

高收集效率双光子内窥镜物镜的光学设计

吴丹磊¹, 冯丽爽¹, 王爱民^{2*}

¹北京航空航天大学仪器科学与光电工程学院, 北京 100191;

²北京大学信息科学技术学院, 北京 100871

摘要 内窥镜物镜是双光子成像应用于医疗内窥成像的关键部件,物镜的成像质量和信号光收集效率对最终图像的质量至关重要。为光纤扫描式双光子成像系统设计了一款高收集效率、大视场、结构紧凑的物镜。在该系统中,920 nm 飞秒激光从双包层光纤纤芯部分射出,经过物镜后激发样本,激发出的 460 nm 二次谐波和 510 nm 荧光再次经过物镜后被收集到光纤包层中。在此过程中,为了提高荧光的收集效率,对物镜组进行轴向色差设计,以使更多的荧光进入光纤包层部分。利用 Zemax 光学设计软件进行系统优化设计,设计结果表明:物镜组在 920 nm 波长下全视场范围内的调制传递函数在 700 lp/mm 处大于 0.25,满足激发光的使用要求;在 Zemax 软件非序列模式下,将设计的物镜和传统梯度折射率物镜的信号光收集效率进行比较,仿真结果显示,所设计的物镜的信号光收集效率高达 54%,比传统梯度折射率物镜提高了 2 倍以上。

关键词 光学设计; 双光子荧光成像; 内窥镜; 收集效率

中图分类号 O436; TN202

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.071801

Optical Design of Two-Photon Endoscopy Objective with High Collection Efficiency

Wu Danlei¹, Feng Lishuang¹, Wang Aimin²

¹School of Instrumentation Science and Opto-Electronics Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

²School of Electronics Engineering and Computer Science, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract Endoscopic objectives are key components of two-photon imaging used in medical endoscopy imaging. The imaging quality and signal light collection efficiency are crucial to the final image quality. An objective lens with high collection efficiency, 400 μm field of view, and compact structure is designed for the optical fiber scanning two-photon imaging system. In this system, a 920 nm femtosecond laser emerges from a double cladding fiber and excites the sample after the objective lens. The excited 460 nm second harmonic signal and 510 nm fluorescence are collected into the fiber cladding through the objective lens. In order to improve the collection efficiency during this process, we design the axial chromatic aberration of the objective so that more signal light enters the cladding. The design of the system is optimized by Zemax software. The results show that the modulation transfer function in the whole field of the objective at 920 nm is larger than 0.25 at 700 lp/mm, which meet the requirements of the system. Meanwhile, the signal light collection efficiency of the objective lens designed in the non-sequential mode and the traditional gradient index lens is compared. The simulation results show that the signal light collection efficiency of this objective lens is 54%, which is two times higher than that of the traditional gradient index lens.

Key words optical design; two-photon fluorescence imaging; endoscopy; collection efficiency

OCIS codes 180.2520; 190.4710; 220.3620

收稿日期: 2017-11-19; 收到修改稿日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(61475008, 31327901)

作者简介: 吴丹磊(1992—),男,硕士研究生,主要从事光学设计及多光子荧光成像系统方面的研究。

E-mail: wilhelm.wdl@163.com

导师简介: 冯丽爽(1968—),女,研究员,博士生导师,主要从事微光机电系统方面的研究。

E-mail: fenglishuang@buaa.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: wangaimin@pku.edu.cn

1 引言

最早将双光子吸收这一非线性过程应用于显微成像领域是 Denk 等^[1], 他们于 1990 年制造出了第一台双光子扫描荧光显微镜。双光子荧光成像具有很深的成像深度和较高的分辨率等优点。在成像过程中, 双光子不仅会激发出生物组织的荧光信号, 还会激发出二次谐波信号。两种信号来源于不同的组织成分, 且信号波长不同, 这使得双光子荧光成像的成像结果包含更多的信息量^[2], 所以双光子显微成像技术适合应用于生物组织。Masters 等^[3]首先使用双光子显微镜对人体皮肤细胞中的自体荧光进行成像, 验证了双光子荧光成像技术可以应用于人体活细胞及组织。如果可以将台式显微镜小型化成内窥镜的形式, 就会推动双光子成像技术在术中肿瘤检测、癌症预防等医疗领域中的应用^[4]。

