞负载水凝胶支架的散射系数分布,以此展示基于深度分辨散射系数表征细胞分布的可行性,并通过 H&E 染色对照验证散射分布检测的准确性。

2 系统和方法

2.1 OCT 成像

采用自制的高分辨谱域 OCT 系统^[18]进行组织模型无损成像和介质散射系数分布测量。系统采用中心波长为 1310 nm、半峰全宽为 245 nm 的宽带光源,系统的轴向分辨率为 5.5 μm ,横向分辨率为 13 μm ,每个纵向扫描(A-Scan)的采样率为 48 kHz。空气中,系统成像深度达到 3.5 mm,物镜焦距为 25.1 mm,所有扫描过程中焦点聚焦至样品表面。对于多层介质散射模型,采集的图像大小为 3 mm \times 3.5 mm。对于细胞悬浮液,在扫描过程中为避免液面的强烈反射,采集的图像尺寸为 3 mm \times 3.5 mm,对应的像素为 600 pixel(x) \times 1024 pixel(z),每个 A-scan 重复采集 10 次取平均值。对于水凝胶支架,采集的图像尺寸为 10 mm \times 3.5 mm,为降低系统噪声,每个 A-Scan 采集 20 次取平均值。

2.2 散射系数分布计算方法

根据单次散射模型^[19-20],检测到的 OCT 信号功率 $I(z)$ 与来自样本的反射光强度成正比,并且与均匀介质中某一深度 z 处的散射与吸收有关,可以描述为

$$I(z) \propto \exp(-2\mu z), \quad (1)$$

式中: $\mu = \mu_a + \mu_s$ 表示介质的衰减系数, μ_a 为吸收系数, μ_s 为散射系数,由于组织对波长在 800~1400 nm 的近红外光的散射远大于吸收,因此衰减

系数可近似为散射系数。(1)式中的 2 倍关系是因为光束两次通过组织。散射系数可以通过对 OCT 信号的对数进行求导得出^[21]：

$$\hat{\mu}_s = -\frac{1}{2} \frac{d \ln[I(z)]}{dz} \quad (2)$$

对(2)式加以推导,并将连续的 A-Scan 信号离散化至 CCD 相机 1024 个纵向采样点上,得出散射系数 μ_s 与深度方向上各采样点功率的关系式,即

$$\mu_s[i] = \frac{1}{2\Delta} \ln \left(1 + \frac{I[i]}{\sum_{i+1}^{\infty} I[i]} \right) \quad (3)$$

式中: Δ 表示纵向像素大小; $I[i]$ 表示纵向深度方向第 i 个采样点的功率。每个点的散射系数依赖于该点以下所有采样点的功率之和,因此在纵向扫描的末端,可用于散射系数计算的像素数较少,散射系数的计算误差偏大。考虑到待测对象对应的有效穿透深度,计算纵向扫描方向的散射系数时有效像素数仅取了 800 pixel。大小为 $n \times m$ 的 OCT 强度图像的散射系数分布图像的重建过程如图 1 所示。对纵向扫描的每个采样点 i ,利用(3)式计算每个纵向采样点对应的散射系数,并经过一个横向扫描(B-Scan)得到散射系数分布图像,就能够将 OCT 数据集中的每个像素转换为散射系数数据集中的对应数值。

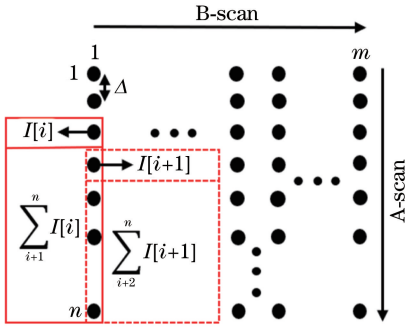


图 1 散射系数分布图像重建过程

Fig. 1 Reconstruction process of scattering coefficient distribution image

2.3 信号直方图统计分析

在每个样本的随机位置采集 10 组 OCT 强度数据集,使用(3)式计算每组强度数据集对应的散射系数数据集,绘制频率分布直方图,强度和散射系数的频率分布直方图的组距分别设置为 0.5 dB 和 0.1 mm^{-1} 。记录每组强度和散射系数频率分布直方图峰值处的强度值以及散射系数值,统计分析方法采用配对 t 检验,数据以平均值 \pm 标准差表示,以 $p < 0.05$ 来表征细胞浓度以及水凝胶加入细胞前后

的散射特性差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 散射系数计算方法验证

为验证深度分辨散射系数计算方法的准确性,本文制作了多层介质散射模型,具体结构如下:盖玻片-聚苯乙烯(PS)微球溶液-盖玻片-1% Intralipid™-盖玻片。PS(麦克林试剂,中国)和 Intralipid(华瑞制药有限公司,中国)是两种标准的散射样品,对可见光和近红外光有高散射,且对光的吸收非常弱,通常用于模拟组织样品。PS 微球的直径为 $5 \mu\text{m}$,单位容积(mL)微球数为 6.05×10^6 ,在 1310 nm 中心波长条件下,PS 微球的折射率为 $1.5692 + 0.003i$,水的折射率为 1.3236 ^[22]。根据这些参数,由 Mie 散射理论^[23]可以得到 PS 微球溶液的散射系数为 0.289 mm^{-1} 。Intralipid 主要成分为大豆油、卵磷脂和甘油,其中大豆油和卵磷脂为主要的散射介质,而甘油溶于水变为单个分子,与光作用不发生散射效应。

