

用于成像性能测试的荧光发光模拟系统

李晨梦¹, 邵鹏飞¹, 吴柄萱¹, 孙明斋², 姚鹏¹, 申书伟², 刘鹏^{2**}, 徐晓嵘^{1,2*}¹中国科学技术大学精密机械与精密仪器系, 安徽 合肥 230027;²中国科学技术大学苏州高等研究院, 江苏 苏州 215123

摘要 荧光成像仪器的成像性能测试对于提高仪器的性能和临床转化成功率具有重要意义, 成像性能测试的标准化需要一种可以精确模拟荧光光谱的长期稳定的样品作为测试工具。本团队提出了一种荧光发光模拟系统, 该系统可以模拟荧光样品的激发效率、荧光发射谱特性和荧光空间分布特性, 可以替代真实的荧光剂仿体对荧光成像类仪器进行量化表征。该系统采用的是基于线性滤光片和液晶显示器的光谱模拟方法。本团队还设计了一种改进的最小二乘光谱拟合算法, 该算法可以自动模拟任意荧光发射谱。使用该系统模拟了近红外荧光造影剂吲哚菁绿(ICG)的发光特性, 并对不同荧光成像仪器的成像灵敏度进行了测试。实验结果表明, 所设计的荧光发光模拟系统可以稳定精准地模拟荧光样品的发光特性。

关键词 光谱学; 荧光发光模拟; 光谱拟合; 近红外荧光成像; 成像性能测试; 吲哚菁绿

中图分类号 R318

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2407204

1 引言

荧光分子成像作为一种靶向成像技术在生物医学领域得到了越来越广泛的应用^[1-2]。不同荧光成像系统硬件和软件上的不同设计导致了仪器间成像性能的差异^[3]。不同于放射成像, 荧光成像目前还没有成熟的对成像仪器性能进行检测的规范和标准^[4-5]。在放射成像领域, 国际电工委员会(IEC)和美国电气制造商协会(NEAM)已经发布了一系列质量控制手册, 并将其作为核磁共振成像/电子计算机断层扫描/正电子发射计算机断层扫描(MRI/CT/PET)成像仪器性能检测与评估的标准。2006年, 中华人民共和国卫生部也发布了《医用核磁共振成像(MRI)设备影像质量检测与评价规范》, 并将其作为MRI成像仪器性能检测与评估的标准^[6]。仿体是标准化成像性能测试中的常用工具, 最初被用于医学物理学和健康物理学^[7]。不同于人体组织, 仿体有预设的形状和对比度, 可以长期模拟特定的组织参数。这些特性使得仿体可以用于测量、评估和确认成像仪器的性能^[8-11]。

吲哚菁绿(ICG)是目前唯一被美国食品药品监督管理局(FDA)认证的可用于临床的近红外荧光造影剂, 因此, 对近红外荧光仿体的研究通常是围绕 ICG 成像展开的。最常用的近红外成像性能测试方法是 ICG 分散在液态^[12]或固态^[13-14]介质中的荧光剂样品

中进行测量。直接用 ICG 作为仿体造影剂的优势是可以精准地测试成像仪器的光谱响应, 但是由于 ICG 在水中会随着时间延长而聚合^[15]和降解^[16-17], 荧光的强度和光谱特性会随之改变^[18-19]; 而且, ICG 的荧光在非避光环境下或者长时间使用后会因为光漂白而淬灭。这些特性使得 ICG 仿体非常不稳定, 无法长期使用。Sevick-Muraca 团队^[20]用量子点 Qdots800 代替 ICG 制备了仿体。相较于传统的荧光剂, 量子点的荧光发射光谱可调、荧光寿命长、荧光强度高^[21-23], 最重要的是量子点的荧光稳定性高^[24], 量子点荧光仿体可以长期使用^[25]。为了促进荧光影像标准的建立, Sevick-Muraca 团队^[26]还在量子点研究的基础上提出了一种可溯源到国际标准(SI)单位的近红外成像设备的性能测试方法。Ntziachristos 团队^[27]设计了一种用于荧光成像性能测试的综合仿体, 并在综合仿体的基础上提出了一种近红外荧光成像性能测试的标准化方法^[4]。量子点的斯托克斯位移较大, 任何波长小于荧光波长 10 nm 的激发光源都可以激发量子点, 而 ICG 的斯托克斯位移很小, 吸收谱和发射谱有重叠, 量子点仿体无法精确地模拟荧光团的光谱特性, 导致成像系统对量子点仿体的成像响应与对真实荧光团的成像响应之间存在偏差, 故而使用量子点仿体测量的结果无法反映真实的荧光成像效果。针对这一问题, Pogue 团队^[28]将 IR-125 作为荧光剂, 制作了模拟 ICG

收稿日期: 2022-07-15; 修回日期: 2022-08-10; 录用日期: 2022-08-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2401402)

通信作者: *xux@ustc.edu.cn; **lpeng01@ustc.edu.cn

荧光特性的仿体。IR-125具有与ICG高度相似的吸收谱与发射谱,同时具有比ICG稳定性更好的荧光光谱^[29];但是,IR-125本质上是一种荧光团,荧光团和量子点的光漂白性会使荧光淬灭^[30],而且随着使用时间和使用次数增加,荧光团的荧光强度会逐渐降低,仿体的测试结果也将发生改变。

电子发光器件相对于材料而言具有发光稳定的优势,因此,使用电子器件进行模拟可以获得长期稳定的光学参数。为了实现快速和定量的成像性能测试,Salter团队^[31]使用激光扫描生成二维和三维荧光图案,激光生成的荧光图案可以测量横向分辨率、照明均匀性、透镜畸变等。Xu等^[32]使用高保真度的高光谱图像投影仪(HIP)搭建了一套数字组织仿体(DTP)平台,该平台可以重建组织高光谱成像时的光谱特性;同时,Xu等验证了使用DTP进行光谱成像设备定量校准、评估和优化的可行性。在荧光成像性能标准化测试方面,目前还缺少一种可以充当测试工具且能够精确模拟荧光光谱的长期稳定的系统。

本团队设计了一套荧光发光模拟系统,该系统可以模拟荧光样品的激发效率、荧光发射谱特性以及荧光的空间分布特性,可以替代真实的荧光剂仿体对荧光成像仪器进行量化表征。该系统根据检测到的激发光强度控制出射荧光的强度,以模拟荧光剂样品的荧光激发效率;同时,该系统基于积分球的光学出入口设计模拟出射荧光的空间分布。本团队还提出了一种基于线性滤光片(LVF)和液晶显示器(LCD)的光谱模拟方法,并设计了一种改进的最小二乘光谱拟合法,该算法可以自动模拟任意荧光光谱。与传统荧光剂相比,荧光发光模拟系统可以稳定精准地模拟荧光的发光特性。荧光成像灵敏度的测试结果验证了所设计的荧光发光模拟系统作为标准化测试工具的可行性。

2 系统设计

荧光发光模拟系统的设计目标是使用荧光成像系统对其成像时能达到与对荧光团成像相同的成像响应。影响成像系统响应的主要因素有荧光的激发效率、空间分布及光谱特性。其中的荧光激发效率是荧光样品的本征参数,表征了荧光样品在特定情况下发射荧光的能力。荧光剂一般能溶于水或其他介质。成像时,激发光照射介质后发生散射,之后被荧光团吸收发射出荧光,荧光光子发射的方向是不确定的,经过介质时也会发生散射,因此,荧光最终朝空间的各个方向出射。因为荧光团在发射荧光时无论电子被激发到哪一个能级,荧光的产生都是从第一单重激发态的最低振动能级开始的,所以荧光有一个发射带^[33]。在一定的测试条件下,当荧光成像系统对荧光剂成像时,荧光激发效率决定了荧光发射的光子数,荧光的空间分布决定了荧光在各个方向上的光子密度,荧光光谱决定了荧光团发射的光子的波长分布。由于相机有一定的

