

激光扫描共聚焦技术在近红外荧光成像中的应用

昌剑^{1,2} 张运海^{1,2} 张欣^{1,2} 姜琛昱^{1,2}

¹中国科学院苏州生物医学工程技术研究所医用光学室, 江苏 苏州 215163

²江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

摘要 为实现高信噪比(SNR)的深层生物组织成像, 结合了激光扫描共聚焦成像技术和近红外(NIR)荧光成像技术, 根据近红外荧光成像要求设计了一套激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统, 对注入近红外荧光染料 LDS925 小鼠的尾部成像后获得了小鼠尾部近红外荧光图像和近红外共聚焦荧光图像。实验结果表明小鼠尾部近红外共聚焦荧光图像信噪比显著优于小鼠尾部近红外荧光图像, 采用均方差和峰谷(PV)值进行评估时, 近红外荧光成像荧光信号强度分布的均方差值和 PV 值分别为 864 和 102; 共聚焦荧光成像的荧光信号强度分布的均方差值和 PV 值分别为 1459 和 255; 进一步表明激光扫描共聚焦成像技术在近红外荧光成像中应用是可行的, 可以实现深层组织的高信噪比共聚焦成像。

关键词 医用光学与生物技术; 激光扫描共聚焦技术; 近红外荧光成像; 深层组织成像; 在体成像

中图分类号 R318.6 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP51.111702

Application of Laser Scanning Confocal Technology in Near Infrared Fluorescence Imaging

Chang Jian^{1,2} Zhang Yunhai^{1,2} Zhang Xin^{1,2} Jiang Chenyu^{1,2}

¹Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract In order to obtain high signal-to-noise ratio (SNR) tissue images with deeper imaging depths, the laser scanning confocal technology with the near infrared (NIR) fluorescence imaging is integrated and a laser scanning confocal NIR fluorescence imaging system based on requirements of NIR fluorescence imaging is established. A laboratory mouse injected with NIR fluorescence labeling LDS925 is placed in this system and a non-confocal NIR fluorescence image and a confocal NIR fluorescence images for the tail of laboratory mouse is obtained. The experimental results show that when evaluated by the mean square error and the peak valley (PV) value, the mean square error and the PV value is 864 and 102 respectively for the non-confocal NIR fluorescence image and 1459 and 255 for the confocal NIR fluorescence image, which further shows that the laser scanning confocal technology is applicable to the NIR fluorescence imaging, and the *in vivo* and high SNR tissue imaging with deeper imaging depths can be achieved.

Key words medical optics and biotechnology; laser scanning confocal; near infrared fluorescence imaging; deep tissue imaging; *in vivo* imaging

OCIS codes 170.0110; 170.3880; 170.5810; 180.5810

1 引言

近红外荧光成像技术是近年发展起来的用于医学和细胞生物学的成像技术, 目前已广泛应用于细胞凋亡成像、肿瘤受体成像、心血管疾病成像、近红外荧光免疫分析、微量生物活性物质检测、皮肤组织液近红外无创

收稿日期: 2014-05-30; 收到修改稿日期: 2014-06-17; 网络出版日期: 2014-10-15

基金项目: 国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1)、苏州市应用基础研究计划(SYG201324)