图 2(a)为多层介质散射模型的 OCT 强度图像,共五层结构。图 2(b)为使用(3)式计算得到的散射系数分布图像,图像下方的明亮区域是由散射计算误差造成的。从图 2(b)中选择 40 条 A-Scan(图中虚线部分)横向平均得到散射与深度关系曲线,如图 2(c)所示。图 2(c)中分别对 PS 层和 Intralipid 层求平均,得到 PS 层和 Intralipid 层的散射系数 μ_s 分别为 $(0.2686 \pm 0.0824) \text{ mm}^{-1}$ 和 $(1.2468 \pm 0.3690) \text{ mm}^{-1}$ 。结果显示,由深度分辨散射系数计算 PS 的散射系数与根据 Mie 理论计算的结果一致,并且 Intralipid™ 的计算结果与文献[19]的结果($\mu_s = 1.56 \text{ mm}^{-1}$)较为吻合,验证了该方法的准确性。

3.2 细胞悬浮液散射系数分布

本文通过细胞悬浮液实验验证通过 OCT 深度分辨散射系数分布图识别不同浓度细胞分布的可行性。将人肝癌细胞 C3A 复苏后接种到 75 mL 的培养瓶中,加入含体积分数为 95% 的 DMEM、5% 的血清以及 0.5 mL 青霉素-链霉素混合液的完全培养基,并置于细胞培养箱中($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度)进行常规培养。细胞生长至培养瓶底面积的 90% 时,经胰酶消化再进行离心处理,然后去除上层清液,最后使用移液枪加入 4 mL 培养基吹散细胞使其均匀分布在培养基中,取 $10 \mu\text{L}$ 培养基至细胞计数板计量细胞的个数,制备三种不同浓度的细胞悬浮液。

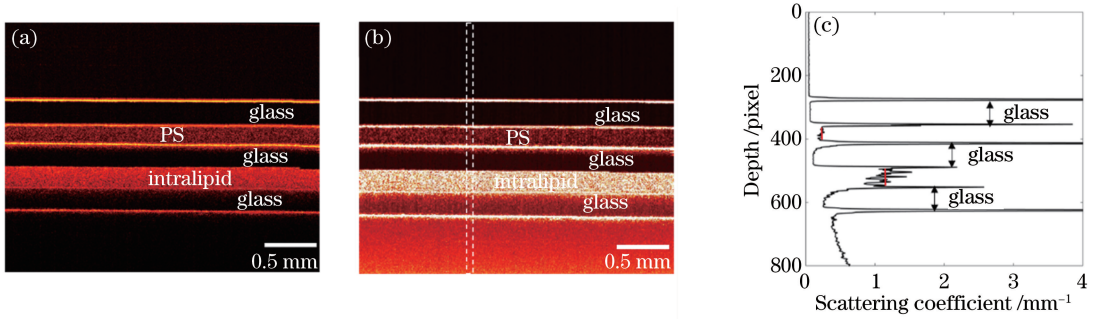


图 2 多层介质散射模型的 OCT 图像及散射系数分布。(a) OCT 强度图像;

(b) 本文方法计算的散射系数分布图像;(c) 图 2(b) 中白色虚线框处模型对应的散射曲线

Fig. 2 OCT image and scattering coefficient distribution of the multilayer dielectric scattering model. (a) OCT intensity image; (b) scattering coefficient distribution calculated by the proposed method; (c) scattering curve corresponding to the model at the white dotted frame in Fig. 2(b)

图 3(a1)~(a4) 分别为浓度为 $0, 5 \times 10^5, 1 \times 10^6, 3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的 C3A 细胞悬浮液的 OCT 强度图像。对比图 3(a1), 图 3(a2)~(a4) 三种不同浓度 C3A 细胞悬浮液的 OCT 强度图像中出现了明显的明亮区域及光斑, 明亮区域是因均匀分布的细胞散射形成的, 而光斑则是由未消化的细胞团块散射形成的。可见, 高分辨率的 OCT 具备识别细胞和细胞团块的能力。消化较好的细胞均匀分布在培养基的上层, 而未消化完全的细胞团块则随机分布于培养基的下层; 随着细胞浓度的增加, 培养基上层的细胞分布越密集, OCT 强度图像的

明亮区域越明亮, 而培养基下层的细胞团块随着细胞浓度的增加没有太明显的变化, 这是因为 OCT 信号强度随深度的增加而衰减。图 3(b1)~(b4) 是对应浓度细胞悬浮液的 OCT 散射图像, 与 OCT 强度图像具有较好的对应关系, 不同点在于前者是图像灰度差异, 后者是散射系数差异。相比 OCT 强度图像, OCT 散射图像的散射系数并不随着深度的增加而衰减, 散射系数大小只与散射介质(细胞)的直径相关。分析 OCT 深度分辨散射图像能够实现细胞分布区分, 从而区分共混状态下不同直径的细胞团块。

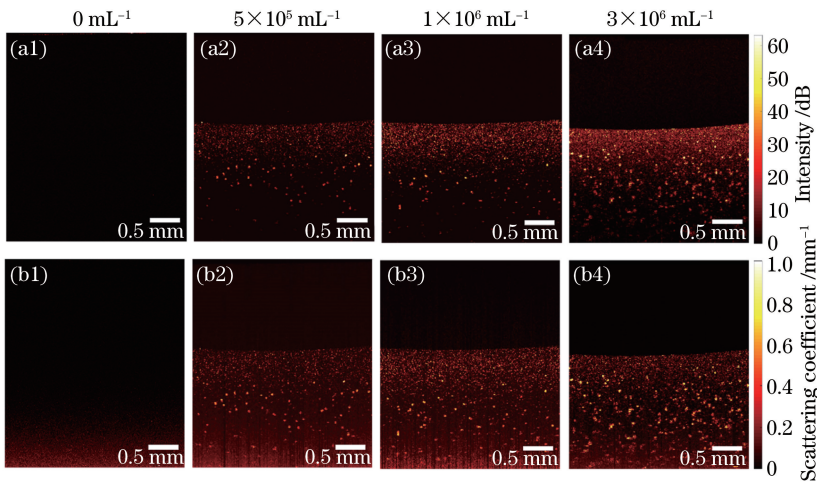


图 3 不同浓度的 C3A 细胞悬浮液 OCT 强度图像与散射图像。(a1)~(a4) OCT 强度图像;(b1)~(b4) OCT 散射图像

Fig. 3 OCT intensity images and scattering images of C3A cell suspension with different concentrations.