双光子成像采用激光点扫描成像的方式^[5]。根据扫描方式的不同, 目前小型双光子显微镜可以分为微机电系统 (MEMS) 振镜扫描和压电陶瓷管 (PZT) 驱动光纤扫描^[6]两种结构。MEMS 振镜扫描结构的扫描速度快, 但激发光和信号光需要分两路传输, 其较大的直径不利于封装成内窥镜的形式。PZT 光纤扫描结构中激发光和信号光共用一根双包层空心光纤, 共用光路的直筒状扫描结构使其可以应用在内窥镜中。

由于没有成熟的商用小物镜组, 因此, 在小型化双光子方案中, 主要采用梯度折射率透镜作为物镜^[7]。然而梯度折射率透镜存在色差较大、分辨率低和视野范围小的缺点。较大的色差导致信号光返回到光纤端面时, 弥散斑大于光纤包层的直径, 使得信号光的收集效率较低, 严重影响最终的成像质量^[8]。

针对以上问题, 本文介绍了一款基于 PZT 光纤扫描结构的高收集效率内窥镜物镜的光学系统设计, 该系统主要针对人体肠道组织进行成像。本文内容主要包括系统参数指标的确定、物镜结构的选取、激发光波段下的像质评价、信号光波段的收集效率仿真和公差分析。物镜设计在激发光波段的成像质量接近衍射极限; 通过选择玻璃材料和对物镜组进行设计, 提高了信号光的收集效率。

2 PZT 光纤扫描内窥镜的结构

PZT 光纤扫描内窥镜的结构原理图如图 1 所示^[9]。图 1(b) 中的实线为激发光, 虚线为信号光。激发光为长波长的飞秒脉冲激光, 耦合入双包层光纤, 其内包层为空心带隙传导结构, 便于飞秒激光的传输。光纤固定在 PZT 的一端, 通过给 PZT 两个方向加载特定的电压信号, 可以使 PZT 发生快速、周期性的弯曲, 带动光纤周期性抖动^[10], 从而使光纤端面扫描整个视场。激发光从双包层光纤纤芯射出, 经过物镜会聚在样本上。由于双光子激发的特点, 信号光只在焦点处产生。在本系统中, 信号光通过物镜返回到光纤端面, 进入光纤的外包层后传输到信号收集系统。信号光为低波长的连续光, 无法在光纤内包层的空心结构中传输, 所以光纤端面的有效接收区域呈环形。激发光和信号光通过同一根光纤传输, 实现点对点激发和点对点收集。收集系统记录下视场中每一个点的灰度值, 通过软件计算, 重构出完整的图像。由于激发光和信号光的波长相差很多, 收集系统通过二向色镜分光即可同时完成激发光的耦合和信号光的收集。

3 物镜优化设计

3.1 系统参数指标

肠道组织中能产生自发荧光的物质主要为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。本系统对荧光物质 FAD 进行观测, 使

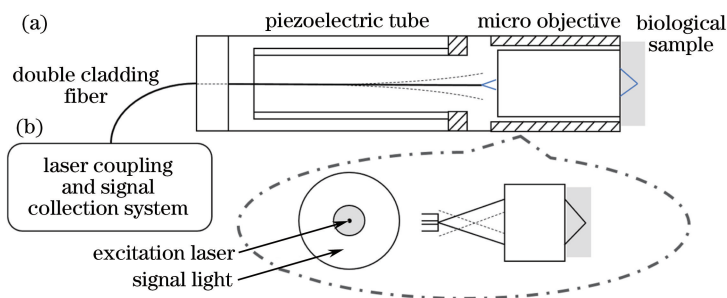


图 1 (a) PZT 光纤扫描双光子内窥镜结构原理图; (b) 信号光收集过程

Fig. 1 (a) Structural schematic of PZT based on fiber scanning two-photon fluorescence endoscopy;