作者简介: 昌剑(1988—), 男, 助理研究员, 主要从事激光共聚焦显微镜成像技术方面的研究。

E-mail: ajchang84@gmail.com

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

血糖检测等生物学工程领域,以其安全、无损、实时、在位监测等优势受到了诸多科研工作者的青睐^[1-5]。近红外荧光成像有多项优势,包括近红外光谱范围内细胞、组织和其他生物分子自发荧光非常微弱,此外,生物组织在近红外光谱范围内透射率相对较高,穿透性能优异,这些使得近红外荧光技术在在体生物成像中应用越来越普遍。目前,近红外荧光成像发展方向主要集中在染料和探针^[6],除传统近红外荧光染料外,1998年,Chan等^[7]和Bruchez等^[8]研究提出用近红外光区量子点材料作为探针。2012年,斯坦福大学戴红杰研究组利用单壁碳纳米管(SWNT)作为生物探针,获得了近红外小鼠血管的在体荧光成像结果,经过高斯拟合,其实验中检测到的最小可测量血管直径可达 $35.4\ \mu\text{m}$ ^[6]。2013年,王强斌研究组^[9-10]利用一系列PEGylated Ag_2S 量子点作为生物探针,获得小鼠血管在体荧光成像以及活体成像结果,最小可测量血管直径可达 $91.3\ \mu\text{m}$ 。此外, Er^{3+} ^[11]、纳米硫化铜^[12]、掺镱铋酸盐^[13]等也可以用作近红外吸收材料。然而,上述传统近红外荧光染料以及量子点生物探针研究均是基于传统近红外荧光成像技术,存在非焦平面干扰信号,导致图像对比度较差、空间分辨率低、无法实现三维成像等缺陷。

激光扫描共聚焦技术是一种目前应用广泛的高分辨率荧光显微成像技术,它通过在光源、探测器前安放一对和照明激光光斑共轭的针孔抑制非焦面干扰信号,通过点扫描方式在整个平面上成像。同时,由于激光扫描共聚焦技术大幅提高了Z轴分辨率,因此让三维成像成为可能。激光扫描共聚焦技术在可见光光谱范围内的应用非常成熟,但是在体成像或者较厚组织成像时,往往面临穿透深度浅、自发荧光信号干扰大等缺陷^[1]。本研究组根据近红外荧光成像要求设计一套激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统,并且在实验中得到了小鼠尾部宽视场近红外荧光图像和小鼠尾部共聚焦近红外荧光图像。

2 近红外共聚焦成像特性

近红外荧光成像优势主要由生物组织特性决定,体现在两个方面:1)生物组织在近红外区域自发荧光低,背景噪声较弱,能够得到较好的信噪比;自发荧光主要由生物组织散射光谱特性决定。以血清为例,血清散射光谱峰值大多分布在近紫外和可见光波段,而近红外区域几乎接近截止。因此,可见光波段的深层生物组织成像的目标信号将受到组织散射光谱的严重干扰,很难取得高信噪比图像。2)生物组织在近红外区域光吸收较弱,穿透性能优秀,非常适合深层组织成像,目前已实现 $10\ \text{mm}$ 成像深度。生物组织中对光吸收主要来源于组织内生载色体,如血红蛋白、肌红蛋白、胆红素的血红素、线粒体中呼吸链的细胞色素及黑色素^[14]。以血液为例,血液吸收光谱主要来源于血红蛋白对光的吸收效应^[15]。根据血红蛋白对光的吸收光谱特性,血红蛋白对可见光波段的光吸收系数非常高,相比近红外区域,两者对光的吸收系数之比可能达 $10\sim 200$ 倍^[16],这意味着在相同条件下,采用可见光荧光成像获得的图像信噪比仅为近红外区域的 $10\%\sim 0.5\%$ 。

激光扫描共聚焦技术是一种目前应用广泛的高分辨率荧光显微成像技术,主要优势体现在两方面:1)高信噪比,针孔滤波技术使得只有处于焦平面位置上的组织信息才能够被探测,从而最大限度地抑制了非焦平面的杂散光,从而能提供高信噪比图像^[17-19];2)分层析成像,由于抑制非焦平面的杂散光,共聚焦成像Z轴分辨率较高,从而可以对生物组织各个层面进行扫描成像,实现层析成像功能^[17-19]。

因此,激光扫描共聚焦近红外荧光成像技术可以充分利用近红外区域生物组织的光吸收系数低、穿透深度深、散射光谱弱等优势,提供高分辨率、高信噪比的深层生物组织图像。

3 实验系统设计

3.1 实验系统构成

图1为激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统构成,其主要由1台 $638\ \text{nm}$ 激光器、CHROMA ZT640rdc二向色镜、CTI 6215扫描振镜、扫描透镜、筒镜、奥林巴斯40X物镜、样品台、 $75\ \mu\text{m}$ 针孔、雪崩二极管THORLABS APD 120A/M、积分放大电路、数据采集卡、主控机等构成。实验系统中,光源针孔、主像面、探测器针孔三者以及光源针孔、物面、探测器针孔三者为共轭关系。