(a1)-(a4) OCT intensity images; (b1)-(b4) OCT scattering images

为量化细胞的浓度, 分别对图 3 中的 OCT 强度图像的强度值及散射图像的散射系数值进行统计, 图像的总像素为 $600 \text{ pixel}(x) \times 800 \text{ pixel}(z)$ 。图 4(a1)~(a4) 分别为浓度为 $0, 5 \times 10^5, 1 \times 10^6,$

$3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的 C3A 细胞悬浮液的 OCT 强度图像强度值的统计直方图。图 4(a1) 中强度分布直方图基本呈高斯分布, 峰值处的强度值为 26.75 dB, 最大强度不超过 32 dB。如图 4(a2)~(a4) 所示,

随着细胞浓度的上升,强度大于 32 dB 区域的频数逐渐增加,强度分布变宽。图 4(a1)~(a4)给出了最大频数对应的信号强度,随着细胞浓度的增大,OCT 信号强度先增大后不变。这一方面可能是因为细胞消化不良,细胞团块的数量增多,而团块对应的信号强度较大,另一方面可能是因为不能保证聚焦位置完全的位于液面。图 4(b1)~(b4)为对应浓度的散射系数分布直方图。培养基的背景散射系数分布不再呈现高斯分布,散射系数越大其所占的频数越低,原因是散射系数计算误差随着深度的增加而增大,与图 3(b1)的结果一致。

细胞悬浮液的散射系数呈双峰特征分布,原始的背景峰[图 4(b1)]旁出现了散射系数分布较广的肩型特征峰。由图 4(b2)~(b4)中标示的最大频数对应的散射系数值可知:随着细胞浓度的增加,肩型特征峰与背景峰的偏离程度逐渐加大,最大频数对应的散射系数值逐渐增大;背景峰最大频数对应的散射系数值逐渐减小。这是由于细胞浓度越高,细胞在培养基中越密集,纵向扫描的细胞数量越多,导致培养基背景以下细胞的功率之和越大,计算的培养基背景散射系数变小,因此细胞浓度越高对背景抑制的作用越强。

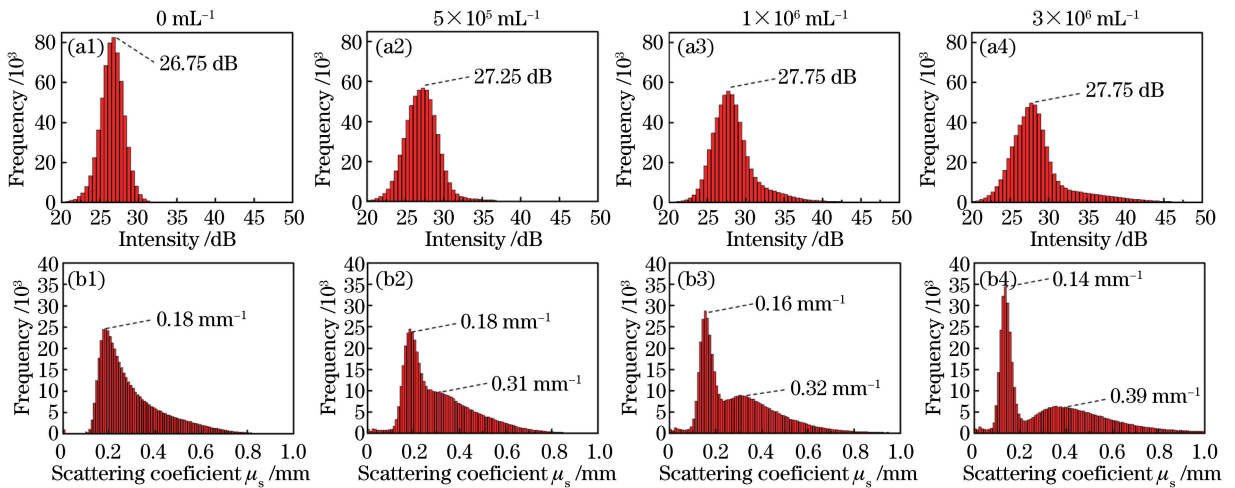


图 4 不同浓度细胞悬浮液的 OCT 强度及散射系数的频数分布直方图。(a1)~(a4)信号强度;(b1)~(b4)散射系数

Fig. 4 Frequency distribution histograms of OCT intensity and scattering coefficient for cell suspension with different concentrations. (a1)-(a4) Signal intensity; (b1)-(b4) scattering coefficient

图 5 所示为分布直方图最大频数处对应的信号强度和介质散射系数与浓度的关系曲线,误差线表示同一样本下采集的 10 组实验数据的标准差。由图 5(a)可看出,信号强度值随着浓度的增加先增大后不变。由图 5(b)可看出,随着浓度的

增加,背景峰的散射系数逐渐降低,而细胞特征峰的散射系数和双峰间距逐渐上升。综上所述,基于信号强度分布无法量化细胞的浓度,但散射系数分布与细胞浓度之间具有线性关系。