(b) signal light collection process

用 920 nm 激光作为光源进行成像设计,其对应的信号波段分别为 460 nm 的二次谐波信号和 510 nm 的荧光信号^[11]。

根据双光子成像的特点可知,当激发光会聚到样本上时,只有焦点处产生信号光,并且信号光向周围整个 4π 空间角发射,所以物镜的像方数值孔径需要尽可能大。这是因为大数值孔径物镜的衍射极限更小,而且信号收集效率更高。数值孔径 NA 和信号收集效率 C 的关系为

$$NA = n \sin \theta, \quad (1)$$

$$C = \frac{\Omega_{\text{wj}}}{\Omega_{\text{qi}}} = \frac{2\pi \left(1 - \cos \frac{\theta}{2}\right)}{4\pi}, \quad (2)$$

式中: n 为生物组织液的折射率; θ 为物镜像方孔径角的一半; Ω_{wj} 为物镜收集荧光的立体角; Ω_{qi} 为荧光向整个空间辐射的立体角。光学系统为有限远显微物镜,物镜的放大倍数 M 和数值孔径的关系可以表示为

$$M = \frac{NA_w}{NA_x}, \quad (3)$$

式中: NA_w 为光纤的数值孔径; NA_x 为样本方向的数值孔径(像方数值孔径)。显微物镜的衍射极限 δ 为

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad (4)$$

式中 λ 为激发光波长。

根据内窥镜的应用需求,物镜的视场应越大越好。同时,为了提高分辨率和信号收集效率,像方数值孔径也应越大越好。然而,像方数值孔径越大,导致放大倍数越大,在光纤扫描范围一定的情况下,视场越小。故物镜的视场和数值孔径之间存在制约关系。在本系统中,光纤的扫描范围为 1.2 mm,输入光纤数值孔径 NA_w 为 0.2。本系统中所需观察的肠道样本的最小结构尺寸为 $3 \mu\text{m}$ 。综合考虑分辨率、收集效率和视场范围,选取本系统像方视场为 $400 \mu\text{m}$,比目前商用梯度折射率物镜的视野范围提高一倍^[12]。像方数值孔径 NA_x 为 0.6,物镜的衍射极限为 $0.93 \mu\text{m}$,理论收集效率为 13.6%。

因信号光通过光纤环形区域收集,同时为了提高 460 nm 和 510 nm 信号光的收集效率,故而 460 nm 信号光在光纤端面处的光斑直径应与光纤包层直径相同,如图 2 所示。由三角关系可得,物镜组在 920 nm 和 460 nm 之间的轴向色差 ΔF 应控制在 $367 \mu\text{m}$ 左右。

3.2 光学设计与像质评价

通过选择合适的初始结构和玻璃材料,利用

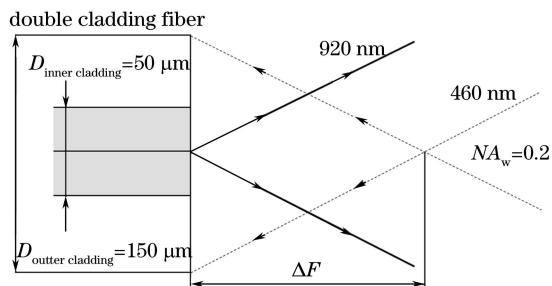


图 2 信号光轴向色差的计算示意图

Fig. 2 Schematic for calculation of axial chromatic aberration of signal light

Zemax 光学设计软件在序列模式下进行成像优化设计,得到如图 3 所示的物镜结构。物镜由 6 片透镜组成,从样本方向开始,第 1、第 2 片透镜组成齐明物镜组结构,校正大数值孔径光引入的球差;第 3、第 4 片为在光阑附近的双胶合透镜,可控制系统轴向色差达到理论计算的数值;第 5 片透镜为厚弯月透镜,用以校正系统的匹兹伐和^[13];最后通过第 6 片双凸透镜控制物方数值孔径与光纤数值孔径相匹配。考虑到第 1 片透镜与生物样本接触,所以其需要较高的耐腐蚀性,故而采用石英材料;第 2、第 3、第 6 片透镜为高折射率、高色散材料 H-ZF7LA;第 4、第 5 片透镜为普通冕牌玻璃 H-ZK11。

