

线扫描共聚焦成像技术在生物医学成像中的应用

孔文, 高峰, 樊金宇, 史国华

中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

摘要 线扫描共聚焦成像技术基于共聚焦成像原理, 使用线光束一维扫描照明样品以提高成像速率; 通过共焦狭缝滤除样品成像光束中的非聚焦层面杂散光, 提高成像分辨率和对比度; 近年来, 该技术因分辨率高、成像快、成像视场大、系统结构简单等优点而在生物医学成像中的应用越来越广泛。介绍了线扫描共聚焦成像技术的基本原理, 列举了成像系统的主要参数及其影响因素, 并举例说明了其在生物医学成像, 尤其是眼底成像和生物组织细胞观察等方面的应用, 最后总结了该技术的优缺点及其应用前景。

关键词 显微; 线扫描共聚焦; 共聚焦显微镜; 眼底成像; 生物医学成像; 在体成像

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.050003

Application of Confocal Line Scanning Imaging Technique in Biomedical Imaging

Kong Wen, Gao Feng, Fan Jinyu, Shi Guohua

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

Abstract Based on confocal imaging principle, the confocal line scanning imaging technique uses the one-dimensional scanning-line beam to illuminate the sample for increasing imaging speed. A confocal slit is used to filter the stray light from unfocused-level for improving imaging resolution and contrast ratio. Recently, the confocal line scanning imaging technology is becoming more and more popular in biomedical imaging because of its advantages such as high imaging speed, high imaging resolution, simple system structure, and so on. We introduce the basic principle of confocal line scanning imaging, and list main parameters of the imaging system and their influencing factors. Then the application in biomedical imaging especially in fundus imaging and biological tissue cell observation is illustrated. Advantages, disadvantages, and application prospect of the technique are finally summarized.

Key words microscopy; confocal line scanning; confocal microscope; fundus imaging; biomedical imaging; *in vivo* imaging

OCIS codes 180.1790; 170.0110; 170.1790; 170.3880

1 引言

共聚焦成像原理由 Minsky^[1] 在 1957 年首次提出。在共聚焦成像中, 光源发出的光经过物镜聚焦到样品上, 样品返回的成像光束通过小孔或狭缝到

达探测器。小孔或狭缝的限制使得非聚焦层面的杂散光被滤除, 只有物镜聚焦层面的光可以到达探测器成像, 系统的成像分辨率大大提高。基于此原理制成了点扫描共聚焦显微镜(LSCM), 点光源在扫描器件驱动下对样品进行二维点扫描照明, 通过探

收稿日期: 2017-10-02; 收到修改稿日期: 2017-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(61675226, 61378090)、国家重大科学仪器设备开发专项(2016YFF0102000)、中国科学院战略性先导科技专项(XDB02060000)、中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-JSC03)、江苏省杰出青年基金(BK20060010)

作者简介: 孔文(1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事共聚焦在体成像方面的研究。E-mail: kongwen20@163.com

导师简介: 史国华(1981—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事在体光学成像与检测方法方面的研究。

E-mail: ioe_eye@126.com(通信联系人)

测器(如光电倍增管、雪崩光电二极管等)收集返回光信号对样品成像。在探测器前放置针孔,由于点光源与探测器之间严格共轭,非聚焦平面杂散光被滤除,因此成像分辨率和对比度提高,系统的理论光学分辨率可达衍射极限。LSCM 因具有分辨率高、非侵入式成像等优点而在生物医学成像中应用广泛,其常用的扫描方式有检流计振镜扫描、共振式扫描、多面转镜扫描、声光扫描、微机电系统扫描等^[2]。由于需要对样品逐点扫描,成像速率受到扫描速度的限制,因此商用 LSCM 一般为单帧成像或低帧频(典型值为 10 frame/s)成像^[3-4]。

为了克服点扫描共聚焦成像速率慢的不足,文献[3-4]提出了线扫描共聚焦成像技术。该成像技术同样基于共聚焦成像原理,以线光束作为光源,仅需一维扫描即可对样品成像,成像速率大大提高;在探测器前放置狭缝消除了非聚焦平面杂散光对成像的影响,提高了系统的成像分辨率和信噪比;系统光路结构更加简单,硬件成本也因此而降低。该成像技术自提出以来,经过不断的改进和发展,在生物医学成像中的应用越来越广泛。既能用于对眼底视网膜快速成像,消除视网膜成像中的帧内和帧间图像抖动,得到大视场、高分辨率的眼底图像,又能用于

对生物组织细胞的离体或在体成像,从而对组织细胞的生理状态进行动态观察和实时检测,目前已成为研究细胞生物学、遗传学、免疫学以及病理学的分析工具。本文介绍了该成像技术的基本原理,列举了其参数及影响因素,并举例说明了其在生物医学成像,尤其是眼底成像和生物组织细胞观察等方面的应用,最后总结了该技术的优缺点及应用前景。

2 原理及参数

线扫描共聚焦成像最初用于追踪和消除眼底抖动,改善眼底成像质量。其结构如图 1^[5]所示。该系统共包括 2 个部分,一部分是线扫描眼底成像系统,用于对眼底视网膜成像,另一部分是视网膜追踪模块,用于追踪并消除眼底抖动。激光二极管(LD)光源发出的光线经过成像振镜(IG)反射形成扫描光线,穿过扫描透镜(SL)和眼底透镜(OL)成像透镜组到达眼底,眼底反射光经过成像透镜组,一部分经过追踪振镜(TG)进入包括高频扫描镜(DS)和追踪反射镜(TR)的视网膜追踪模块,另一部分穿过扫描振镜和成像透镜 L,到达探测器后成像。