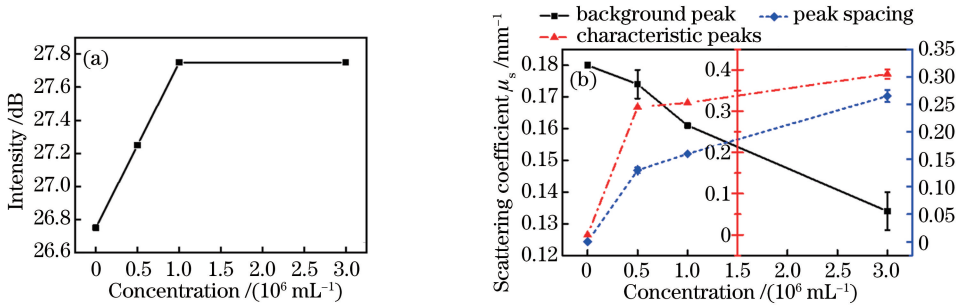


图 5 分布直方图最大频数对应的参数值与细胞浓度的关系曲线。(a)强度值与细胞浓度的关系曲线;(b)散射系数值及背景峰和细胞特征峰的间距与细胞浓度的关系曲线

Fig. 5 Relationship between the parameters of the maximum frequency of the distribution histograms and the cell concentration. (a) Relationship between intensity and cell concentration; (b) relationship among scattering coefficient, distance between background peak and cell characteristic peak, and cell concentration

3.3 生物三维打印水凝胶支架的散射系数分布检测

为进一步验证本文采用的深度分辨散射系数分布图在三维组织模型中识别细胞分布的可行性,进行了生物三维打印水凝胶支架和细胞负载水凝胶支架的成像对比实验。利用 10% 的明胶和 2% 的海藻酸钠等比例混合支撑水凝胶,取 3 mL 水凝胶混入 3×10^6 个细胞得到浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的混合液。将不含细胞和含细胞的水凝胶放置于生物 3D 打印机(Bio-Architect Sparrow, 杭州捷诺飞, 中国)打印水凝胶支架,组织模型厚度达到 3 mm。为形成良好的稳定结构,在打印好的支架中加入 CaCl_2 交联剂交联 1 min,再用 PBS 缓冲液清洗 2~3 次,之后将组织模型浸泡在 PBS 缓冲液中以防模型水化。在正常培养条件下,将处理好的打印组织模型用于 OCT 成像。OCT 成像后使用 4% 的甲醛溶液固定

支架,以备 H&E 染色切片检测。

图 6(a1)~(a2)分别表示无细胞和含细胞的生物三维打印水凝胶支架的 OCT 强度图像,图 6(b1)~(b2)为对应的支架 OCT 散射图像。图 6(a1)中水凝胶支架的 OCT 强度图像的整体灰度一致,加入细胞后的 OCT 强度图像的整体灰度值增加,如图 6(a2)所示,这是因为细胞的加入增加了支架的整体光学散射特性^[24];此外,由于细胞的散射系数与水凝胶的散射系数不同,在 OCT 强度图像中材料和细胞的灰度不同,图中明亮的结构点为细胞。相比于 OCT 强度图像,OCT 深度分辨散射系数分布图可直接表征材料与细胞散射特性的差异,图 6(b2)中细胞与水凝胶材料的对比差异更加明显,细胞分布显示更清晰。

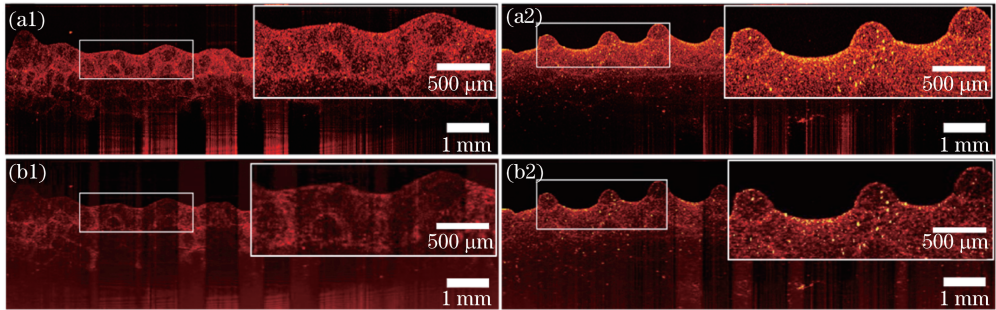


图 6 无细胞和含细胞水凝胶支架的 OCT 强度图像以及散射图像。(a1)无细胞的支架的 OCT 强度图像;(a2)含细胞的支架的 OCT 强度图像;(b1)无细胞的支架的散射图像;(b2)含细胞的支架的散射图像

Fig. 6 OCT intensity images and scattering images of cell-free and cell-containing hydrogel scaffolds. (a1) OCT intensity image of cell-free scaffold; (a2) OCT intensity image of cell-containing scaffold; (b1) scattering image of cell-free scaffold; (b2) scattering image of cell-containing scaffold

为进一步验证 OCT 散射系数分布识别细胞的有效性,本文对 PBS 缓冲液、无细胞支架、细胞负载水凝胶支架的 OCT 信号强度和散射系数分布进行了直方图统计,如图 7 所示。如图 7(a)所示,只含 PBS 缓冲溶液的背景 OCT 信号强度分布在 25 dB 至 31 dB 之间,峰值处的信号强度为 28.75 dB。如图 7(b)所示,无细胞水凝胶支架的信号强度分布在 25 至 50 dB 之间,峰值处的强度值为 29.25 dB,信号强度高于 31 dB 的频数增加是由水凝胶材料引起的。图 7(c)细胞负载水凝胶支架的信号强度分布与图 7(b)无明显差别,峰值处的强度几乎不变。图 7(d)为 PBS 溶液的散射系数分布直方图,图 7(e)无细胞水凝胶支架的散射系数分布图,图 7(f)为细胞负载水凝胶支架的散射系数分布直方图。对比图 7(d),图 7(e)加入支架后直方图中出现了表征支架材料的散射肩型特征峰,背景散射峰值处的散射系