视场角,采集的是一定空间角内出射的光子,不同的成像传感器对不同波长的光子有不同的响应,所以在荧光成像时荧光剂的荧光激发效率、空间分布和光谱特性是影响荧光成像响应的关键因素。

2.1 荧光模拟方法

2.1.1 荧光空间分布模拟方法设计

荧光模拟系统受激发光照射后出射荧光。对于真实的荧光剂样品而言,激发光的照射和荧光出射同时发生在荧光样品表面,荧光剂样品的激发光入射和荧光出射也应该在同一个区域。同时,荧光模拟系统需要实时探测激发光的强度,以模拟荧光激发效率,故而需要一个具有激发光入口、激发光探测接口、模拟荧光入口及出口,并且出射荧光在空间中均匀分布的光学结构。本文选用基于积分球的设计来实现该光学结构。

2.1.2 荧光激发效率模拟方法设计

量子产率 η 是荧光团分子的本征参数。针对某一种荧光样品,其荧光强度和入射激发光强度的比值为 $k\eta$,其中 k 是由荧光剂的摩尔吸收系数^[33]、样品厚度、样品中荧光剂的浓度决定的系数。对于某一特定荧光剂样品, k 与 η 一样是本征参数, $k\eta$ 为样品的荧光激发效率。荧光发光模拟系统的荧光激发效率的模拟方法是:根据照射到荧光剂的激发光的光强发射荧光,并控制荧光强度和激发光强度的比值为 $k\eta$ 。

2.1.3 荧光光谱模拟方法设计

荧光剂发光模拟系统因要模拟有特定光谱特性的荧光出射,其光源应为光谱可调光源,以实现光谱模拟。本文的光谱模拟选用光谱振幅调制的方法,即:先对光谱的光源进行分光,使不同波长的光获得某种空间分布,然后根据目标光谱对不同波长的光进行幅度调制。

1) 分光方法设计

本文提出的荧光发光模拟系统主要用于模拟近红外荧光,因此需要在空间上实现近红外波段的光谱。线性渐变滤光片^[34]是继光栅、棱镜之后发展起来的一种新型的分光元件。线性渐变滤光片之所以被称为“线性”是因为其不同位置的滤光特性不同,而且其滤光特性随着空间位置呈线性变化。线性滤光片是采用离子束溅射法或离子辅助法等工艺在基底表面镀制多层厚度变化的膜系得到的,因此其光谱特性线性变化。相比于棱镜和光栅等分光元件,线性滤光片具有体积小、质量轻、通带多、通带位置可以任意设计等优点。同时,基于线性渐变滤光片的分光方式具有高稳定性、高集成度和高分辨率等特点,适用于模拟近红外荧光的分光。

2) 光谱幅度调制方法设计

分光之后需要对光谱的幅度(即光谱上不同波长对应的光强)进行调制,以获取目标光谱分布。在对光源分光后,不同波长的光分布在空间中的不同位置。

在不同波长光的传播路线上控制光的透过率,就可以对光谱进行光强调制。

调节光透过率的方法有很多,比如,添加衰减片等光学元件的方法。若要对分光之后的波长随空间位置不同而变化的光进行衰减,就要对衰减片进行设计,使其在不同波长对应的位置有不同的衰减特性。可以采用光刻等方法制备衰减片,但这种方法得到的衰减片只能模拟具有特定形状的光谱。LCD^[35]是一种借助薄膜晶体管驱动的有源矩阵显示器。LCD 的每个像素由悬浮于两个透明电极之间的一系列液晶分子层以及外侧两个偏振方向互相垂直的偏振片组成。通过控制电压可以控制液晶分子排列的扭曲程度,实现 LCD 不同灰度的控制,从而达到不同的光透过率。LCD 可以实现透光率的可编程控制。

本文提出了一种基于线性渐变滤光片和 LCD 的光谱模拟方法。光谱光源通过线性渐变滤光片后随波长有不同的空间分布,之后用 LCD 调制光强,通过 LCD 不同位置的像素灰度控制不同波长光的透过率,就可获得目标光谱分布。

2.2 系统方案设计

根据以上荧光模拟方法设计,本团队提出了一种基于积分球的荧光发光模拟系统,该系统可以检测激发光并主动发射可编程控制的出射光,模拟任意荧光物质的发射光谱特性。图 1 所示为该系统的结构和功能示意图。积分球上有 4 个端口,其中:端口 1 为激发光的入口和荧光的出口,也是具有荧光样品发光特性

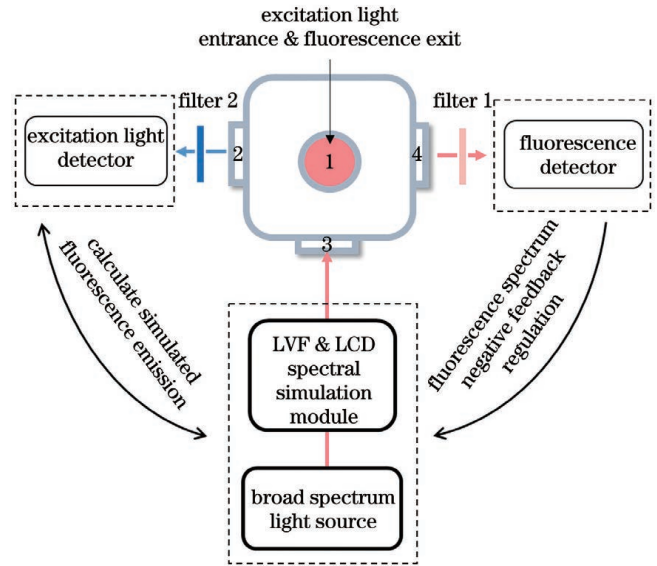


图 1 荧光发光模拟系统结构及功能示意图

Fig. 1 Schematic of structure and function of fluorescence emission simulation system

的端口;端口 2 检测激发光的强度,用于计算出射荧光的强度,模拟荧光样品的荧光激发效率;端口 3 输入具有特定光谱特性的模拟荧光;端口 4 检测模拟荧光的光谱,用于模拟光谱的负反馈调整。

图 2(a)所示为荧光发光模拟系统结构以及光谱模拟示意图。系统由近红外增强光谱光源、准直镜、线性滤光片、近红外偏振片、LCD 面板、积分球、光功率计、光谱仪和控制系统构成。近红外增强光谱光源选

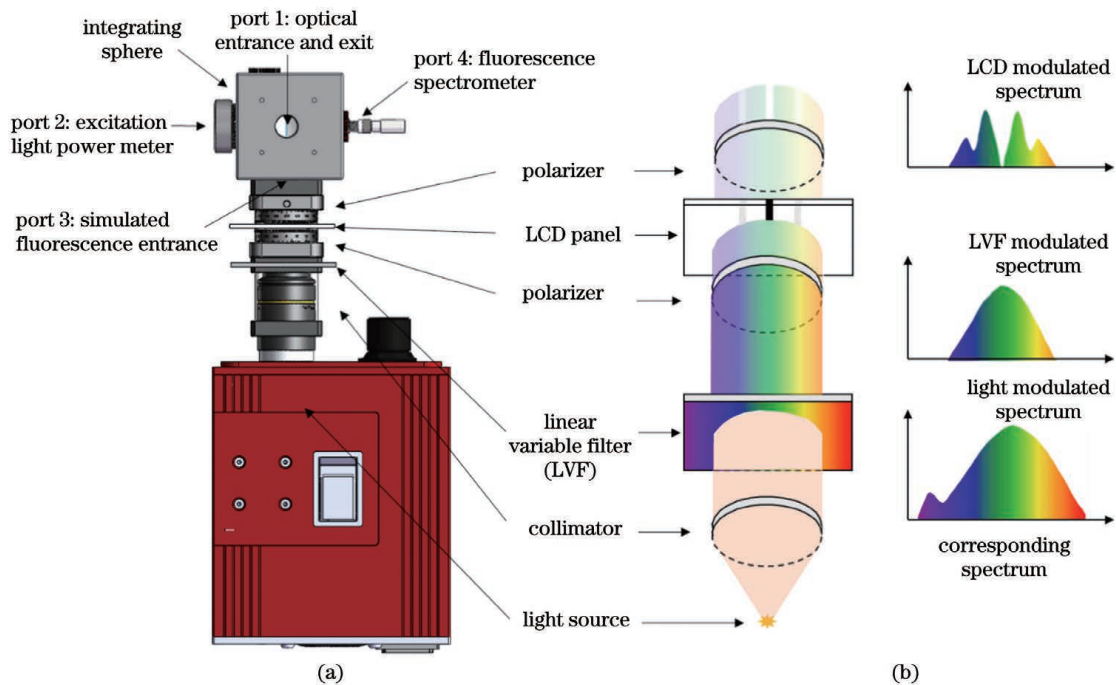


图 2 荧光发光模拟系统。(a) 荧光发光模拟系统示意图;(b) 光谱模拟方法示意图,准直后的宽谱光源先经过线性滤光片分光,然后经过线性偏振片和 LCD 进行幅度调制以模拟目标光谱,之后通过端口 3 入射至积分球