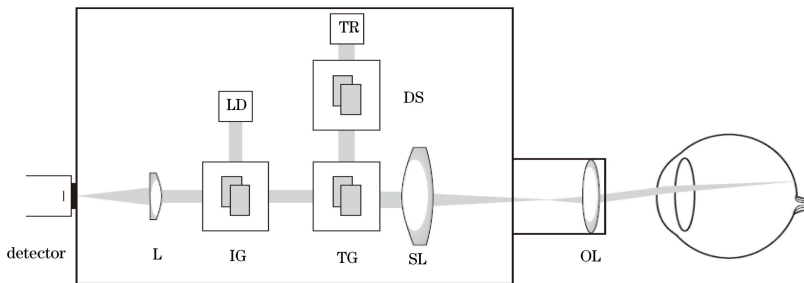


图 1 线扫描共聚焦成像系统结构示意图^[5]

Fig. 1 Structure diagram of confocal line scanning imaging system^[5]

上述设备利用振镜等扫描器件使线光束一维扫描并照明样品而成像,同时采用线阵电荷耦合器件(CCD)探测器采集样品的反射光或荧光成像,因此被称为线扫描共聚焦成像。由于线阵 CCD 仅有一维排布的像素,因此可将其等效为共焦狭缝,通过确保样品与 CCD 之间的共轭关系来滤除非聚焦层面的杂散光。采用此成像技术,仅需一维扫描即可获得近共聚焦分辨率的样品图像,成像速率大大提高;同时还能无损地实时观察样品。近年来,线扫描共聚焦成像设备被广泛应用于生物医学成像的各个方面。随着扫描器件和加工技术的发展,成像速率越来越快,帧频最高可达每秒上百帧,同时呈现出了高

分辨率、小型化、多功能化的发展趋势。

2.1 分辨率

在共聚焦成像中,仅有物镜聚焦平面的光能够到达探测器成像,因此共聚焦系统具有较高的横向分辨率和轴向分辨率,其光学分辨率理论上可以达到衍射极限^[6-7]。横向分辨率 R_{lateral} 和轴向分辨率 R_{axial} 的数值取决于物镜数值孔径 NA 和光源波长 λ , 即

$$R_{\text{lateral}} = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad (1)$$

$$R_{\text{axial}} = \frac{1.14\lambda}{NA}. \quad (2)$$

横向分辨率和轴向分辨率检测结果如图 2^[8]所示。系统的实际横向分辨率通过分辨率鉴别板检测,分辨率鉴别板上有不同空间频率的线对,系统对分辨率板成像时能够分辨的最高线对数值认定为系统的横向分辨率。对于轴向分辨率,一般用轴向返回光强度的半峰全宽表示^[9-10]。轴向分辨率的具体检测方法如下:以平板玻璃^[9](或荧光小球^[11-12])作为样品,利用轴向平移台将样品沿着同一方向移动,

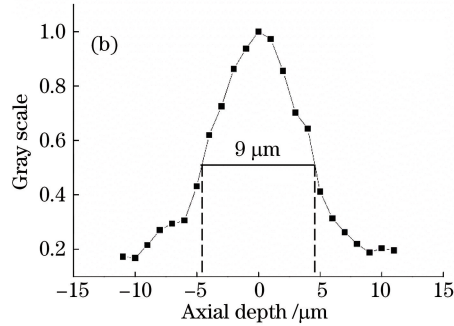
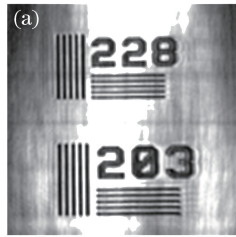


图 2 (a)横向分辨率^[8]和(b)轴向分辨率的检测结果^[8]

Fig. 2 Detection results of (a) lateral resolution^[8] and (b) axial resolution^[8]

2.2 放大倍率

在线扫描共聚焦成像系统中,眼底成像设备的放大倍率一般为 7~10 倍,而显微设备通常使用放大倍数为 20 或 40 的物镜对样品进行成像,其放大倍率通常更高。由于样品聚焦层面与探测器之间存在共轭关系,因此系统的放大倍率 M 取决于探测器前成像透镜焦距 f_{image} 与照明光路中照明透镜焦距 f_{light} 的比值^[8],即

$$M = \frac{f_{\text{image}}}{f_{\text{light}}} \quad (3)$$

2.3 成像速率和成像视场

成像速率(或成像帧频)取决于扫描器件的扫描速度和探测器件的曝光时间。常见的扫描方式有振镜扫描^[10]、声光扫描^[13]、微机电系统扫描^[14]等。声光调制器作为偏转器件近年来才被广泛使用,系统成像速率可达到每秒上百帧,但是其偏转角度会随着光源波长的变化而变化,而且光透过率较低,会造成较大的光能损失。微机电系统(MEMS)通常用于微型成像设备,成本一般比较高,而且需要根据实际要求来定制元件。检流计扫描方式成本低廉,稳定可靠,是最常用的扫描方式,目前报道的检流计扫描成像速率最大可达 200 frame/s。