数减小,抑制了背景散射。图 7(f)对比图 7(e),加入细胞后肩型特征峰峰值处的散射系数值增加,与背景散射峰的分离程度加大。从图 7 可以看出,OCT 强度信号分布直方图无法反映出支架中是否含有细胞,而从散射系数分布的直方图中能够有效区分培养基背景、细胞和材料,并且散射系数分布直方图能够表征支架中有无细胞时的散射差异。

3.4 OCT 检测细胞分布准确性验证

为验证利用 OCT 深度分辨散射系数检测水凝胶支架内细胞分布的准确性,需证明图 6 中的结构亮点为细胞。水凝胶支架经 OCT 扫描之后,用甲醛固定 30 min 用于切片,切片厚度为 $4 \mu\text{m}$,并用 DAPI 染色剂进行染色,切片过程中需对样品进行固定、脱水、再水化等处理,这导致水凝胶存在一定的收缩变形。图 8(a1)和 8(a2)为无细胞水凝胶支架和细胞负载水凝胶支架的 OCT 图像,图 8(b1)和

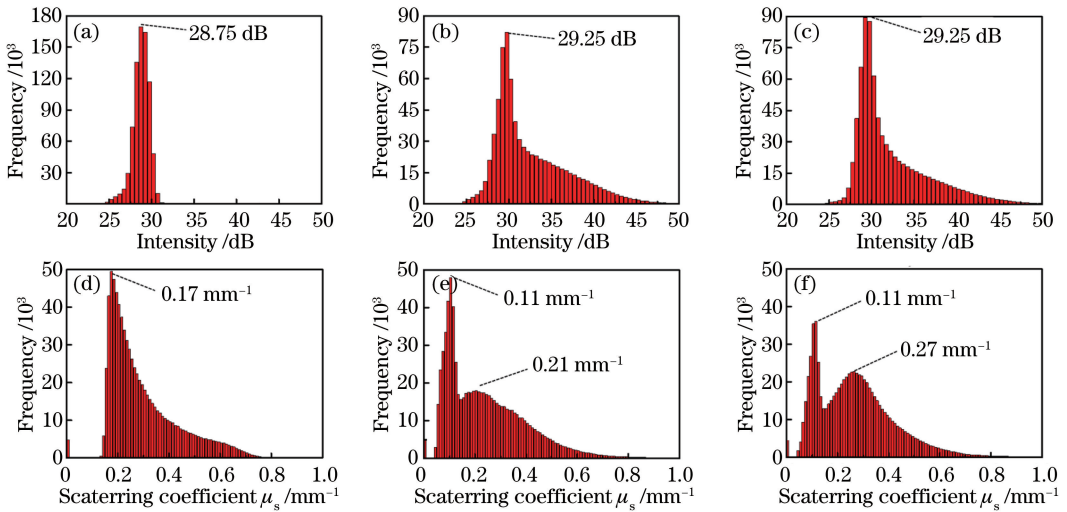


图 7 水凝胶支架的信号强度与散射系数分布直方图。(a) PBS 缓冲溶液的信号强度分布;(b)无细胞的支架的信号强度分布;(c)含细胞的支架的信号强度分布;(d) PBS 缓冲溶液的散射系数分布;(e)无细胞的支架的散射系数分布;(f)含细胞的支架的散射系数分布

Fig. 7 Histogram of signal intensity and scattering coefficient of hydrogel scaffold. (a) Intensity distribution of the PBS buffer solution; (b) intensity distribution of cell-free scaffold; (c) intensity distribution of cell-containing scaffold; (d) scattering coefficient distribution of PBS buffer solution; (e) scattering coefficient distribution of cell-free scaffold; (f) Scattering coefficient distribution cell-containing scaffold

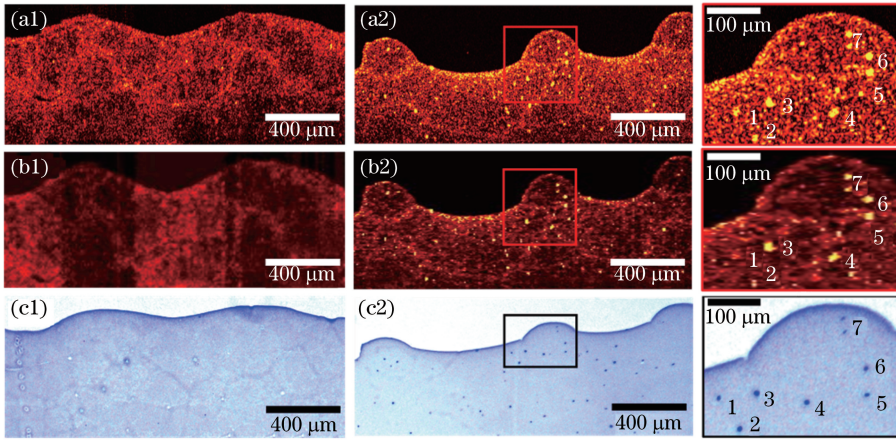


图 8 水凝胶支架的 OCT 强度图像、散射图像与 H&E 染色切片结果对比。(a1)无细胞水凝胶支架的 OCT 强度图像;(a2)细胞负载水凝胶支架的 OCT 强度图像;(b1)无细胞水凝胶支架的散射图像;(b2)细胞负载水凝胶支架的散射图像;(c1)无细胞水凝胶支架染色切片图;(c2)细胞负载水凝胶支架染色切片图

Fig. 8 Comparison of OCT intensity images, scattering images and H&E stained sections for hydrogel scaffolds. (a1) OCT intensity image of cell-free hydrogel scaffold; (a2) OCT intensity image of cell-containing hydrogel scaffold; (b1) scattering image of cell-free hydrogel scaffold; (b2) scattering image of cell-containing hydrogel scaffold; (c1) stained sections image of cell-free hydrogel scaffold; (c2) stained sections image of cell-containing hydrogel scaffold