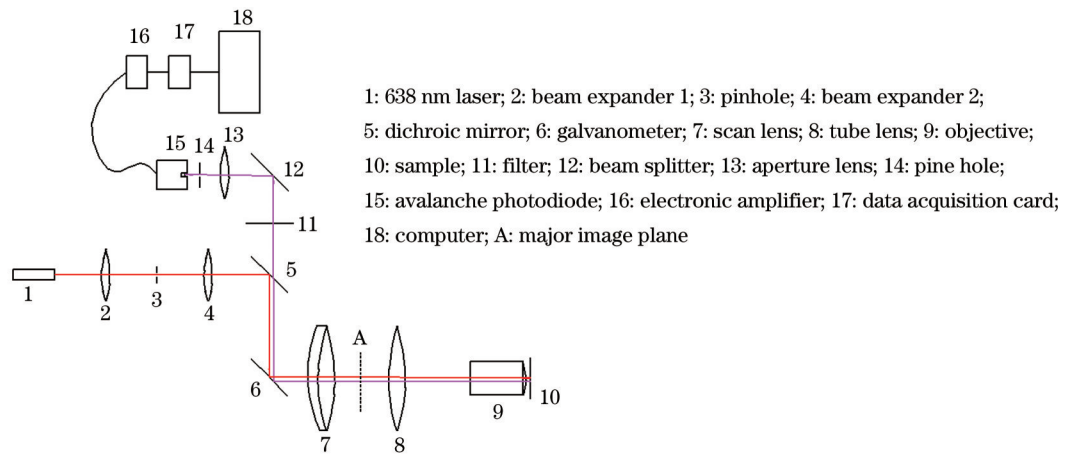


图1 近红外共聚焦荧光成像实验系统图

Fig.1 Experimental schematic diagram for NIR confocal imaging

3.2 系统工作过程

实验分为光路检测装调和近红外共聚焦荧光成像两个阶段。对于光路检测装调,最重要的是光源针孔、物面、探测器针孔三者之间的共轭关系;而对于近红外共聚焦荧光成像,最重要的是光源针孔、主像面、探测器针孔三者之间的共轭关系。选择 638 nm 激光器作为激发光源,经 CHROMA ZT640rdc 二向色镜反射至 CTI 6215 扫描振镜,ZT640rdc 二向色镜在 670~1000 nm 的近红外区域透射率大于 95%,在 645 nm 以下透射率小于 5%,能够有效截止可见光透过;对于光路检测装调阶段,激光经过扫描振镜反射后通过扫描透镜、筒镜和奥林巴斯 40X 物镜成像在物面上,扫描透镜、筒镜均在 650~1050 nm 的近红外区域进行增透处理;样品激发出的荧光反射回来,经过奥林巴斯 40X 物镜、筒镜和扫描透镜后,透射经过 CHROMA ZT640rdc 二向色镜、CHROMA ET700lp 滤光片,经 THORLABS BSW11 分光片反射,并通过针孔透镜成像在针孔上,最后荧光信号由 THORLABS APD 120A/M 接收,其中 CHROMA ET700lp 滤光片在 705~1200 nm 近红外区域进行增透处理,同时反射大部分可见光。雪崩二极管输出的电流信号经过放大积分器后转换为电压信号,并且通过数据采集卡进行采集,最终通过主控机图像重构软件重构出整幅图像。

4 实验结果及分析

先采用植物细胞壁荧光玻片对系统进行检测。图 2 为植物细胞壁荧光玻片在近红外共聚焦系统中成像图像。由于样本在近红外区荧光较弱,针对原始图像进行了后续滤波放大处理。图 2 为 512 pixel×512 pixel 图像,单个像素尺寸为 48 nm,图中发光部位即为细胞壁,半峰全宽约为 12,由此可见图像分辨率达微米量级,可以确定激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统的光机装调和电气单元比较合理。