系统的成像视场与线光束长度、扫描器件的偏转角度有关:线光束越长,视场越大;扫描器件的转

使用探测器记录返回光强度,然后将样品轴向高度与探测器检测到的返回光强度进行拟合,得到返回光强度的半峰全宽即可认为是系统的轴向分辨率。通常,线共焦眼底成像设备的横向分辨率为 50 μm ;线共焦显微镜的横向分辨率较高(3~5 μm),最高可达 1 μm ,纵向分辨率约为 10 μm ,而动植物细胞直径通常为 5~20 μm ,因此足以对各类组织细胞清晰成像。

动角度一般通过电压控制,控制电压越大,扫描器件的转动角度越大,成像视场也越大。线共焦眼底成像设备的视场角通常在 30°左右,通过图像拼接等图像处理方法可以得到视场更大的眼底图像;线共焦显微成像设备的视场通常较小,与系统物镜的放大倍率有关。

成像速率与成像视场会相互影响,由于扫描器件的响应速率有限,因此成像视场越大,完成一次扫描所需时间越长,成像速率就越慢。在实际应用中,需要综合考虑成像速率与成像视场之间的相互影响,确定成像时系统的参数设置。在对眼底血管成像时,由于视网膜的大小确定,因此为了更快速地成像,消除眼底抖动对成像质量的影响,系统视场角大都在 30°左右(1°视场角对应 300 μm);而离体细胞成像对成像速率的要求不高,在确保分辨率的前提下,成像视场越大越好。

3 生物医学中的应用

线扫描共聚焦成像技术在生物医学成像领域中的应用主要有 2 个方向:一是利用其成像快、视场大的优点,消除眼球震颤和自主抖动引起的图像抖动,提高眼底成像时的分辨率和成像速率,获得大视场高清眼底图像;另一个是用于生物细胞观察的显微镜成像系统,充分利用该技术成像分辨率高、非侵入检测的优点,观察离体细胞或在体生物组织细胞。

该成像技术还可以与其他成像技术相结合,得到更丰富的样品图像信息。

3.1 眼底成像

人眼存在高频(最高可达 100 Hz)生理性颤动^[15],对眼底进行成像时,如果成像帧频较低,得到的眼底图像就会存在帧间抖动,而且在同一帧图像内也会存在图像模糊和抖动的情况,不利于对眼底图像的定量分析^[15]。提高成像速率可以消除人眼生理性颤动对眼底图像的大部分影响,当成像速率高于眼睛视网膜抖动的频率时,人眼生理性颤动对成像的影响大大减小。线扫描共聚焦成像快,每秒成像帧数可达几十甚至上百,因此该成像技术最先

用于消除视网膜成像的帧内、帧间抖动对眼底成像的影响。

Hammer 等^[5]将线扫描共聚焦系统集成到眼底成像系统中,以消除眼底抖动对成像的影响,从而改善眼底成像质量,其追踪速度接近 500 (°)/s(眼底 1°视场角对应 300 μm)。图 3^[5]所示为未消除抖动和高帧频消抖后的视网膜图像。由图 3 可知,消除抖动后,图像的清晰度大幅提升。何益等^[4]提出的线扫描共聚焦眼底成像系统使用高速扫描振镜和高速线阵 CCD 得到大视场眼底成像,系统分辨率可达 10 μm,成像帧频约为 110 frame/s,略高于眼底抖动的频率,基本消除了眼底抖动对成像的影响。

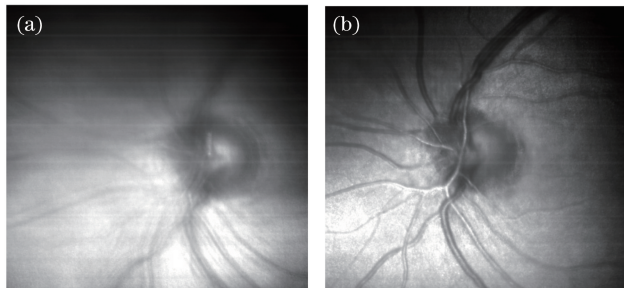


图 3 (a)未消除抖动和(b)高帧频消抖后的视网膜图像^[5]

Fig. 3 Fundus images (a) without shake cancellation and (b) with shake cancellation by using high frame frequency^[5]

线扫描共聚焦除了用于消除眼底抖动,改善成像质量外,还能用于得到高分辨率的大视场眼底血管图像。与眼底相机等常见的眼底血管观察手段相比,其成像更快。一些全身性疾病,如高血压^[16]、糖尿病^[17]、慢性肾功能病^[18]等会导致眼底血管病变,因此可以通过对眼底血管的观察作为此类疾病的初

期诊断依据。Hammer 等^[19]提出的线扫描共聚焦检眼镜以 66 D 的裂隙灯前置镜作为照明物镜,得到了视场角约为 29°的眼底图像(如图 4 所示,箭头所指位置为黄斑中心凹,比例尺对应 5°眼底视场角),系统横向分辨率约为 56 μm,成像速率为 15 frame/s。

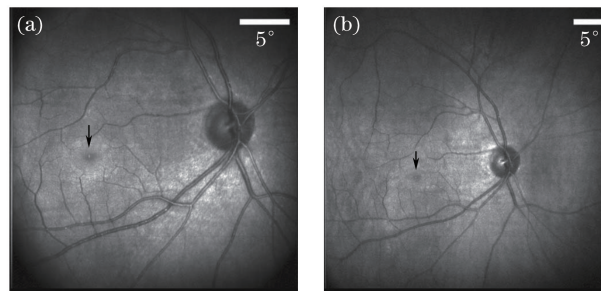


图 4 (a) 40 D 和(b) 66 D 屈光度眼底镜下的眼底血管图像^[19]