图 8(b2)为对应的散射系数分布图像,图 8(c1)和图 8(c2)为对应的切片结果,图 8(c1)中水凝胶呈浅蓝色,图 8(c2)中细胞经染色剂染色后呈深蓝色,能明显观察到细胞在水凝胶中的分布情况。图 8(a2)中的光斑数量明显比图 8(b2)中的多,而通过与图 8(c2)对比可知,图 8(a2)中的光斑并非全是细胞,也

可能是材料,图 8(b2)与图 8(c2)具有更强的对应关系。通过对比 OCT 强度图像、深度分辨散射系数分布图像和切片图可知:OCT 强度图像的分辨率和对比度足以用于区分细胞和水凝胶材料,但区分度不高,且存在对细胞的误判情况;相比之下,通过深度分辨散射系数分布图像能更好地区分细胞和水凝

胶支架材料,从散射特性来看对比更明显。这验证了通过 OCT 深度分辨散射系数计算方法检测细胞分布的准确性与可行性。图 8(a) OCT 图像与染色图中 1~7 的标号一一对应,但由于切片过程支架发生收缩变形,以及 B-Scan 扫描位置与切片的位置实际存在一定的角度误差,OCT 图中的亮点与染色图中的细胞无法完全对应。相比于切片的破坏性,OCT 的无损、实时高分辨率的优点使其能够直观地显示组织工程支架内细胞的分布情况。

4 讨 论

光学散射系数 μ_s 是通过 OCT 信号的纵向衰减曲线拟合散射模型得到的,散射模型主要包括单次散射模型以及多次散射模型。多次散射模型^[25-26] 包含浅层散射与深层散射以及两者的相干项,且含有散射系数以及散射角的均方根这两个未知参数,对于该模型,难以解得散射系数关于深度的解析解。本文采用的深度分辨散射系数计算方法是在入射到样品光的功率和样品穿透深度已知的前提下进行的,通过对单散射模型求解散射系数与深度的解析解,得到深度分辨散射系数的计算方程,将每个采样点对应一个散射系数,可获得散射系数分布图像。多层散射介质的实验结果表明(图 2),基于单散射模型的深度分辨散射系数计算方法能够准确地计算得到均匀和分层异构的散射系数,不需要进行复杂的分割,且与 Mie 散射和传统散射检测结果一致,证明了该方法的有效性。

必须指出,本文设计的多层散射样品存在一些不合理的地方,例如 glass 属于强透光介质而非散射介质。由于 PS 微球和 Intralipid 的液体特性,采用两者构建的多层散射样品很难在深度方向进行有效分开,本文选用 glass 来隔断两种不同散射系数的样品(PS 微球和 Intralipid)实非不得已,但由于 glass 具有非散射特性,采用本文提到的计算方法对 glass 部分的深度分辨散射系数进行计算不合理,计算的 glass 部分的散射系数仅反映该位置出现了强烈得反射信号,而不能算作 glass 部分的散射系数。每层 glass 的散射系数不一致,第二层 glass 以下的深度范围较第一层 glass 更低。由(3)式可知,第二层 glass 以下的光功率之和较第一层更小,这导致计算的散射系数较第一层 glass 的更大。同理第三层 glass 以下的深度范围较第二层 glass 更低,功率之和更小,计算的散射系数较第二层的更大。因此三层 glass 的散射系数与第二层不同,总体是随着

层数的增加逐渐变大。图 2(c)中 Intralipid 的散射系数起伏较大,这是由于 Intralipid 中大豆油和卵磷脂等散射粒子具有不同的散射系数且大小不均匀,从而导致散射界面不均匀,该差异在散射曲线中较为明显,表现为较多的尖峰。

关于“在纵向扫描末端,可用于散射系数计算的像素数较少,散射系数的计算误差偏大”这一问题,Omatsud 等^[27]对纵向扫描末端散射系数的高估作了相应优化,通过拟合系统噪声信号,得到噪声信号的多项式方程,在之后的样本成像过程中,利用该多项式在纵向扫描末端将深度信号扩展至更深的位置。扩展出的部分信号经(3)式计算后可使样品以下的光功率之和增大,因此样品散射系数的计算结果比根据未扩展的深度信号计算的散射系数小。考虑到构建的谱域 OCT 系统对细胞悬液、细胞负载水凝胶支架的成像深度有限(800 pixel,约为 2.8 mm),本文在计算深度分辨散射系数时,对纵向扫描末端的散射系数进行了截取,只显示了纵向 1~800 pixel 的散射系数分布。

实验中,聚焦点在样品表面时,系统信噪比降低,由于光束在样品内部发生了散焦,背景噪声强,可能导致计算的散射系数偏小。Smith 等^[28]指出当光束聚焦在样品表面时,聚焦点深度变化不会影响散射系数的测量,但是聚焦在表面,系统信噪比降低可能会导致散射系数测量值偏小。同时,Smith 等^[28]还指出当聚焦点在散射样本内部时,随着聚焦点的深度加深,由于样品内部的光路散焦问题,聚焦深度加深能量损失增大,测量的信号功率变小,导致散射系数逐渐减小,因此必须考虑共焦函数来防止计算的散射系数不准确。对于细胞悬浮液、细胞负载水凝胶支架等细胞类样品,采用 OCT 系统探测时,光在样品内部可能发生多次散射。单次散射模型未包含多次散射光的影响,具有一定的局限性;多次散射模型包含了多次散射项,并且考虑了散焦的影响,将多次散射模型与共焦函数相结合,可用于计算更准确的深度分辨散射系数,但多次散射模型的计算解析复杂,需要进一步探索多次散射模型的深度分辨散射系数的解析方法。