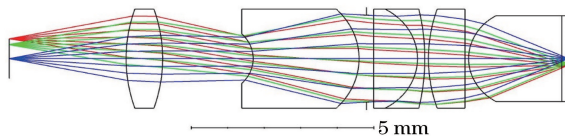


图 3 光学系统结构图

Fig. 3 Layout of optical system

整个系统的通光直径为 2.8 mm,系统总长为 15.3 mm。由于内窥镜需要紧贴生物组织使用,且观测目标区域在组织表面以下约 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ ^[14],故物镜像方的工作距离为 $150 \mu\text{m}$,介质为生理盐水。由于生物组织为厚样本,双光子的轴向分辨率为 $5 \mu\text{m}$ 左右,故优化过程中在朝向物镜的像面上引入了 $5 \mu\text{m}$ 的矢高差,以降低对光学系统场曲的要求。为提高成像质量,边缘视场引入了 7% 的渐晕。最终优化得到系统在 700 lp/mm 处的对比度大于 0.25,如图 4 所示。系统的场曲在 $5 \mu\text{m}$ 以内,全视场畸变在 0.3% 以内,如图 5 所示。综上可知,成像质量符合系统指标要求。

3.3 收集效率仿真

利用 Zemax 光学设计软件的非序列模式仿真

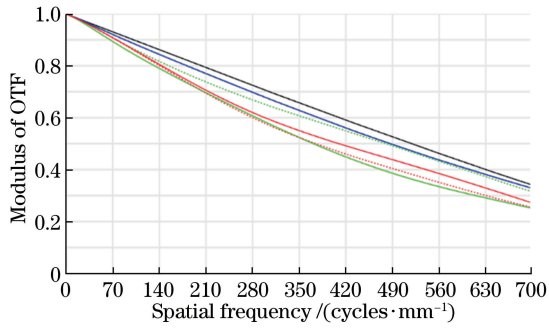


图4 光学传递函数曲线

Fig. 4 Curves of optical transfer function

光纤环形包层对信号光的收集效率。由于生物组织并非完全透明,光在组织中传播时会发生一定程度的散射,导致信号光到达光纤端面时,小部分能量溢出理论圆形光斑区域^[15],如图6所示。

光源为 4π 空间角发射的点光源,总功率为 1 mW。探测器置于光纤端面处,通过物镜收集到

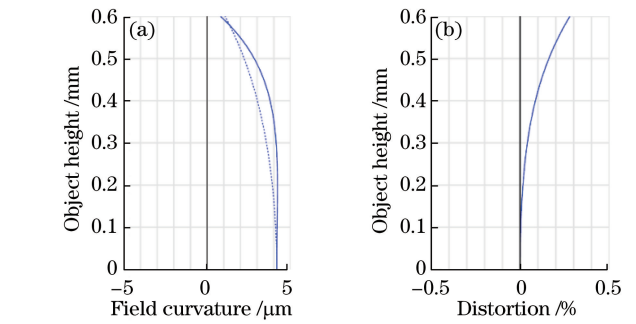
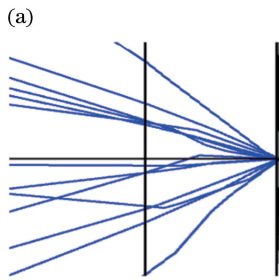


图5 (a)场曲和(b)畸变

Fig. 5 (a) Field curvature and (b) distortion

0.190 mW 的能量,为光源总能量的 19%,其值大于理论计算的 13.6%。这主要是因为样本存在散射,使得一部分本不能进入光学系统的光因散射而进入到系统,并被探测器接收。通过在探测器前添加与光纤外包层尺寸相同的环形光孔,即可模拟包层对信号光的收集过程。模拟结果如图7所示,探测器

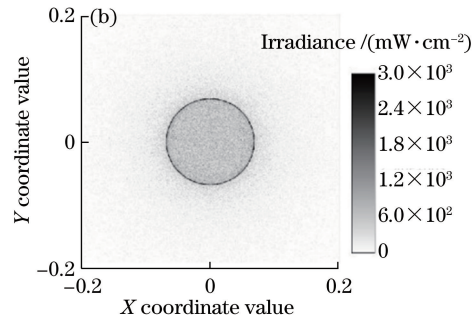


图6 (a)生物样本的散射;(b)信号光在光纤端面上的强度分布

Fig. 6 (a) Scattering of biological sample; (b) intensity distribution of signal light on fiber tip