Fig. 4 Fundus vessel images with (a) 40 D and (b) 66 D ophthalmoscopic lenses^[19]

线扫描共聚焦成像技术还能通过特定波长光源激发眼底荧光,与眼底荧光造影(FFA)等方法结合起来对眼底血管进行成像。与临床上常用的眼底相机拍摄眼底荧光造影来获取单帧图像的成像方式相比,线扫描共聚焦检眼镜可以对眼底血管进行实时成像,观察造影剂在眼底血管中的动态变化过程。

同时,相对于眼底相机使用闪光灯或大功率卤素灯照明成像,该技术使用小功率激光光源对眼底扫描成像,患者的舒适度更高。

3.2 生物细胞成像

与点扫描共聚焦相比,线扫描成像更快,光路结构相对简单,成本更低,系统分辨率可达病理切片水

平,同时还是一种非侵入式检测方法,因此被广泛应用于离体或在体生物组织成像,对细胞的生理状态进行实时动态观察和检测。

为了更好地突出样品特性,细胞成像中常用荧光蛋白标记样品并激发荧光成像。Mei等^[7]以二向色镜作为扫描器件,进一步简化系统结构,成像系统使用20倍物镜,分辨率可达 $2.1\ \mu\text{m}$ 。为了更快地成像,Im^[13]等以声光调制器(AOD)作为光偏转装置,系统结构及横向分辨率检测结果如图5所示。

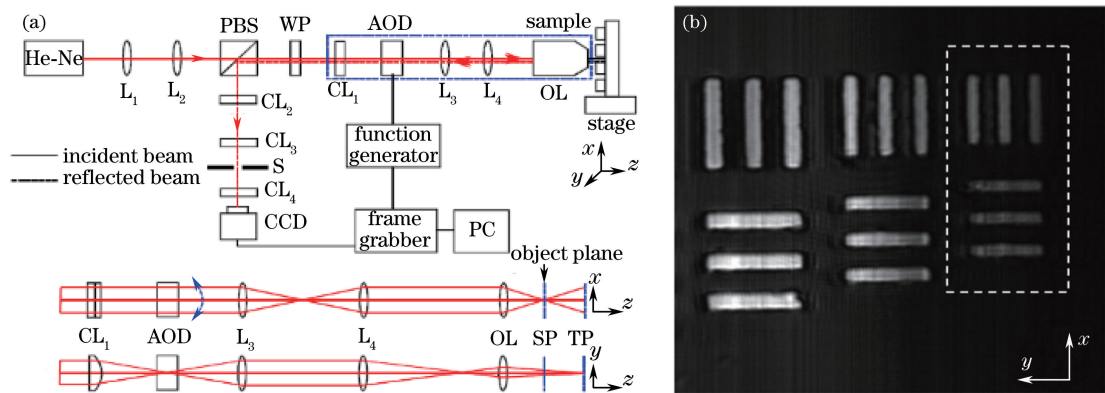


图5 (a)以AOD为光偏转装置的成像系统结构及(b)横向分辨率检测结果^[13]

Fig. 5 (a) Imaging system structure with AOD as light deflection device and (b) its lateral resolution detection result^[13]

线扫描共聚焦不仅可用于荧光成像,还能通过样品反射光直接对样品成像。孔文等^[8]利用图6(a)所示的线扫描共聚焦显微成像系统,通过线阵CCD收集样品反射光成像。由于线阵CCD仅有一维排布的像素,因此可以将其等效成狭缝,以滤除杂散光。图6(b)所示为利用线扫描共聚焦显微成像系

统对植物叶片细胞进行成像的结果。该成像系统的横向分辨率为 $2.1\ \mu\text{m}$,轴向分辨率约为 $9\ \mu\text{m}$,成像视场大小为 $700\ \mu\text{m} \times 700\ \mu\text{m}$ 。系统使用28 kHz线阵CCD以 $512\ \text{pixel} \times 2048\ \text{pixel}$ 的图像分辨率成像,帧频可达50 frame/s(使用更快频率的相机可以达到更高的成像速率)。

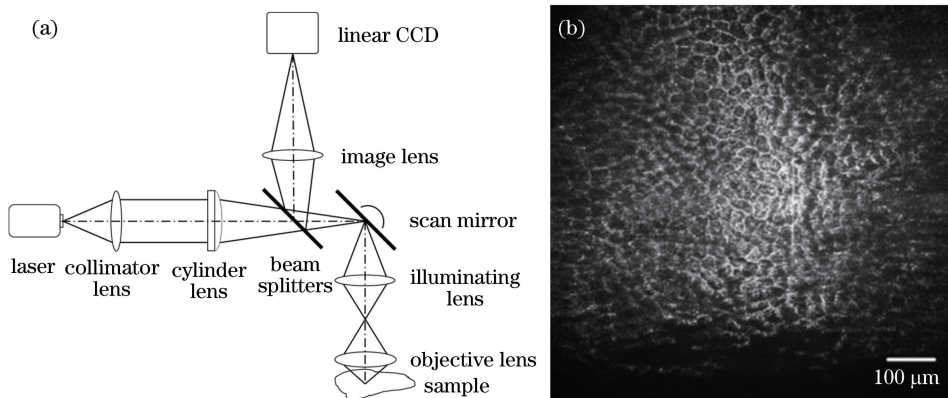


图6 (a)线扫描共聚焦显微镜光路结构^[8]; (b)植物叶片细胞成像结果^[8]