利用细胞悬浮液的 OCT 成像实验验证根据深度分辨散射系数分布图分析细胞浓度的可行性,图 3 中细胞、细胞团块以及两者共混构成了三层分布的结构,从 OCT 强度图和散射图可观察到,随着细胞浓度的增加,明亮区域变得越密集,同时未消化完全的细胞团块越大,光斑越亮。随着深度加深,

OCT 信号逐渐衰减,因此 OCT 强度图像[图 3(a1)~(a4)]灰度值逐渐降低,而散射系数[图 3(b1)~(b4)]只与散射介质(细胞)本身有关,并不随着深度的增加而衰减。OCT 强度图和散射图能直观显示细胞浓度的变化,但无法具体表征出细胞浓度的变化趋势,为进一步量化细胞的浓度,统计 OCT 强度图像上的每个强度值以及散射图像上的每个散射系数。由直方图(图 4)和直方图分析(图 5)可知:不同浓度细胞悬浮液的 OCT 信号强度分布直方图无明显变化;散射系数分布直方图由原始的背景峰变为双峰,并且随着细胞浓度升高,背景峰向左移动,肩型特征峰向右移动,且肩型特征峰与背景散射特征峰的偏离程度与细胞浓度呈线性关系。该偏离程度表示细胞特征散射系数与背景散射系数之间的差值,随着细胞浓度的增加,细胞悬浮液中可能聚集的细胞团块更多,团块体积更大,导致代表细胞的特征散射系数整体增大;同时,细胞分布得越密集,细胞悬浮液 A-Scan 中背景以下信号的光功率之和越高,根据(3)式可知,计算得到的培养基背景散射系数越小。因而,细胞浓度的增加使得细胞对背景抑制的作用越强,图 5(b)中显示的特征峰的间距越大。

生物三维打印细胞负载水凝胶支架是含有水凝胶材料、单细胞、不同大小的细胞团块等多种散射体混合物,细胞的随机分布以及团块的大小等不确定因素导致使用传统整体散射系数计算方式得到的结果不可靠,本文的深度分辨散射系数计算方法不需要在局部分割出均匀区域进行拟合,可以用来检测及量化细胞在水凝胶支架中的分布。生物三维打印支架的 OCT 强度图像中材料和细胞的灰度相近,容易造成细胞识别出错[图 6(a1)~(a2),图 8];而在散射图像中,散射系数与细胞团块的直径密切相关,细胞团块直径越大,散射系数越大,且不受细胞

团块的深度位置的影响,细胞与材料的对比度更好,细胞分布识别更准确[图 6(b1)~(b2),图 8],且通过对比 H&E 染色切片图论证了该结论(图 8)。

图 7 进一步统计分析了生物三维打印水凝胶支架的信号强度与散射系数,其直方图分析结果与 3.2 节的图 4 一致,无细胞的水凝胶支架与细胞负载水凝胶支架的强度分布没有明显差异,而散射系数分布直方图中存在与水凝胶材料、细胞相关的特征峰。对比培养基的强度分布直方图[图 4(a1)],PBS 溶液的强度分布直方图[图 7(a)]并不完全符合高斯分布,这可能是因为在成像过程中采集的信号被平均的次数较多;而培养基与 PBS 溶液的散射系数分布直方图[图 4(b2),图 7(d)]没有差别,这进一步说明了强度分布结果可能会因人为因素而不准确,散射系数分布图可准确识别不同散射特性的介质,基本不受人为因素的影响。生物三维打印水凝胶支架的强度分布直方图和散射系数直方图的峰值数值如表 1 所示,背景峰峰值处的散射系数值[图 7(e),7(f)]比三种浓度的细胞悬浮液的[图 4(b2)~(b4)]都要小。这可能因为悬浮在培养基中的细胞具有一定的分散性,而水凝胶是凝胶状固体,比纯培养基的光功率之和更大,对背景的抑制也更强;也可能因为细胞特征散射系数(约为 0.27 mm^{-1})大于水凝胶材料的散射系数(约为 0.21 mm^{-1}),大于背景培养基的特征散射系数(约为 0.17 mm^{-1}),水凝胶材料与细胞的散射系数对比低于培养基与细胞的散射系数对比。分析深度分辨散射图及散射系数分布直方图可以发现细胞在三维模型中的一些分布规律,但在实际工程化组织的生长发育过程中,影响细胞生长变化的因素更多,需要在不同天数或者不同浓度下进行连续监测,因此下一步可对培养不同天数的支架的散射系数分布作深入的研究。

表 1 分布直方图频数峰值处的强度和散射系数及其标准差

Table 1 Intensity and scattering coefficient, and their standard deviation at the peak of frequency of histogram

Sample	Intensity /dB	Scattering coefficient μ_s/mm^{-1}	
		Background peak	Characteristic peak
PBS buffer solution	28.7500(0.0000)	0.1700(0.0000)	0.0000(0.0000)
Cell-free hydrogel scaffold	29.2500(0.0000)	0.1150(0.0070)	0.2150(0.0070)
Cell-containing hydrogel scaffold	29.2500(0.0000)	0.1125(0.0050)	0.2700(0.0294)

5 结 论

本文采用自主搭建的 OCT 系统对细胞样本进行成像,基于 OCT 干涉光谱信号计算的深度分辨散射系数量化细胞浓度以及表征生物三维打印支架

内的细胞分布。通过自制的多层散射介质模型验证了所提方法的准确性。细胞浓度越高对背景散射的抑制越强,散射系数分布直方图的背景峰和特征峰对应的散射系数之差和细胞浓度具有线性关系。研究发现,通过散射图像能够区分细胞和水凝胶材料,

两者之间的散射对比相比强度对比更明显,细胞分布识别更准确,同时采用 H&E 染色图验证了该方法在细胞分布识别方面的准确性。基于 OCT 深度分辨散射系数分析方法有望实现三维组织模型中细胞生长情况的无损、实时在线、免标记的检测以及表征。