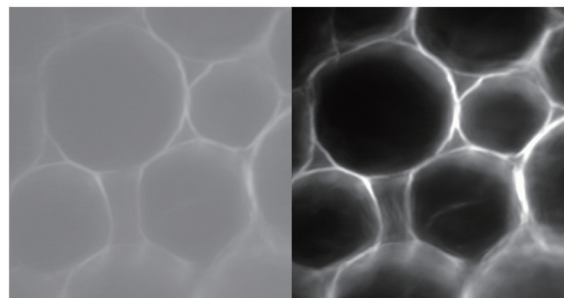


图2 滤波前后的荧光图像

Fig.2 Fluorescence image before and after filtration

考虑到物面,即物镜焦面成像时,视场区域太小(900 μm ×900 μm),难以准确定位注射荧光染料的位置;因此,在小鼠活体实验中,将小鼠尾部固定在激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统主像面(18 mm×18 mm)上,即在扫描透镜焦面位置进行了小鼠活体成像,在皮下注射近红外荧光染料。本次实验所使用的近红外荧光染料为 LDS925,发射的荧光波长范围为 875~1050 nm。图 3 为近红外共聚焦主像面实验装置图。图 4 即为

小鼠尾部近红外荧光图像。图5为小鼠尾部近红外荧光共聚焦图像。图6为图4及图5红线标记部位的荧光信号强度分布曲线。

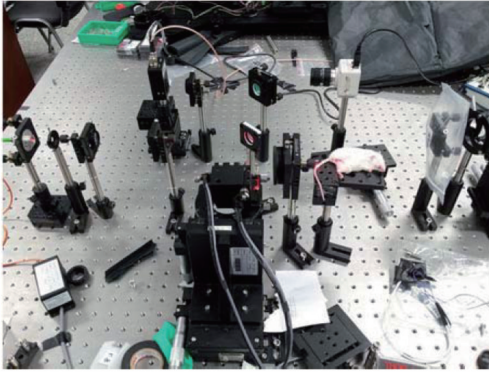


图3 近红外共聚焦实验装置

Fig.3 NIR confocal experiment device

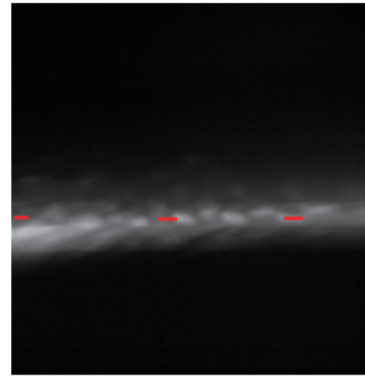


图4 小鼠尾部近红外荧光图像

Fig.4 NIR fluorescence image of mice tail

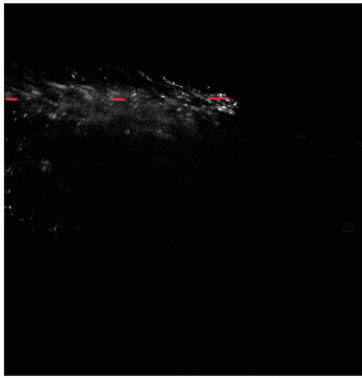


图5 小鼠尾部近红外荧光共聚焦图像

Fig.5 NIR fluorescence confocal image of mice tail

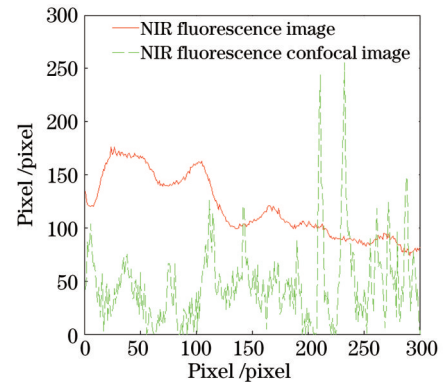


图6 红线标记荧光强度分布曲线

Fig.6 Fluorescence intensity distribution curve for red-marked area

图4、图5均为500 pixel×500 pixel,图像尺寸均为18 mm×18 mm。对比图4和图5表明,小鼠尾部近红外荧光共聚焦图像信噪比显著优于小鼠尾部近红外荧光宽视场图像,共聚焦图像在目标荧光信号以外区域几乎没有干扰信号,而宽视场图像非焦点干扰信号较强,对比度较差。本文选择图像信号强度分布的均方差和峰谷(PV)值作为图像对比度评价方法,均方差和PV值计算方法分别为