Fig. 2 Fluorescence emission simulation system. (a) Schematic of fluorescence emission simulation system; (b) schematic of spectral simulation method. The collimated broad-spectrum light source is first spatially filtered by a LVF, and then amplitude-modulated with linear polarizers and LCD to simulate target spectrum. The light source is incident into integrating sphere through port 3

用宽带卤素光纤照明光源 OSL21R, 使用 150 W、3200 K 卤素灯泡, 其典型波长范围为 400~1750 nm, 带有铝膜反射镜(以加强红外性能)。光源接口处连接 7524MM 准直镜头, 用于将光源发出的光准直。准直后的光入射到 Edmund # 88-366 线性滤光片, 滤光片的波长范围为 550~1000 nm, 尺寸为 60 mm × 12.0 mm × 2.5 mm, 最大透过率大于 90%, 光密度(OD)值大于等于 4, 半高带宽为 7~20 nm, 滤光片波长的线性变化率为 7.5 nm/mm。光通过线性滤光片后入射至由两片 FLP20-NIR 线性偏振片与 RV059FBBN80 LCD 面板组成的液晶显示光谱幅度调制模块, LCD 面板的分辨率为 1620 pixel × 2560 pixel。经液晶显示面板进行光谱幅度调制后, 具有目标荧光剂光谱特性的光入射到 IS200-4 积分球的一个端口。积分球的一个端口连接 S121C 光功率计

探头, 探测从积分球顶部端口入射的激发光强度并传回至控制系统, 用于控制出射荧光的强度; 积分球的另一个端口连接 QE Pro 光谱仪, 检测出射荧光光谱并传回控制系统, 用于出射荧光光谱的负反馈调节。

2.3 光谱模拟算法

图 2(b)展示了荧光的光谱模拟过程。宽谱光源透过线性滤光片后, 出射光的波长在宽度方向上随着空间位置呈线性变化, 之后出射光经过 LCD 进行幅度调制。幅度调制的方法是控制 LCD 像素的灰度从而控制对应入射光的透过率。每一列透射光均为子光谱, 控制系统的每一列像素全开(即灰度为 255)可以对每一列像素对应的子光谱进行采样, 调制子光谱并将子光谱叠加即可获得目标光谱。光谱模拟算法就是根据要模拟的目标光谱计算出 LCD 每一列所对应的灰度值。图 3 为光谱模拟算法示意图。

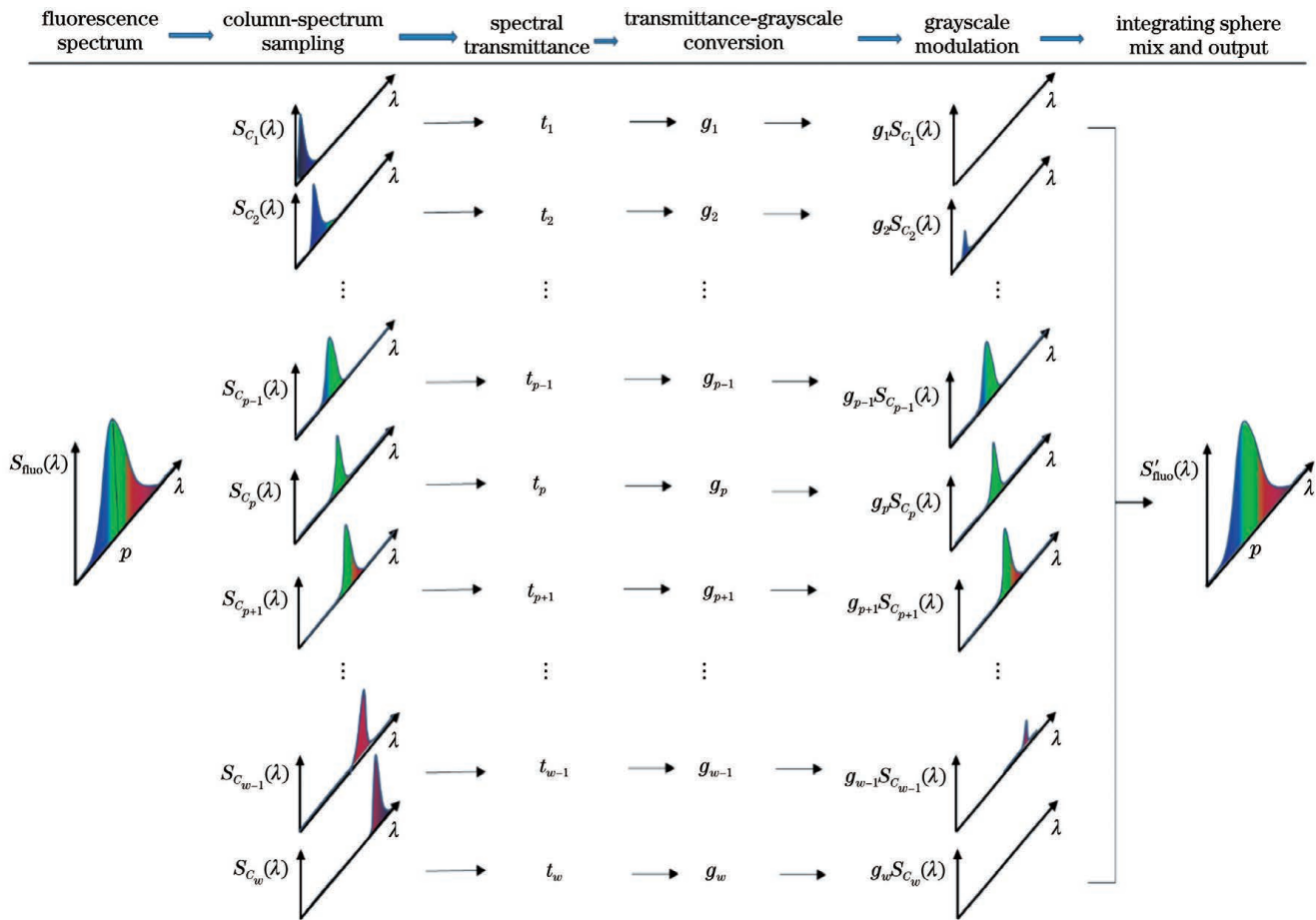


图 3 基于最小二乘曲线拟合的光谱模拟算法示意图

Fig. 3 Schematic of spectral simulation algorithm based on least squares curve fitting

光谱模拟算法整个过程为: 输入要模拟的目标光谱 $S_{fluo}(\lambda)$, 对系统宽谱光源进行采样和调制, 获得模拟目标光谱的模拟荧光。光源通过线性滤光片后入射至 LCD 面板, LCD 的每一列像素对应控制宽谱光源的一个子光谱的透过, LCD 像素列的灰度范围为 $[0, 255]$ 。灰度为 0 时, LCD 像素为黑色, 此时光不通过, 透过率 $t=0$; 当灰度值为 255 时, LCD 像素全开(为透明), 透过率为 $t=1(100\%)$ 。第 n 列像素全打