参 考 文 献

- [1] Thevenot P, Nair A, Dey J, et al. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds[J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2008, 14(4): 319-331.
- [2] Zhao Y B, Yang Y, Wang R K, et al. Optical coherence tomography in tissue engineering [M] // Drexler W., Fujimoto J. *Optical coherence tomography*. Cham: Springer, 2015: 1965-2001.
- [3] Masters B R, So P T C, Gratton E. Multiphoton excitation microscopy of *in vivo* human skin: functional and morphological optical biopsy based on three-dimensional imaging, lifetime measurements and fluorescence spectroscopy[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 838(1): 58-67.
- [4] Wäldchen S, Lehmann J, Klein T, et al. Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15348.
- [5] Chen Z J, Yang S H, Xing D. Progress and application of photoacoustic microscopy technique [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45 (3): 0307008.
陈重江, 杨思华, 邢达. 光声显微成像技术研究进展及其应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307008.
- [6] Constantinidis I, Stabler C L, Long R, Jr, et al. Noninvasive monitoring of a retrievable bioartificial pancreas *in vivo* [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 961(1): 298-301.
- [7] Liang X, Graf B W, Boppart S A. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(11): 643-655.
- [8] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography [J]. *Science*, 1991, 254 (5035): 1178-1181.
- [9] Bagnaninchi P O, Holmes C, Tabrizian M. Monitoring cells in engineered tissues with optical coherence phase microscopy: optical phase fluctuations as endogenous sources of contrast [J]. *Proceedings of SPIE*, 2013, 8580: 85800E.
- [10] Holmes C, Tabrizian M, Bagnaninchi P O. Motility imaging via optical coherence phase microscopy enables label-free monitoring of tissue growth and viability in 3D tissue-engineering scaffolds [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, 9(5): 641-645.
- [11] Tan W, Sendemir-Urkmez A, Fahrner L J, et al. Structural and functional optical imaging of three-dimensional engineered tissue development [J]. *Tissue Engineering*, 2004, 10(11/12): 1747-1756.
- [12] Yang Y, Sule-Suso J, Haj A J E, et al. Use of OCT to study tumor cell growth in 3D membranes [J]. *Proceedings of SPIE*, 2004, 5486: 154-160.
- [13] Li J H, Chen C S, Chen B L, et al. Quantitative discrimination of NPC cell lines using optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2012, 5(7): 544-549.
- [14] van der Meer F J, Faber D J, Aalders M C G, et al. Detection of apoptosis by optical coherence tomography (OCT) [J]. *Proceedings of SPIE*, 2001, 4251: 165-169.
- [15] van der Meer F J, Faber D J, Aalders M C G, et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography [J]. *Lasers in Medical Science*, 2010, 25 (2): 259-267.
- [16] de Bruin D M, Broekgaarden M, van Gemert M J C, et al. Assessment of apoptosis induced changes in scattering using optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, 9(9): 913-923.
- [17] Gu K, Hou K L, Shen J Q. Measurement and analysis on backward scattering of microparticles illuminated by Gaussian beam [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(9): 0904003.
顾侃, 侯科良, 沈建琪. 高斯光束照射下微米颗粒的后向散射测量与分析 [J]. *中国激光*, 2019, 46(9): 0904003.
- [18] Si P J, Wang L, Xu M E. Tumor cell invasion imaging based on optical coherence tomography [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(9): 0907003.
斯培剑, 王玲, 徐铭恩. 基于光学相干层析成像技术的肿瘤细胞侵袭成像 [J]. *中国激光*, 2019, 46(9): 0907003.
- [19] Yang Y, Wang T H, Biswal N C, et al. Optical scattering coefficient estimated by optical coherence tomography correlates with collagen content in ovarian tissue [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(9): 090504.
- [20] Zhang Q Q, Wu X J, Tang T, et al. Quantitative analysis of rectal cancer by spectral domain optical coherence tomography [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2012, 57(16): 5235-5244.
- [21] Vermeer K A, Mo J, Weda J J A, et al. Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation

- coefficients in optical coherence tomography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(1): 322-337.
- [22] Wang K, Ding Z H, Wang L. Measuring tissue optical properties by optical coherence tomography [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, 37(3): 523-527.
王凯, 丁志华, 王玲. 基于光学相干层析术的组织光学性质测量[J]. *光子学报*, 2008, 37(3): 523-527.
- [23] Plass G N. Mie scattering and absorption cross sections for absorbing particles [J]. *Applied Optics*, 1966, 5(2): 279-285.
- [24] Yang Y, Dubois A, Qin X P, et al. Investigation of optical coherence tomography as an imaging modality in tissue engineering [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2006, 51(7): 1649-1659.
- [25] Thrane L, Yura H T, Andersen P E. Analysis of optical coherence tomography systems based on the extended Huygens-Fresnel principle [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2000, 17(3): 484-490.
- [26] Zhen J, Wang Y, Wang C G, et al. Research on the structure and optical parameter changes of port wine stain after photodynamic therapy based on optical coherence tomography [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2015, 42(6): 0604001.
甄洁, 王颖, 王成铭, 等. 应用光学相干层析术研究光动力治疗鲜红斑痣前后皮肤结构和光学参数的变化[J]. *中国激光*, 2015, 42(6): 0604001.
- [27] Hohmann M, Lengenfelder B, Kanawade R, et al. Extension of depth-resolved reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography for slim samples [J]. *Proceedings of SPIE*, 2015, 9792: 97920P.
- [28] Smith G T, Dwork N, O'Connor D, et al. Automated, depth-resolved estimation of the attenuation coefficient from optical coherence tomography data [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2015, 34(12): 2592-2602.