$$x_{\text{mse}} = \sum_{i=1}^M (I_i - \bar{I})^2, \quad (1)$$

$$d_{\text{PV}} = I_{i_{\text{max}}} - I_{i_{\text{min}}}, \quad (2)$$

式中 x_{mse} 和 d_{PV} 分别为均方差和PV值, I_i 为图6中曲线各点信号强度值, \bar{I} 为图6中曲线各点信号强度平均值, M 为曲线点数。

经过对图6中荧光信号强度曲线计算分析得到,对于传统近红外荧光成像,荧光信号强度分布的均方差值和PV值分别为864和102;共聚焦荧光成像的荧光信号强度分布的均方差值和PV值分别为1459和255。由此可见,采用均方差作为对比度评价标准时,共聚焦近红外荧光成像将显著优于传统近红外荧光成像。由于实验受显微物镜限制,选择了在扫描透镜焦面,即共聚焦系统主像面上成像;扫描透镜数值孔径(NA)约为0.15,远低于高分辨率显微物镜($NA > 1.0$),因此,如果能选用适合于近红外区域的高数值孔径显微物镜,激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统将获得微米量级分辨率的深层组织图像;然而,这种高分辨率深层组织的近红外荧光图像是以视场尺寸折中为代价,也会对系统装调精度和条件提出更高要求。综上,激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统能提供几乎无背景噪声的高信噪比、较优分辨率的深层组织的近红外荧光图像。相比近红外荧光图像,近红外共聚焦荧光图像在背景噪声、信噪比等方面有显著优势。

4 结 论

将激光扫描共聚焦成像技术应用于近红外荧光成像中,根据近红外荧光成像要求设计一套激光扫描共聚焦近红外荧光成像实验系统,并且获得了标记有近红外荧光染料的小鼠尾部近红外荧光图像、小鼠尾部近红外荧光共聚焦图像,验证了共聚焦成像技术在近红外荧光成像中的可行性。近红外荧光成像和小鼠尾部近红外荧光共聚焦成像中小鼠样本均放置在扫描透镜(NA 约为0.15)焦面,即主像面上;如果进一步使用适合于近红外区域的高数值孔径显微物镜,分辨率将能够提高至微米量级左右,但是会牺牲视场大小。经分析,传统近红外荧光成像和共聚焦荧光成像的荧光信号强度分布的均方差值分别为864和1459,表明共聚焦近红外荧光成像在图像对比度方面显著优于传统近红外荧光成像。研究结果表明激光扫描共聚焦成像技术在近红外荧光成像中应用是可行的,可以实现深层组织的高信噪比共聚焦成像。