开时的透过子光谱为 $S_{C_n}(\lambda)$, 对每列 LCD 全开时对应的子光谱进行采样获得用于模拟目标光谱的所有子光谱 $S_{C_1}(\lambda), S_{C_2}(\lambda), S_{C_3}(\lambda), \dots, S_{C_{w-1}}(\lambda), S_{C_w}(\lambda)$, 其中 w 为 LCD 面板的宽度, 即面板上像素的总列数。LCD 显示面板的像素为 1620×2560 , 所以 $w=2560$ 。将第 n 列像素的光谱透过率与灰度值之间的关系定义为 $t_n = t(g_n)$, 则透过 LCD 得到的入射光光谱为

$$S'_{\text{fluo}}(\lambda) = \sum_{i=1}^w t(g_i) S_{C_i}(\lambda). \quad (1)$$

为获得与目标光谱相同的光谱分布,应有

$$S'_{\text{fluo}}(\lambda) = S_{\text{fluo}}(\lambda). \quad (2)$$

式(2)可用线性最小二乘曲线拟合来求解。 $t(g_n)$ 是求解得到的第 n 个子光谱的权重,即透过率 t_n ,则第 n 列像素的灰度值应为

$$g_n = g(t_n) = f^{-1} [t(g_n)]. \quad (3)$$

$g(t_n)$ 为灰度-透过率关系,由 LCD 的特性决定,可测量获得。之后,将灰度值 g_n 映射到 $[0, 255]$ 并控制面板显示,完成光谱拟合。图 4 所示为最小二乘光谱拟合算法流程图。

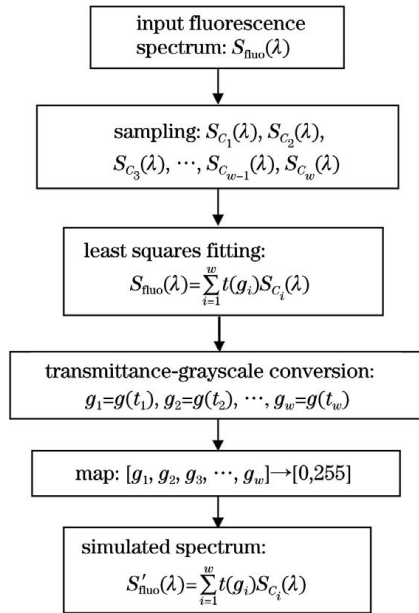


图 4 基于最小二乘曲线拟合的光谱模拟算法流程图

Fig. 4 Flowchart of spectral simulation algorithm based on least squares curve fitting

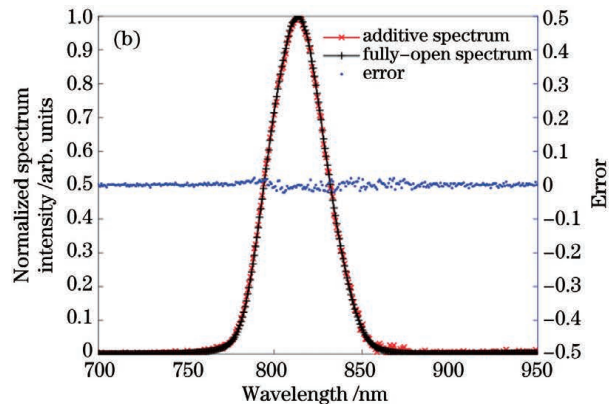
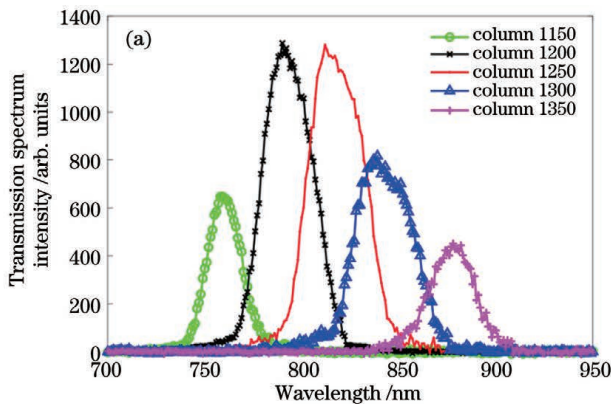


图 5 系统子光谱线性相加性。(a) 系统像素列透过光谱采样结果示例;(b) 系统光谱线性相加性验证结果,其中 additive spectrum 为像素列逐列打开后测得的子光谱的相加结果,fully-open spectrum 为像素列全开时测得的透过光谱,error 为两种方法得到的光谱的偏差

Fig. 5 Linear additivity of system sub-spectra. (a) Example of system pixel column transmittance spectrum sampling result; (b) verification of spectral linear additivity of the system, where “additive spectrum” is the result of adding sub-spectra of each column, “fully-open spectrum” is transmission spectrum measured when pixel columns are all turned on, and “error” is the deviation between spectra obtained by the above two methods

3 系统性能验证

若要用所提出的发光模拟系统实现基于线性最小二乘光谱拟合算法的光谱模拟,需要保证系统子光谱具有线性相加性,并且需要先测得子光谱的灰度-透过率曲线。

3.1 光谱线性相加性验证

首先对所有的子光谱进行采样。通过程序控制 LCD 每列像素依次打开,打开时灰度值为 255,即全开状态,记录每列像素全开时的透过光谱。由于光谱采样数据过多,图 5(a)中仅展示了 LCD 第 1150、第 1200、第 1250、第 1300、第 1350 列的透过光谱,作为示例。系统的子光谱需要满足线性相加性才能使用所提算法进行光谱模拟。线性相加性是指 LCD 的像素列分别打开获得的子光谱相加得到的结果与 LCD 的像素列同时打开得到的透过光谱是相同的。这里以近红外范围内的光谱相加为例,对系统光谱的线性相加性进行验证。控制 LCD 的像素列从第 1200 列开始到第 1270 列逐列打开,即像素列显示 255 灰度,步长为 1,对每列像素采集全开时的透过子光谱;然后控制 LCD 的第 1200~1270 列全部打开,采集此时的透过光谱。将逐列采集的透过子光谱相加与同时打开采集的光谱进行对比,结果如 5(b)所示。可见,归一化后的拟合误差小于 3%,说明系统具有线性相加性。

3.2 灰度-透过率特性验证

最小二乘拟合得到的子光谱的权重值是光谱的透过率,而光谱的透过率由像素的灰度值控制,要从拟合出的透过率得到像素应该显示的灰度值,需要验证像素列透过子光谱的灰度-透过率特性,并获得灰度-透过率曲线。验证方法为:控制每列像素的灰度值,从 0 到 255 逐渐增加像素列的灰度,记录像素列的不同灰

度值对应的透过光谱, 然后对采集到的数据进行分析。这里定义透过率为某灰度值下透过光谱上某波长的透过光强与灰度为 255 时(即全开时)透过光强的百分比。对不同像素列的透过光谱上的不同波长位置进行取样, 观察灰度-透过率规律。5 个像素列的取样结果如图 6(a) 所示。根据 LCD 的 γ 特性^[36], 推断在近红

外范围内所有像素列的透过光谱上任意波长的灰度和透过率满足同一特定曲线关系。对近红外范围内 100 组波长的透过率数据平均后的曲线进行幂函数拟合, 得到了像素的灰度-透过率曲线 $g(t)$, 如图 6(b) 所示。这样通过最小二乘拟合得到光谱透过率之后就可以计算得到像素列应该显示的灰度值。