Fig. 6 (a) Light path of confocal line scanning microscopy^[8]; (b) imaging result of plant leaf cells^[8]

除此之外,反射式线共焦还能够用于对皮肤细胞进行无损的动态、实时成像,临床上越来越多地利用皮肤细胞的共聚焦成像结果对常见皮肤疾病进行诊断、鉴别诊断及疗效检测。Dwyer等^[20-21]提出如

图7所示的共聚焦 θ 线扫描显微镜用于对皮肤细胞在体成像,该系统使用分光条将物镜分为2个部分,光源经过物镜一侧的照明孔聚焦到样品上,成像光从物镜另一侧的成像孔径反射到达探测器成像,而

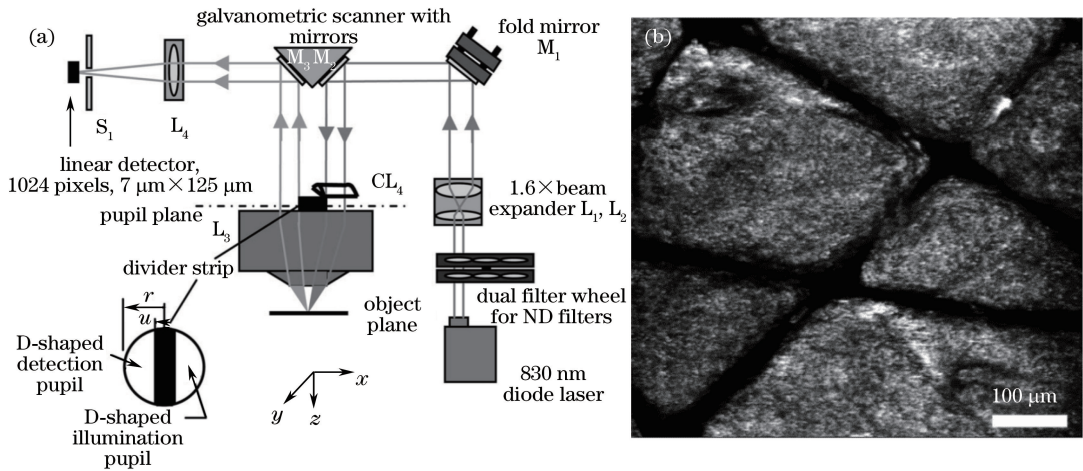


图 7 (a) 共聚焦 θ 线扫描显微镜示意图及 (b) 皮肤细胞的在体成像结果^[21]

Fig. 7 (a) Schematic for confocal theta line scanning microscope and (b) *in vivo* imaging result of skin cells^[21]

物镜中心部分没有光通过, 这种照明和成像方式可以有效减少因物镜表面反射引起的噪声。该系统的成像分辨率为 $1\sim 2\ \mu\text{m}$, 视场大小为 $0.5\sim 1\ \text{mm}$, 成像速率为 $5\sim 20\ \text{frame/s}$ 。由于使用了近红外波长, 因此可以穿透皮肤细胞进行成像, 最大穿透深度为 $100\ \mu\text{m}$ 。

利用反射光成像时, 成像光束一般先经过照明光路传递。Chen 等^[22]提出了双轴线扫描共聚焦显微镜的成像系统, 该系统结构及横向分辨率检测结果如图 8(a) 和图 8(b) 所示。激光点光源发出的光线经过照明光路 (L_1 、 C_1 、 L_1) 到达样品, 通过振镜对

样品扫描, 样品产生的成像光由振镜反射, 无需分光镜即可进入成像光路 (L_1 、长通滤波片、 L_2) 到达探测器成像, 减小了照明光路中镜面反射等原因对成像结果的影响。该双轴共聚焦显微成像系统视场的大小为 $250\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$, 横向分辨率为 $1.23\ \mu\text{m}$, 轴向分辨率为 $2.2\ \mu\text{m}$, 成像速率可达 $30\ \text{frame/s}$ 。Yin 等^[14]研制出了手持式双轴线共聚焦显微镜, 如图 8(c) 所示。使用微电机系统驱动光束扫描, 以缩小整体的体积, 系统横向分辨率和轴向分辨率分别为 $1.1\ \mu\text{m}$ 和 $2\ \mu\text{m}$, 视场大小为 $200\ \mu\text{m}$, 成像速率为 $16\ \text{frame/s}$ 。