参 考 文 献

- 1 D Maxwell, Q Chang, X Zhang, *et al.*. An improved cell penetrating, caspase-activatable, near-infrared fluorescent peptide for apoptosis imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(4): 702-709.
- 2 J Klohs, M Gr3/4fe, K Graf, *et al.*. *In vivo* imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral is chemia using a fluorescent antibody [J]. *Stroke*, 2008, 39(10): 2845-2852.
- 3 Y Q Gu, Z Y Qian, Y L Song. *In Vivo* Near Infrared Techniques for Protein Drug Development [M]. *Encyclopaedia of Healthcare Information System*, IGI Global, 2008.
- 4 Deng Dawei, Liu Fei, Cao Jie, *et al.*. Synthesis and tumor targeting research of two near-infrared fluorescence probes [J]. *Chinese J Lasers*, 2010, 37(11): 2735-2742.
邓大伟, 刘 飞, 曹 洁, 等. 两种近红外荧光探针的合成及肿瘤靶向研究[J]. *中国激光*, 2010, 37(11): 2735-2742.
- 5 Wu Chunyang, Lu Qipeng, Ding Haiquan, *et al.*. Noninvasive blood glucose sensing with near-infrared spectroscopy based on interstitial fluid [J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(11): 1117001.
吴春阳, 卢启鹏, 丁海泉, 等. 利用人体组织液进行近红外无创血糖测量[J]. *光学学报*, 2013, 33(11): 1117001.
- 6 K Welsher, Z Liu, D Daranciang, *et al.*. Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules [J]. *Nano Letters*, 2008, 8(2): 586-590.
- 7 W C Chan, S Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2016-2018.
- 8 Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, *et al.*. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-2016.
- 9 C Li, Y Zhang, M Wang, *et al.*. *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag_2S quantum dots in the NIR-II window [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 393-400.
- 10 Wang Mao, Li Chunyan, Sun Yunfei, *et al.*. Research of near-infrared small living animal fluorescence imaging system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(6): 0617003.
王 懋, 李春炎, 孙云飞, 等. 近红外小动物活体荧光成像系统的研制[J]. *光学学报*, 2013, 33(6): 0617003.
- 11 Fan Xiaokang, Wang Xin, Li Xia, *et al.*. 2.7 μm fluorescence and energy transfer process in Er^{3+} -doped and Er^{3+}/Pr^{3+} co-doped tellurite glasses [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(1): 0116001.
范小康, 王 欣, 李 夏, 等. Er^{3+} 单掺与 Er^{3+}/Pr^{3+} 共掺碲酸盐玻璃的2.7 μm 光谱性质及能量转移过程[J]. *光学学报*, 2014, 34(1): 0116001.
- 12 Xu Lei, Xia Haiping. Multi-metal sulfide for absorbing near infrared light [J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(6): 0606001.
徐 磊, 夏海平. 多元金属硫化物的近红外吸收性能[J]. *中国激光*, 2013, 40(6): 0606001.
- 13 Cheng Jimeng, Li Weiwei, Zhao Guoying, *et al.*. Temperature characteristics of near-infrared luminescence of Yb-doped bismuth-based glasses [J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(10): 1015001.
程继萌, 李韦韦, 赵国营, 等. 掺铋铋酸盐玻璃近红外发光的温度特性[J]. *中国激光*, 2013, 40(10): 1015001.
- 14 Su Chang, Ding Haishu. Spectroscopy technology in biological tissue [J]. *Foreign Medical Sciences (Biomedical Engineering Fascicle)*, 1995, 18(6): 316-323.
苏 畅, 丁海曙. 生物组织光谱学技术[J]. *国外医学(生物医学工程分册)*, 1995, 18(6): 316-323.
- 15 Wang Lexin, Zhao Zhimin. Resonance scattering spectrum of normal and abnormal serum [J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2011, 32(2): 200-203.

- 王乐新, 赵志敏. 正常和异常血清的共振散射光谱[J]. 发光学报, 2011, 32(2): 200-203.
- 16 Lan Xiufeng. Studies on Spectroscopy Characteristic of the Interaction between Light and Bio-tissue [D]. Nanjing: Nanjing University of Science & Technology, 2005.
- 兰秀凤. 光与生物组织相互作用的光谱特性研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2005.
- 17 J B Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy [M]. Third Edition. Berlin: Springer, 2006. 251-264.
- 18 Xiao Yun, Zhang Yunhai, Wang Zhen, *et al.*. Effect of incident laser on resolution of LSCM [J]. Optics and Precision Engineering, 2014, 22(1): 31-38.
- 肖 昀, 张运海, 王 真, 等. 入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响[J]. 光学 精密工程, 2014, 22(1): 31-38.
- 19 Yunhai Zhang, Bian Hu, Yakang Dai, *et al.*. A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope [J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2013, 2013. 890203. doi: 10.1155/2013/890203.