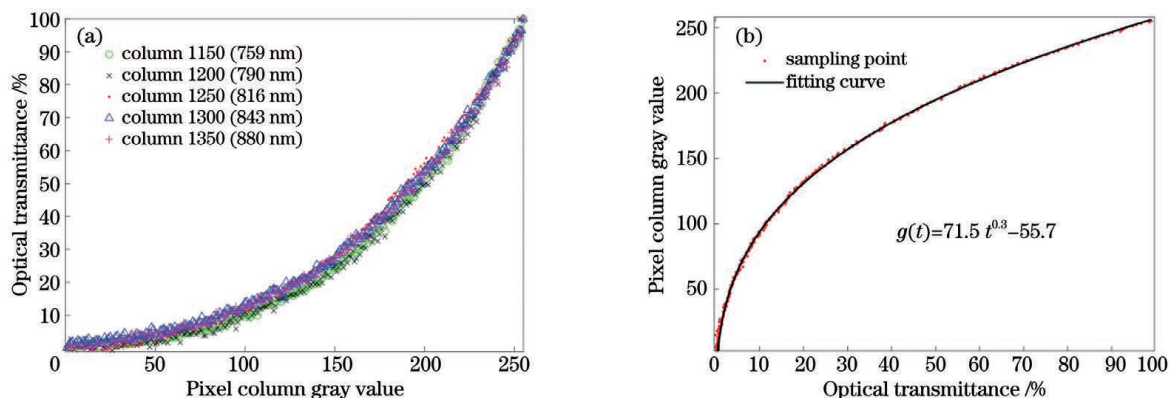


图 6 系统灰度-透过率特性。(a)第 1150、第 1200、第 1250、第 1300、第 1350 列像素透过光谱上不同波长的取样结果;(b)像素列的子光谱灰度-透过率曲线拟合结果

Fig. 6 System gray-transmittance characteristics. (a) Results of sampling at different wavelengths on transmittance spectrum of pixels in columns 1150, 1200, 1250, 1300, and 1350; (b) fitting result of sub-spectral grayscale-transmittance curve of pixel columns

4 系统功能验证

ICG 是唯一被 FDA 认证的可用于临床的近红外荧光造影剂, 因此关于近红外荧光成像仪器性能测试的研究多数是围绕以 ICG 为造影剂的近红外成像进行的。最常用的近红外成像性能测试方法是将 ICG 分散在处于液态或固态介质中的荧光剂样品内进行临床试验前仪器性能的评估, 所以本文荧光发光模拟系统的功能验证也采用此方法。

4.1 ICG 荧光样品的模拟

ICG 的吸收谱和发射谱分布在近红外波段, 其中吸收谱的分布与 ICG 浓度有关, 吸收峰值在约 800 nm 处; ICG 溶液的荧光发射峰在 815 nm 左右; ICG 水溶液的荧光发射强度与浓度有关, 其质量浓度在 0.008 mg/mL 以上继续增加或在 0.008 mg/mL 以下继续降低时, 荧光发射强度都将会逐渐降低。针对目前无法获取具有长期稳定 ICG 荧光发光特性的荧光剂样品的问题, 使用本文提出的荧光发光模拟系统对 ICG 样品进行模拟, 可以得到能精确模拟 ICG 荧光光谱的长期稳定的样品, 并用于荧光成像系统的标准化测试。

首先使用荧光发光模拟系统对 ICG 的荧光发光特性进行模拟。ICG 在水中的溶解度为 128 $\mu\text{mol/L}$, 使用超纯水配制浓度分别为 0、0.3、1、3、10、20、100、200、1000 nmol/L 的 ICG 溶液, 并使用 F7100 分光光度计采集 ICG 水溶液的光谱。向系统输入图 7(a) 所示分光光度计扫描的 ICG 水溶液的荧光光谱, 系统经过计算控制 LCD 面板的灰度, 输出具有 ICG 荧光发

光特性的模拟荧光。图 7(a) 为 ICG 荧光发射光谱特性的模拟结果。将模拟系统输出的模拟荧光光谱进行归一化处理, 然后将归一化的模拟荧光光谱与 ICG 水溶液的荧光光谱进行对比, 结果显示偏差范围为 $-10\% \sim +10\%$ 。

对于不同的荧光样品, 其荧光激发效率可用荧光强度和样品表面激发光强度的比值来模拟。0.008 mg/mL (即 1030 nmol/L) 的 ICG 水溶液对应最高的激发效率。在相同条件下, 当 ICG 水溶液的质量浓度高于或低于 0.008 mg/mL 时, 激发效率都会下降。ICG 荧光灵敏度的研究通常关注较低浓度的 ICG^[3], 所以本文模拟 ICG 荧光时选择浓度为 0.3 ~ 1000 nmol/L。如图 7(b) 所示, 以 20 nmol/L 的 ICG 溶液样品为例, 在其他测试条件不变的情况下改变激发光的强度, 采集对应的荧光图像, 选取荧光图像的兴趣区域 (ROI) 计算荧光的灰度值。调整荧光发光模拟系统输出的模拟荧光的强度, 以获得相同的荧光图像灰度, 此时的输出荧光强度即为荧光样品的荧光强度。其中 ROI 选取的是荧光发光模拟系统的荧光出口在荧光图像上的对应区域。对于不同浓度的荧光样品, 分别测试样品的荧光图像的灰度随激发光强度的变化, 测试结果如图 7(d) 左轴所示。荧光采集仪器有一定的动态范围, 因此, 在 0.3 ~ 1000 nmol/L 浓度范围内, 较高浓度的 ICG 溶液在激发光较强时易过曝, 采集结果集中在较弱的激发光强度范围内, 而较低浓度的 ICG 溶液在激发光强度较低时无法激发出足够产生有效响应的荧光, 采集结果集中在较高的激发光强度范围内。然后用荧光发光模拟系统进行模拟, 控

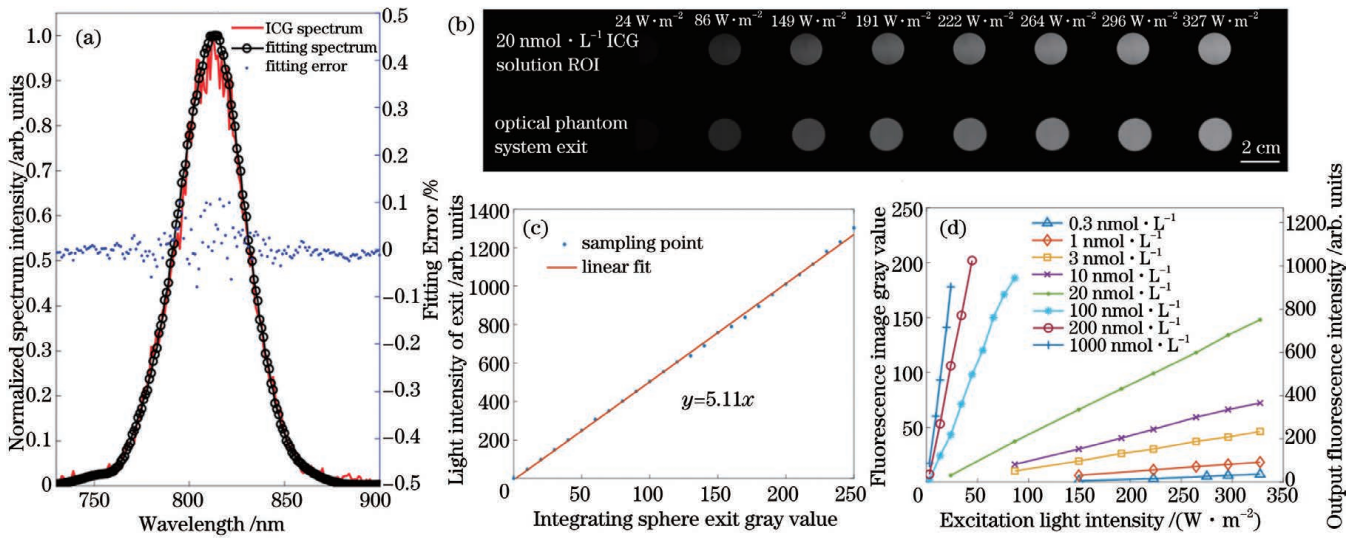


图 7 ICG 荧光模拟。(a) ICG 荧光光谱特性的模拟结果,其中 ICG spectrum 是使用 F7100 分光光度计测得的 ICG 水溶液光谱, fitting spectrum 是荧光发光模拟系统输出的模拟荧光光谱, fitting error 展示了两光谱之间的偏差;(b) 20 nmol/L 荧光溶液样品的荧光激发效率模拟,上排为不同激发光强度下荧光的 ROI 图像,下排为荧光发光模拟系统的模拟荧光图;(c) 荧光发光模拟系统输出光强与荧光图像灰度值之间的关系;(d) 不同浓度荧光剂样品的荧光激发效率模拟,左轴为荧光图像灰度与激发光强度的关系,右轴为荧光发光模拟系统输出荧光强度与激发光强度的关系