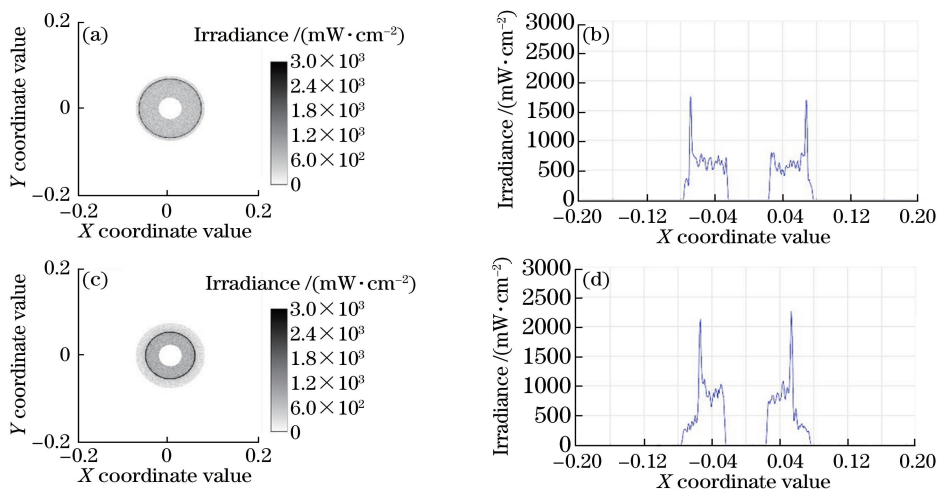


图7 模拟光纤包层接收 460 nm 波段信号光的(a)强度分布和(b)截面图以及接收 510 nm 波段信号光的(c)强度分布和(d)截面图

Fig. 7 (a) Intensity distribution and (b) cross section profile of received signal light with 460 nm waveband, (c) intensity distribution and (d) cross section profile of received signal light with 510 nm waveband in a simulated fiber cladding

接收 460 nm 波段信号光的二次谐波信号能量为 0.103 mW, 收集效率为 54%; 接收 510 nm 波段信号光的荧光信号能量为 0.105 mW, 收集效率为 55%。

常用的梯度折射率物镜的直径为 1.4 mm, 总长为 7.65 mm, 其像方数值孔径为 0.8, 成像视场为 130 μm 。软件不能在非序列模式下对梯度折射率透镜建模。为了验证收集效率提高的程度, 在序列

模式下计算梯度折射率透镜的轴向色差, 在非序列模式下沿光轴方向平移探测器来等效梯度折射率透镜引入的轴向色差, 进而模拟光纤收集效率。仿真结果如图 8 所示: 探测器接收 460 nm 波段信号光的能量为 0.028 mW, 为本课题组设计物镜收集效率的 27.1%; 接收 510 nm 波段信号光能量为 0.045 mW, 为本课题组设计物镜的 43.4%。收集效率提高 2 倍以上。

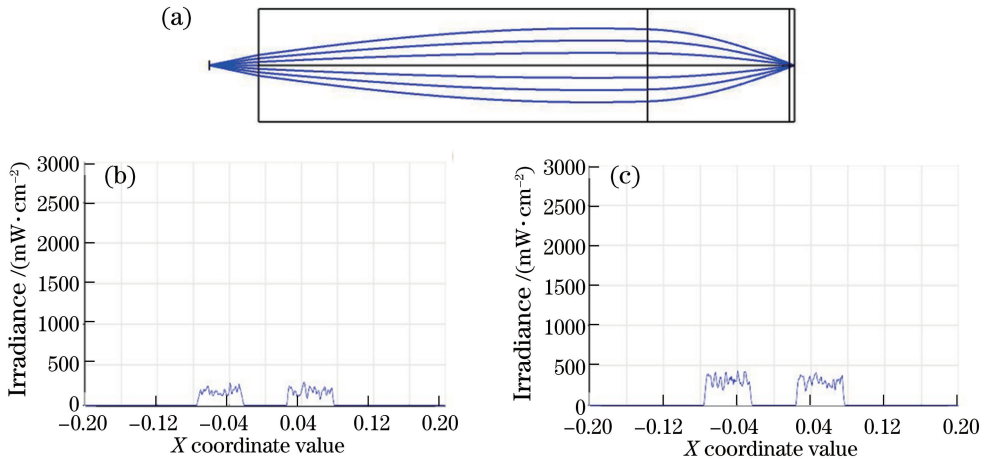


图 8 (a) 梯度折射率物镜结构; (b) 460 nm 波段信号光收集能量截面图; (c) 510 nm 波段信号光收集能量截面图

Fig. 8 (a) Structure of gradient index lens; (b) cross section of received energy of signal light with 460 nm waveband; (c) cross section of received energy of signal light with 510 nm waveband