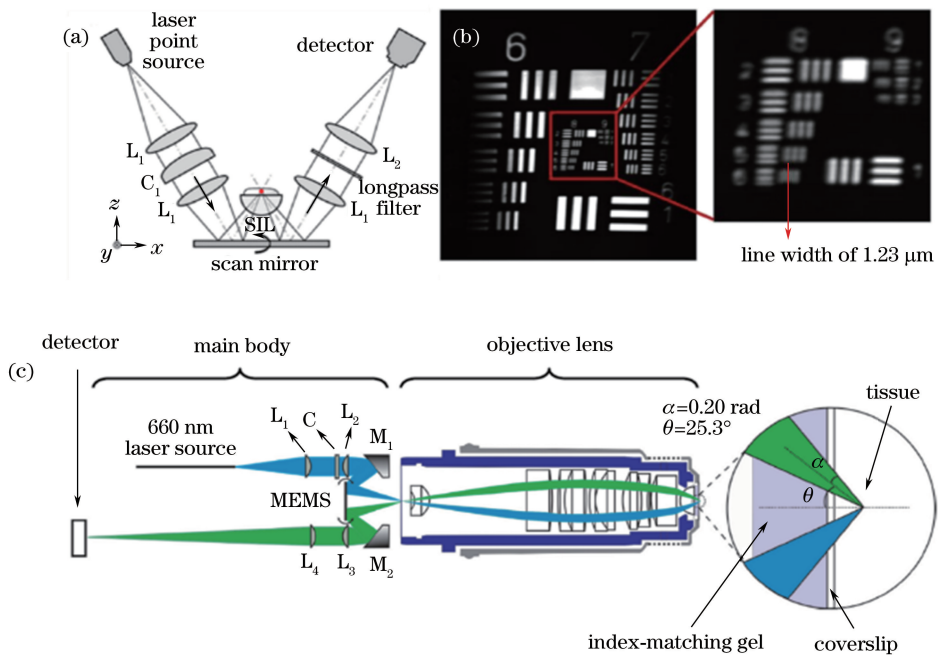


图 8 (a) 双轴线扫描共聚焦系统结构^[22]; (b) 横向分辨率检测结果^[22]; (c) 手持式双轴共聚焦显微镜结构图^[14]

Fig. 8 (a) Structure of dual-axis scanning confocal system^[22]; (b) detection result of lateral resolution^[22];

(c) structure of handle dual-axis confocal microscope^[14]

3.3 与其他成像技术的结合

光学相干层析成像(OCT)是一种眼科常用的眼底成像方法,一般通过双振镜扫描对眼底成像。Iftimia等^[23]将线扫描共聚焦成像与OCT相结合,使用同一套扫描振镜系统,用2种成像方法同时对眼底扫描成像。OCT在视网膜深度方向成像,线扫描共聚焦对视网膜血管成像,为眼科临床检查提供了更丰富的检测结果。

在眼底成像中,自适应成像技术可用于修正和消除系统像差,从而改善系统的成像质量, Muja等^[24]将自适应成像技术引入到线扫描共聚焦眼底成像中,利用波前传感器(WS)检测系统像差,通过

变形镜矫正系统像差,成像帧频可达70 frame/s,视场大小为1.6 mm(眼底视场角为 5.5°)。Lu等^[25]同样提出了自适应高速线扫描共聚焦眼底成像系统,该系统结构及其成像结果如图9所示。光源LS1和LS2发出的光线首先被二向色镜(DF)合为一束,经过光路S1~S6、DM、GS、FM传递到达人眼,返回光经光路反射到达WS,WS将探测到的人眼像差传递到计算机,计算机通过控制变形镜(DM)对照明光进行矫正,以减小成像像差,最终到达探测器,以 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 对眼底成像,成像速率最快可达200 frame/s,同时系统成像质量很好,能够清晰分辨眼底细胞。

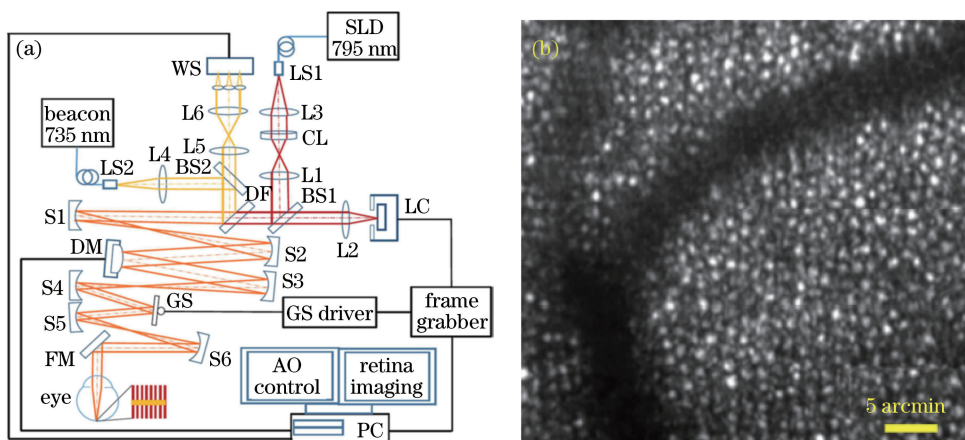


图9 (a) 自适应线扫描共聚焦眼底成像系统结构及其(b)成像结果^[25]

Fig. 9 (a) Structure of adaptive confocal line scanning fundus imaging system and its (b) imaging result^[25]

除了通过提高扫描器件速度来提高系统帧频外,还能使用多条平行线光束同时对样品扫描来提高成像速率。Vienola等^[26]以数字微镜阵列(DMD)作为扫描器件,通过控制DMD每列像素的

偏转角度来生成多条平行线光束,同时对样品扫描成像,平行线扫描检眼镜结构及其成像结果如图10所示。系统成像速率可达100 frame/s,横向分辨率为 $3.91 \mu\text{m}$,眼底成像视场可达 $10^\circ \times 10^\circ$ 。