Fig. 7 ICG fluorescence simulation. (a) Simulation of ICG fluorescence spectrum, where “ICG spectrum” is measured spectrum of ICG aqueous solution by F7100 spectrophotometer, “fitting spectrum” is simulated fluorescence spectrum output by fluorescence emission simulation system, and “fitting error” shows deviation between the two spectra; (b) fluorescence excitation efficiency simulation of 20 nmol/L ICG fluorescence solution sample, the upper row is ROI image of fluorescence under different excitation light intensities, and the lower row is simulated fluorescence image of fluorescence emission simulation system; (c) relationship between output light intensity of fluorescence emission simulation system and gray value of fluorescence image; (d) fluorescence excitation efficiency simulation of different concentrations of fluorescent agents, left axis is the relationship between gray value of fluorescence image and excitation light intensity, and right axis is the relationship between output fluorescence intensity of fluorescence emission simulation system and excitation light intensity

制模拟荧光输出,以获得相同的灰度。对于荧光发光模拟系统而言,如图 7(c)所示,输出荧光图像的灰度值与输出光强成正比,这样可以获得荧光样品的输出荧光强度与激发光强度之间的关系,即荧光样品的荧光激发效率。图 7(d)右轴所示为荧光激发效率模拟的测量结果。对不同浓度的荧光样品进行模拟时,系统只需要利用图中的关系即可控制模拟荧光的输出强度。

4.2 荧光发光模拟系统的成像性能检测

对不同浓度的 ICG 溶液样品的模拟参数进行测试后,用荧光发光模拟系统进行荧光样品的模拟,并基于荧光发光模拟系统进行荧光成像性能测试。分别使用 10 bit MV-GE130M-T MindVision 相机、12 bit MV-CA013-20GN Hikvision 相机、10 bit EO-0413M CMOS Edmund 相机与装有两个 FF01-832/37-25 滤光片的 0814MMI 镜头、780 nm 激发光源搭建了荧光成像系统。由于荧光成像系统的荧光灵敏度测试实验的目的是探测荧光成像仪器所能探测到的最弱的荧光,所以测试时应将成像系统调至最佳成像参数。三个系统测试时的工作距离均为 20 cm,激发光强度均为 40.4 W/m^2 , MV-GE130M-T MindVision 相机的

曝光时间设定为 500 ms, MV-CA013-20GN Hikvision 相机的曝光时间设定为 400 ms, EO-0413M CMOS Edmund 相机的曝光时间设定为 300 ms。

对于每套成像系统,首先分别用 0、0.3、1、3、10、20、100、200、1000 nmol/L 的 ICG 溶液进行测试,选取荧光图像 ROI 记录测试结果。荧光成像结果如图 8(a)所示。然后用荧光发光模拟系统分别模拟 0、0.3、1、3、10、20、100、200、1000 nmol/L 的荧光溶液样品,采用成像系统对模拟样品进行测试,记录测试结果。荧光发光模拟系统的荧光成像图如图 8(b)所示。之后对荧光成像结果进行分析,结果显示:在系统的探测范围内,荧光强度的对数与荧光样品浓度的对数为线性关系。将荧光溶液和荧光发光模拟系统的测试结果分别输出为荧光图像灰度与样品浓度之间的对数关系,如图 8(c)所示。可知:在相同的测试条件下,当 ICG 浓度低于成像系统的探测灵敏度时,激发出的荧光不足以使成像系统产生荧光成像响应,无法从图像背景噪声中分离出荧光信号,对应的对数输出为水平的噪声区间;随着样品浓度升高,荧光激发效率提高,相机可以采集到荧光,荧光亮度也逐渐增大,在系统的有效探测范围内的对数输出是有一定斜率的线性区

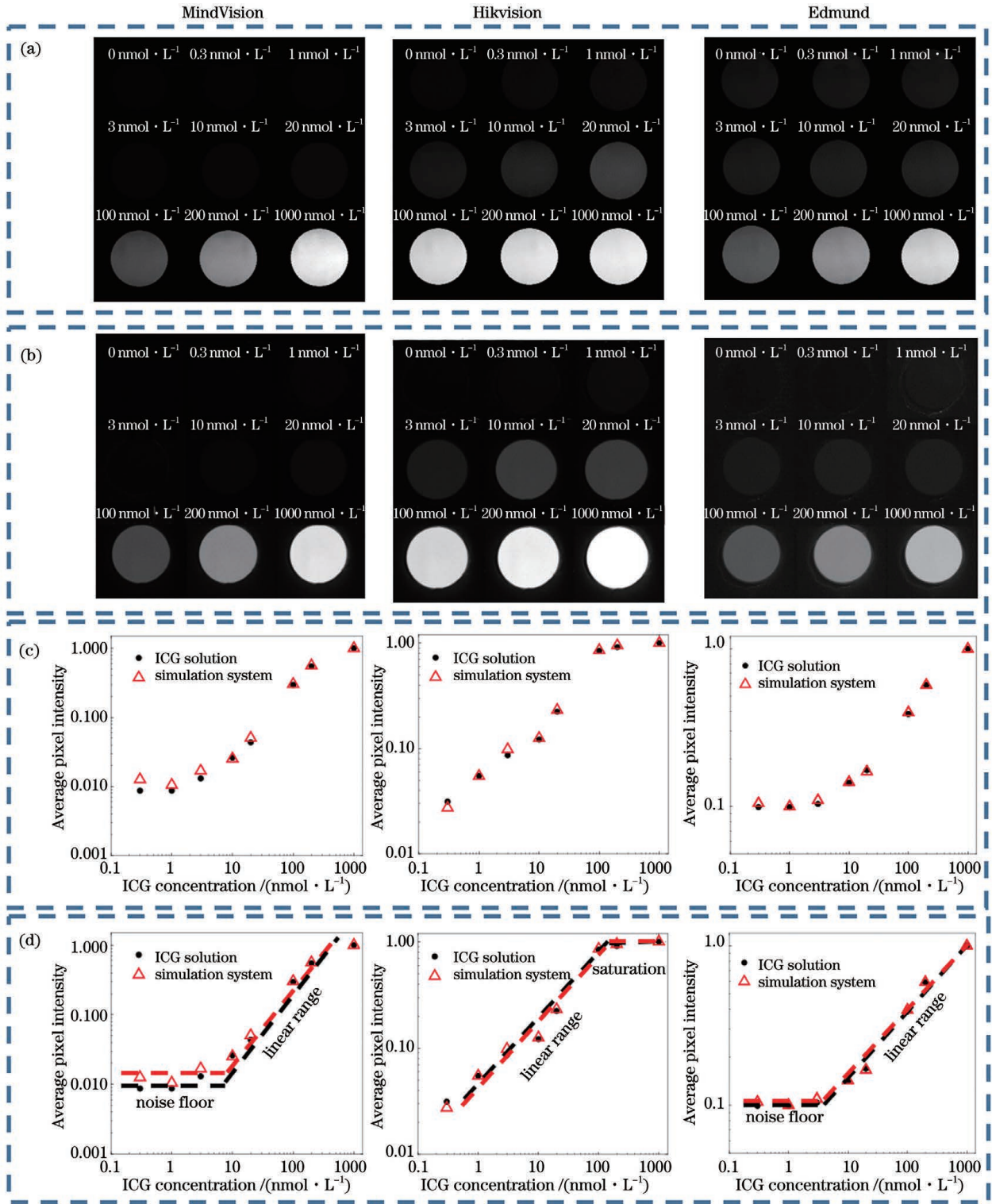


图 8 不同成像系统的荧光成像灵敏度的测试结果及对比。(a)成像系统对不同浓度 ICG 溶液样品的荧光成像结果;(b)成像系统对荧光发光模拟系统模拟的不同浓度的 ICG 溶液样品的荧光成像结果;(c)不同成像系统的荧光图像灰度与样品浓度之间的对数关系;(d)对数输出结果分析