4 公差分析

考虑到物镜的可加工性, 设计的物镜共 11 个面, 共选用了 5 个不同的曲率半径, 并按照表 1 提供的公差数据进行公差分析。其中将样本方向的像面距离作为补偿器。以 700 lp 处的平均调制传递函数 (MTF) 为标准, 原始设计为 $\text{MTF}@700 \text{ lp} > 0.29$, 公差分析显示物镜设计 80% 概率以上 $\text{MTF}@700 \text{ lp} > 0.2$ 。公差分析结果表明, 现有的加工和装配水平可以满足系统的设计要求。

表 1 公差数据

Table 1 Tolerance data

Item	Value
Radius /fringe	± 3
Thickness /mm	± 0.03
Surface tilt /($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)	± 30
Surface decenter /mm	± 0.005
Element tilt /($\text{rad} \cdot \text{min}^{-1}$)	± 10
Element decenter /mm	± 0.01
Surface irregular /fringe	± 0.5
Refractive index	± 0.0001
Abbe number /%	± 0.5

5 结 论

设计了一款针对 PZT 光纤扫描双光子内窥镜结构的内窥镜物镜。通过控制轴向色差, 物镜的收集效率提高 2 倍以上, 同时保证了 400 μm 视场范围内的成像质量。与梯度折射率物镜相比, 物镜的视场范围提高了 3 倍, 但整体尺寸也增加了 2 倍。为了更贴近显微内窥成像的应用需求, 未来的物镜设计可以在保证视场范围的同时进一步降低物镜的直径。随着微型化双光子成像技术的发展, 高收集效率、高成像质量、大视场的光学系统将会得到更加广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.
- [2] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [3] Masters B R, So P T, Gratton E. Multiphoton

- excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of *in vivo* human skin [J]. *Biophysical Journal*, 1997, 72(6): 2405-2412.
- [4] Li H, Xia X Y, Chen T A, *et al.* Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207010.
李慧, 夏先园, 陈廷爱, 等. 双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207010.
- [5] Wang J, Lin F. Progress of two-photon laser scanning fluorescence microendoscope based on optical fiber [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, 47(8): 081701.
汪洁, 林峰. 基于光纤的双光子激光扫描荧光微内窥镜的新进展 [J]. *激光与光电子学进展*, 2010, 47(8): 081701.
- [6] Zhao Y, Nakamura H, Gordon R J. Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(4): 1159-1172.
- [7] Knittel J, Schnieder L, Buess G, *et al.* Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system [J]. *Optics Communications*, 2001, 188(5/6): 267-273.
- [8] Wu Y C, Li X D. Combined influences of chromatic aberration and scattering in depth-resolved two-photon fluorescence endospectroscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(4): 1234-1243.
- [9] Do D, Yoo H, Gweon D G. Fiber-optic raster scanning two-photon endomicroscope using a tubular piezoelectric actuator [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(6): 066010.
- [10] Li Z, Yang Z, Fu L. Scanning properties of a resonant fiber-optic piezoelectric scanner [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2011, 82(12): 123707.
- [11] Cui Q, Chen Z Y, Zhang Z H, *et al.* Recent advances in multicolor two-photon imaging technique [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(6): 060002.
崔权, 陈忠云, 张智红, 等. 多色双光子成像技术进展 [J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(6): 060002.
- [12] Zong W J, Wu R L, Li M L, *et al.* Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 713-719.
- [13] Kingslake R. *Lens design fundamentals* [M]. Salt Lake City: Academic Press, 1978.
- [14] Yan J, Zheng Y, Zheng X L, *et al.* Real-time optical diagnosis of gastric cancer with serosal invasion using multiphoton imaging [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31004.
- [15] Zinter J P, Levene M J. Maximizing fluorescence collection efficiency in multiphoton microscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(16): 15348-15362.