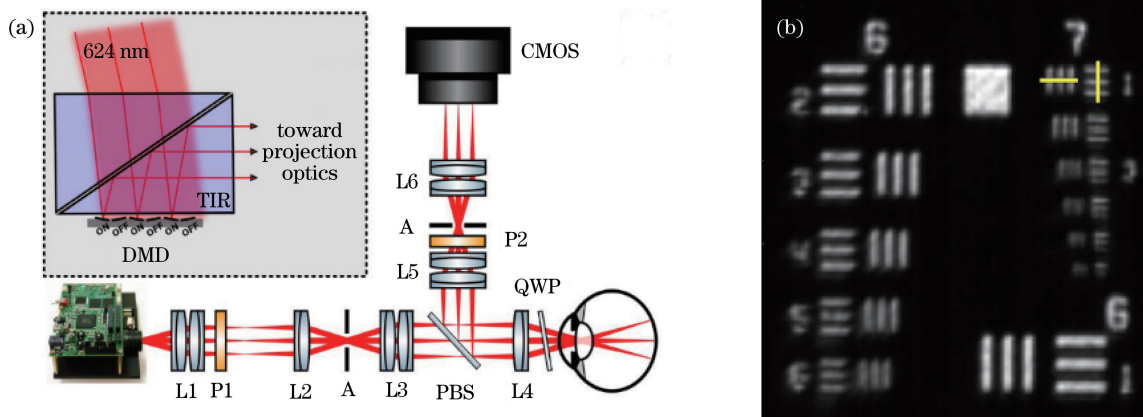


图10 (a) 平行线扫描检眼镜结构及其(b)成像结果^[26]

Fig. 10 (a) Structure of parallel line scanning ophthalmoscope and its (b) imaging result^[26]

与激光器相比,发光二极管(LED)光源的成本更低。随着LED工艺的进步,大功率、高亮度LED光源已能在一定程度上代替激光光源照明,从而降低系统成本。Vakili等^[27]以高亮度线阵LED作为线扫描共聚焦显微镜的光源,使用柱面镜和狭缝形成线光,通过扫描振镜驱动线光对样品扫描成像,其他光路结构与现有的线扫描共聚焦显微镜相似,系统成像视场大小为77 μm ,横向分辨率为1.35 μm ,轴向分辨率为1.76 μm 。

通常,系统的成像视场取决于线光束长度和扫描角度。Carucci等^[28]使用长度为6 mm的线光束扫描照明样品,利用移动量程为50 mm的平移台移动样品以得到高分辨率、大视场人体皮肤图像,系统图像的横向分辨率为5 μm 。由于成像视场大,分辨率高,因此可在临床上作为辅助设备,获取当前手术部位图像并进行分析。

4 结束语

在眼底成像领域中,线扫描共聚焦主要用于快速获得高分辨率、大视场的眼底图像。该技术最先被集成在眼底成像系统中,用于消除帧间和帧内图像抖动,得到更清晰的眼底图像。在此基础上研制的线扫描共聚焦检眼镜可采集大视场眼底血管图像,用于分析眼底血管的生理状态,可作为高血压、糖尿病等全身性疾病发病初期的诊断依据。

在细胞成像领域,线共焦显微镜具有成像快、分辨率高、非侵入式地对生物组织细胞成像的特点,不仅满足了临床上对组织细胞在体观察的要求,还省去了复杂的样品制备过程。观察后的细胞仍可用于其他研究,提高了样品的利用率,在一定程度上降低了实验成本。据此研制的反射式线扫描共聚焦皮肤细胞检查设备可以对皮肤细胞实时成像,用于对常见皮肤疾病进行诊断、鉴别诊断及疗效检测。

为了得到更丰富的样品信息,扩大应用领域,还可将线扫描共聚焦成像技术与其他成像技术相结合。线扫描共聚焦成像技术与OCT成像技术相结合,能够同时获取平面和轴向方向上的样品信息,构建更精细的三维模型;线扫描共聚焦成像技术还可与自适应眼底成像技术相结合,高速采集眼底的高分辨率图像。

线扫描共聚焦成像技术也存在一些不足。由于只使用了一维共聚焦,因此其成像分辨率略低于点扫描共聚焦成像的分辨率;但是,该技术因成像快、分辨率高、非侵入式成像等优点而被广泛应用于生

物医学成像领域。充分利用这些优点还可以进一步扩大其应用范围:

1) 通过进一步提高成像帧频和成像分辨率,可以拍摄细胞生命活动中的超快过程,提供研究细胞生命活动的新方法;还可以利用不同轴向深度的图像对样品进行三维重构,快速绘制高分辨率的样品三维重构模型;

2) 充分利用该技术光路简单、结构紧凑的优势,优化系统的光路结构和成像效果,将其设计成便携式成像设备,为样品的现场快速检测提供新方法;

3) 在线扫描共聚焦系统中使用多波长光源照明样品,研究不同波长照明条件下的样品特性,同时获得样品的图像信息和光谱信息;