Fig. 8 Fluorescence imaging sensitivity test results and comparison of different imaging systems. (a) Fluorescence imaging results of ICG solution samples with different concentrations by imaging systems; (b) fluorescence imaging results of fluorescence emission simulation system simulated ICG solution samples with different concentrations by imaging systems; (c) logarithmic relationship between fluorescence image grayscale and sample concentration for different imaging systems; (d) analysis of logarithmic output results

间;之后随着荧光亮度的增强,成像仪器采集的荧光图像过曝,对应的对数输出为水平的饱和和区间。所以,荧

光成像仪器的荧光成像灵敏度为噪声和线性区间的交点。在预设的相机参数配置下,使用荧光剂溶液测量

MindVision 相机、Hikvision 相机、Edmund 相机组成的三个成像系统的荧光成像灵敏度分别为 10、0.3、3 nmol/L,使用荧光发光模拟系统测得三个成像系统的荧光成像灵敏度分别为 10、0.3、3 nmol/L,如图 8(d)所示。通过对比成像仪器对荧光发光模拟系统和荧光样品的荧光成像灵敏度可以看出,用荧光发光模拟系统可以得到与荧光样品同样的测试结果,初步验证了用荧光发光模拟系统进行成像测试的可行性。

5 讨论与结论

本文提出了一种用光学系统模拟荧光样品的方法,设计了一套荧光发光模拟系统,使用光学系统模拟荧光剂,用于近红外荧光成像性能标准化测试。荧光发光模拟系统可以模拟荧光样品的荧光激发效率、荧光空间分布及荧光发射光谱特性,可以替代真实的荧光剂仿体对荧光成像类仪器进行量化表征。系统根据检测到的激发光强度控制出射荧光的强度,基于积分球的光学出入口设计模拟出射荧光的空间分布。本文还提出了一种基于线性滤光片和 LCD 的光谱模拟方法,并设计了一种改进的最小二乘光谱拟合算法,该算法可以自动模拟任意荧光光谱。基于荧光发光模拟系统对不同的近红外荧光成像仪器的荧光成像灵敏度进行了测试,并对不同仪器的测试结果进行对比,结果表明:用荧光发光模拟系统可以得到与荧光样品相同的测试结果;与传统的荧光剂相比,荧光发光模拟系统可以稳定精准地模拟荧光发光特性,有望取代传统荧光剂对荧光成像仪器进行标定和测试。

通过模拟 ICG 对荧光发光模拟系统的功能进行了验证。实际上,该荧光发光模拟系统可以模拟可见光到近红外波段内的任意荧光。未来可通过软件优化,将系统升级成为一个自适应的发光模拟器:系统数据库内存有大量常用荧光特性数据,在使用时选择荧光类型,并选择相应的浓度、样品环境等,系统就可以自动调节输出相应的荧光。由于目前的测试研究未涉及不发光的场景,所以没有对荧光的吸收特性进行模拟。未来拟在积分球内加入衰减片或吸收片,实现荧光剂吸收特性的模拟。目前,该荧光发光模拟系统可以稳定地精准模拟荧光剂的荧光特性,对成像系统的成像灵敏度进行测试。未来,该系统还可以进行分辨率、动态范围、成像深度等方面的测试。本工作作为荧光光谱模拟新技术的初步探索,还有待从多方面进行优化:对于系统光谱线性相加性和灰度-透过率拟合误差进行进一步测试与分析,将有助于硬件和软件的设计,提高系统的模拟精度;对负反馈调节算法进行研究也将进一步提高系统输出的精度和稳定度。荧光成像性能测试标准化的建立需要有可溯源的测量结果,在以后的研发中可以使用标准光源,并对发射荧光进行测量,同时将测量的量关联到国际标准单位,

这样在改进的基础上可以发展一套基于荧光剂模拟平台的近红外荧光成像性能标准化测试方法;在该方法中定义近红外仪器测试的性能参数、单位、测试方法、测试条件等,不同的仪器厂商就可以根据这套标准对仪器进行参数测试、校准和标定。

参 考 文 献

- [1] Koch M, Ntziachristos V. Advancing surgical vision with fluorescence imaging [J]. *Annual Review of Medicine*, 2016, 67: 153-164.
- [2] 王翔, 殷高方, 赵南京, 等. 基于 TPLIF 技术的光合荧光参数快速准确测量的激发光自适应方法 [J]. *光学学报*, 2020, 40(24): 2412001.
- [3] Wang X, Yin G F, Zhao N J, et al. Adaptive method of excitation light intensity based on TPLIF technology for fast and accurate measurement of photosynthetic fluorescence parameters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(24): 2412001.
- [4] Dsouza A V, Lin H Y, Henderson E R, et al. Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(8): 080901.
- [5] Koch M, Symvoulidis P, Ntziachristos V. Tackling standardization in fluorescence molecular imaging [J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(9): 505-515.
- [6] Sevick-Muraca E M, Zhu B H. The need for performance standards in clinical translation and adoption of fluorescence molecular imaging [J]. *Medical Physics*, 2013, 40(4): 040402.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 医用诊断磁共振成像 (MRI) 设备影像质量检测与评价规范: WS/T 263—2006 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [8] Ministry of Health of the People's Republic of China. Specification of image quality test and evaluation for medical magnetic resonance imaging (MRI) equipment: WS/T263—2006 [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [9] DeWerd L A, Kissick M. The phantoms of medical and health physics [M]. New York: Springer, 2014.
- [10] Evaluation and routine testing in medical imaging departments—part 3-1: acceptance tests—imaging performance of X-ray equipment for radiographic and radioscopy systems: IEC 61223-3-1: 1999 [S]. [2022-07-10]. <https://webstore.iec.ch/publication/19372&preview=1>.
- [11] Ulrich E J, Sunderland J J, Smith B J, et al. Automated model-based quantitative analysis of phantoms with spherical inserts in FDG PET scans [J]. *Medical Physics*, 2018, 45(1): 258-276.
- [12] Russek S, Boss M, Jackson E, et al. Characterization of NIST/ISMRM MRI system phantom [C] // Proceedings of the 20th Annual Meeting of ISMRM, May 5-11, 2012, Melbourne, Australia. [S.l.: s.n.], 2012: 2456.
- [13] 张洋, 何腾超, 钟卫帅, 等. 血流介导组织荧光光谱测量系统及仿体验证 [J]. *中国激光*, 2021, 48(24): 2407001.
- [14] Zhang Y, He T C, Zhong W S, et al. Flow mediated tissue fluorescence measurement system and phantom verification [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(24): 2407001.
- [15] Zhao S L, Guo X, Taniguchi M, et al. Detection of mediastinal lymph node metastases using indocyanine green (ICG) fluorescence imaging in an orthotopic implantation model [J]. *Anticancer Research*, 2020, 40(4): 1875-1882.
- [16] Degrand A M, Lomnes S J, Lee D S, et al. Tissue-like phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(1): 014007.
- [17] Pleijhuis R G, Langhout G C, Helfrich W, et al. Near-infrared fluorescence (NIRF) imaging in breast-conserving surgery: assessing intraoperative techniques in tissue-simulating breast phantoms [J]. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*,