4) 将其与内窥成像结合制成内窥式快速成像设备,用于体内成像,得到细胞级分辨率的病灶图像。

总之,由于线扫描共聚焦成像技术使用线光束一维扫描成像和共聚焦成像原理,因此在高速成像和高分辨率成像领域具有天然的优势,在高速生物成像方面具有广阔的发展前景。

参 考 文 献

- [1] Minsky M. Microscopy apparatus: US3013467 [P]. 1961-12-19.
- [2] Liang R G. Biomedical optical imaging technologies: design and applications [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2012.
- [3] Brown C M, Dalal R B, Hebert B, *et al.* Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope [J]. *Journal of Microscopy*, 2008, 229(1): 78-91.
- [4] He Y, Shi G H, Lu J, *et al.* High-speed line scanning confocal laser ophthalmoscope [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(1): 0117001.
何益, 史国华, 卢婧, 等. 高速线扫描共聚焦检眼镜 [J]. *光学学报*, 2012, 32(1): 0117001.
- [5] Hammer D X, Ferguson R D, Magill J C, *et al.* Image stabilization for scanning laser ophthalmoscopy [J]. *Optics Express*, 2002, 10(26): 1542-1549.
- [6] Wolleschensky R, Zimmermann B, Kempe M. High-speed confocal fluorescence imaging with a novel line scanning microscope [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(6): 064011.
- [7] Mei E, Fomitchov P A, Graves R, *et al.* A line scanning confocal fluorescent microscope using a

- CMOS rolling shutter as an adjustable aperture[J]. *Journal of Microscopy*, 2012, 247(3): 269-276.
- [8] Kong W, Lang T T, Gao F, *et al.* Design of high-resolution wide field of view confocal line scanning laser microscopy[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2017, 44(6): 616-620.
孔文, 郎婷婷, 高峰, 等. 高分辨率大视场线扫描共焦显微镜的设计与研制[J]. *光电工程*, 2017, 44(6): 616-620.
- [9] Gareau D S, Abeytunge S, Rajadhyaksha M. Line-scanning reflectance confocal microscopy of human skin: comparison of full-pupil and divided-pupil configurations[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(20): 3235-3237.
- [10] Gareau D S, Rajadhyaksha M, Abeytunge S. Engineering of a line-scanning confocal microscope toward imaging epithelial tissues[C]// *Proceedings of Conference on Biomedical Optics*. [S.l.]: [s. n.], 2008: BTuF66.
- [11] Wang D, Meza D, Wang Y, *et al.* Sheet-scanned dual-axis confocal microscopy using Richardson-Lucy deconvolution[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(18): 5431-5434.
- [12] Simon B, DiMarzio C A. Simulation of a theta line-scanning confocal microscope [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(6): 064020.
- [13] Im K B, Han S, Park H, *et al.* Simple high-speed confocal line-scanning microscope [J]. *Optics Express*, 2005, 13(13): 5151-5156.
- [14] Yin C, Glaser A K, Leigh S Y, *et al.* Miniature *in vivo* MEMS-based line-scanned dual-axis confocal microscope for point-of-care pathology [J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(2): 251-263.
- [15] He Y. Human retina motion measurement with high speed line scanning confocal fundus imaging system [D]. Chengdu: University of Chinese Academy of Sciences, 2013
何益. 高速线扫描共焦眼底成像技术及其在人眼视网膜抖动检测中的应用研究[D]. 成都: 中国科学院大学, 2013.
- [16] Liew G, Wang J J, Cheung N, *et al.* The retinal vasculature as a fractal: methodology, reliability, and relationship to blood pressure[J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(11): 1951-1956.
- [17] Wong T Y, McIntosh R. Systemic associations of retinal microvascular signs: a review of recent population-based studies [J]. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 2005, 25(3): 195-204.
- [18] Edwards M S, Wilson D B, Craven T E, *et al.* Associations between retinal microvascular abnormalities and declining renal function in the elderly population: the cardiovascular health study [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2005, 46(2): 214-224.
- [19] Hammer D X, Ferguson R D, Ustun T E, *et al.* Line-scanning laser ophthalmoscope [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(4): 041126.
- [20] Dwyer P J, DiMarzio C A, Rajadhyaksha M. Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues *in vivo* [J]. *Optics and Photonics News*, 2006, 17(12): 32.
- [21] Dwyer P J, DiMarzio C A, Zavislan J M, *et al.* Confocal reflectance theta line scanning microscope for imaging human skin *in vivo* [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(7): 942-944.
- [22] Chen Y, Wang D N, Khan A, *et al.* Video-rate *in vivo* fluorescence imaging with a line-scanned dual-axis confocal microscope [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(10): 106011.
- [23] Ifimia N V, Hammer D X, Bigelow C E, *et al.* Hybrid retinal imager using line-scanning laser ophthalmoscopy and spectral domain optical coherence tomography[J]. *Optics Express*, 2006, 14(26): 12909-12914.
- [24] Mujat M, Ferguson R D, Ifimia N, *et al.* Compact adaptive optics line scanning ophthalmoscope [J]. *Optics Express*, 2009, 17(12): 10242-10258.
- [25] Lu J, Gu B Y, Wang X L, *et al.* High-speed adaptive optics line scan confocal retinal imaging for human eye[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0169358.
- [26] Vienola K V, Damodaran M, Braaf B, *et al.* Parallel line scanning ophthalmoscope for retinal imaging[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(22): 5335-5338.
- [27] Vakili A, Xiong D X, Rajadhyaksha M, *et al.* Line-scanning confocal microscope utilizing high brightness LED [C]// *Proceedings of 40th Annual Northeast Bioengineering Conference*. [S.l.]: [s. n.], 2014: 1-2.
- [28] Carucci J A, Stevenson M, Gareau D. Line-scanning, stage scanning confocal microscope [C]. SPIE, 2016: 97030F.