- 2011, 37(1): 32-39.
- [15] Coates E. Aggregation of dyes in aqueous solutions[J]. Journal of the Society of Dyers and Colourists, 1969, 85 (8): 355-368.
- [16] Zhou J F, Chin M P, Schafer S A. Aggregation and degradation of indocyanine green[J]. Proceedings of SPIE, 1994, 2128: 495-505.
- [17] Penha F M, Rodrigues E B, Maia M, et al. Biochemical analysis and decomposition products of indocyanine green in relation to solvents, dye concentrations and laser exposure[J]. Ophthalmologica, 2013, 230(Suppl 2): 59-67.
- [18] Emerson E S, Conlin M A, Rosenoff A E, et al. The geometrical structure and absorption spectrum of a cyanine dye aggregate[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1967, 71(8): 2396-2403.
- [19] Landsman M L, Kwant G, Mook G A, et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green[J]. Journal of Applied Physiology, 1976, 40(4): 575-583.
- [20] Zhu B H, Rasmussen J C, Sevic-Muraca E M. A matter of collection and detection for intraoperative and noninvasive near-infrared fluorescence molecular imaging: to see or not to see? [J]. Medical Physics, 2014, 41(2): 022105.
- [21] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing [J]. Nature Materials, 2005, 4(6): 435-446.
- [22] Ohnishi S, Lomnes S J, Laurence R G, et al. Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping [J]. Molecular Imaging, 2005, 4(3): 172-181.
- [23] Wang W, Chen Q P, Zhao Y F, et al. PbS quantum dots and BaF₂: Tm³⁺ nanocrystals co-doped glass for ultra-broadband near-infrared emission [J]. Chinese Optics Letters, 2022, 20(2): 021603.
- [24] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels [J]. Nature Methods, 2008, 5(9): 763-775.
- [25] Pinaud F, Michalet X, Bentolila L A, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1679-1687.
- [26] Zhu B H, Rasmussen J C, Litorja M, et al. Determining the performance of fluorescence molecular imaging devices using traceable working standards with SI units of radiance [J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2016, 35(3): 802-811.
- [27] Anastasopoulou M, Koch M, Gorpas D, et al. Comprehensive phantom for interventional fluorescence molecular imaging [J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(9): 091309.
- [28] Ruiz A J, Wu M, LaRochelle E P M, et al. Indocyanine green matching phantom for fluorescence-guided surgery imaging system characterization and performance assessment [J]. Journal of Biomedical Optics, 2020, 25(5): 056003.
- [29] Oettinger P, Dewey C. Lasing efficiency and photochemical stability of IR laser dyes in the 710-1080-nm spectral region [J]. IEEE Journal of Quantum Electronics, 1976, 12(2): 95-101.
- [30] Diaspro A, Chirico G, Usai C, et al. Photobleaching [M] // Pawley J B. Handbook of biological confocal microscopy. Boston: Springer, 2006: 690-702.
- [31] Corbett A D, Shaw M, Yacoot A, et al. Microscope calibration using laser written fluorescence [J]. Optics Express, 2018, 26(17): 21887-21899.
- [32] Xu R X, Allen D W, Huang J W, et al. Developing digital tissue phantoms for hyperspectral imaging of ischemic wounds [J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(6): 1433-1445.
- [33] 徐可欣, 高峰, 赵会娟. 生物医学光子学 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 28-32.
- Xu K X, Gao F, Zhao H J. Biomedical photonics [M]. Beijing: Science Press, 2011: 28-32.
- [34] Emadi A, Wu H W, de Graaf G, et al. Design and implementation of a sub-nm resolution microspectrometer based on a linear-variable optical filter [J]. Optics Express, 2012, 20(1): 489-507.
- [35] Geelhaar T. Liquid crystals for display applications [J]. Liquid Crystals, 2010, 24(1): 91-98.
- [36] Benke K K, Hedger D F. Normalization of brightness and contrast in video displays [J]. European Journal of Physics, 1996, 17(5): 268-274.

Fluorescence Emission Simulation System for Imaging Performance Testing

Li Chenmeng¹, Shao Pengfei¹, Wu Bingxuan¹, Sun Mingzhai², Yao Peng¹, Shen Shuwei²,
Liu Peng^{2*}, Xu Xiaorong^{1,2*}

¹ Department of Precision Machinery and Precision Instrumentation, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China;

² Suzhou Institute for Advanced Research, University of Science and Technology of China, Suzhou 215123, Jiangsu, China

Abstract

Objective Fluorescence molecular imaging is widely used in clinical practice. Different hardware and software designs in different fluorescence imaging systems lead to differences in imaging performance between instruments. However, unlike radiographic imaging, fluorescence imaging currently has no mature specifications or standards to test the performance of imaging instruments. Phantoms are tools used in standardized imaging performance testing and are commonly used in radiography. Unlike human tissues, phantoms have preset shapes and contrasts that simulate specific tissue parameters over time. These properties allow phantoms to be used to measure, evaluate, and confirm the performance of imaging instruments. In research on near-infrared fluorescent phantoms, fluorescent agents and quantum dots are used as samples for fluorescence imaging performance testing. However, owing to the different materials and preparation methods used in the samples, as well as the stability of the materials themselves, there is still no stable sample for accurately simulating the fluorescence spectrum as a standardized test tool. In this study, a fluorescence emission simulation system for

simulating fluorescent samples is proposed. Imaging instruments can exhibit the same response as real fluorophores when imaging a fluorescence simulation system. Compared with traditional fluorescent agents, the fluorescence emission simulation (FES) system can more accurately simulate fluorescence emission characteristics in a stable manner.

Methods In this study, we propose a fluorescent light-emitting system that uses an optical system to simulate fluorophores. First, according to the characteristics of the fluorescent agent, a simulation method for fluorescence excitation efficiency, spatial distribution, and fluorescence emission spectrum characteristics is designed such that the fluorescence imaging instrument has the same response as the real fluorescent agent when imaging the FES system. The system controls the intensity of the outgoing fluorescence according to the intensity of the detected excitation light, thereby simulating the fluorescence excitation efficiency of the fluorescent agent sample. The design of the optical entrance and exit based on the integrating sphere can simulate the spatial distribution of outgoing fluorescence. In this study, a spectral simulation method based on a linear filter LVF and liquid crystal display (LCD) is used, and based on this method, an improved least squares spectral fitting algorithm is designed to automatically simulate arbitrary fluorescence spectra.

Results and Discussions The performance verification shows that the subspectra of the FEM system have linear additivity (Fig. 5), and the subspectrum satisfies a certain gray-transmittance relationship [Fig. 6(a)]. A grayscale transmittance curve of the sub-spectrum was obtained [Fig. 6(b)]. Functional verification of the system is realized by fluorescence emission simulation of ICG. The simulation of the fluorescence emission spectrum characteristics [Fig. 7(a)] and fluorescence excitation efficiency [Figs. 7(b)–(d)] of the ICG aqueous solution samples with different concentrations is performed using the FES system. The simulation system obtains the same test results as the fluorescent samples (Fig. 8), and compared with traditional fluorescent agents, the FES system more accurately simulates the fluorescence emission characteristics in a stable manner, which verifies the feasibility of the system as a standardized test tool.

Conclusions In this study, a method for simulating fluorescent samples with an optical system is proposed. A programmable FES system is built and an optical system is used to simulate fluorescent agents for the standardization test of near-infrared fluorescence imaging performance. The FES system can simulate the fluorescence excitation efficiency, spatial distribution, and fluorescence emission spectrum characteristics of the fluorescent sample such that the fluorescence imaging instrument has the same response as the real fluorescent agent when imaging the FES system. A spectral simulation method based on a linear filter and liquid crystal display is also proposed and an improved least squares spectral fitting algorithm is designed, which can automatically simulate any fluorescence spectrum. Finally, based on the FES system, the fluorescence imaging sensitivities of different near-infrared fluorescence imaging instruments are tested and the test results of different instruments are compared. The test results show that compared with traditional fluorescent agents, the FES system can more accurately simulate the fluorescence emission characteristics in a stable manner, which verifies the feasibility of the system as a standardized test tool.

Key words spectroscopy; fluorescence emission simulation; spectral fitting; near-infrared fluorescence imaging; imaging performance test; indocyanine green