

文章编号 : 0253-2239(2001)12-1509-04

混浊介质多光子激发显微成像的快速模型^{*}

鲁 强 曾绍群 骆清铭 阮 玉

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室 , 武汉 430074)

摘要 : 将二维点扩散函数(PSF)和蒙特卡罗方法相结合 , 引入了一种研究混浊介质显微成像的快速仿真模型。将该模型用于混浊介质的多光子激发(MPE)显微成像研究 , 极大地提高了模拟效率。与直接蒙特卡罗方法计算结果的比较证实了该方法的正确性和有效性。此外 , 一个计算实例说明了混浊介质的多光子激发显微成像具有比共焦荧光显微成像更优的横向分辨率。

关键词 : 显微成像 ; 混浊介质 ; 点扩散函数 ; 多光子激发

中图分类号 : TN206 文献标识码 : A

1 引 言

多光子激发荧光显微成像和传统共焦荧光显微成像相比具有增加成像深度和减少光漂白作用的优点 , 已成为生命科学的重要手段^[1-3]。其中 , 混浊介质的多光子激发荧光成像的研究由于其直接的生物医学应用价值而显得尤其重要^[4]。然而混浊介质对光的多散射特性使常用于显微光学研究的标量衍射理论难以直接应用于混浊介质的成像研究。基于扩散理论的蒙特卡罗方法则因此得到广泛采用^[4-6]。蒙特卡罗方法最大的不足在于其巨大的计算资源需求。对此 , 已有的研究提出很多改进手段 , 如重要性抽样等^[5]。而通过蒙特卡罗方法获取混浊介质的点扩散函数^[6] , 依赖于成像过程的卷积关系 :

$$I(X) = \int h(X')O(X-X')dX', \quad (1)$$

可以获得高效率的成像模拟^[7] , 其中 $O(X)$ 、 $I(X)$ 分别为物函数和像函数 , X 、 X' 为空间位置坐标 , $h(X)$ 为综合考虑有混浊介质的成像系统的点扩散函数。将该方法引入混浊介质的多光子激发荧光显微成像研究 , 获得模拟的快速模型是本文的主要内容。

2 模型与方法

图 1 为多光子激发荧光显微成像的原理模型。

其光学系统是一个折迭的 $4f$ 系统 , 放大倍数为 1。物镜 L_1 和集光透镜 L_2 具有相同焦距 f , 置于共轭位置。物镜 L_1 将准直照明光(实线所示) 聚焦在埋入混浊介质的物体上 , 激发该处荧光团发出荧光。经样品散射的荧光(虚线所示) 逃逸出样品表面后 , 被 L_2 收集。滤波片(分束器) BS 区分照明光路和荧光光路。集光透镜 L_2 将荧光聚焦到点探测器 PMT , 就得到被照明光斑激发区域的点像。到达探测器的荧光称为成像信号光。物镜 L_1 焦点沿横向扫描可以得到物体的二维像。

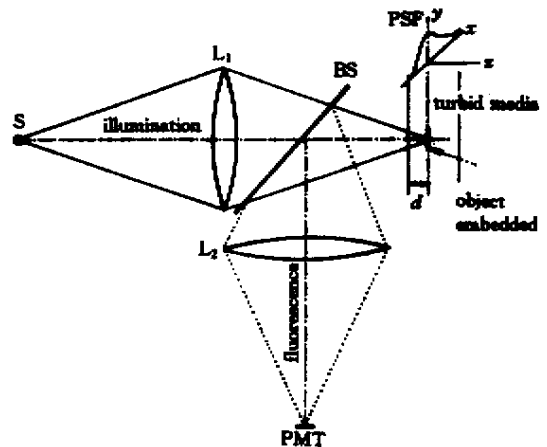


Fig. 1 Simulation model of MPE microscopic imaging an object embedded in turbid medium

根据前人对混浊介质显微成像的类似研究^[7]以及实验的具体情况 , 我们假设被研究的样品为埋在薄均匀混浊介质切片中的荧光物体。切片的横向尺度 (x, y) 远远大于纵向尺寸 (z) 。将均匀混浊介质视为成像系统的一部分 , 那么该成像系统具有二维 $(x-y)$ 空间不变性^[6-8]。因此 , 我们可定义含有混浊

^{*} 国家自然科学基金(39870205、59836240、60025514)和高校博士点专项基金(98048733)资助课题。

收稿日期 : 2000-06-23 ; 收到修改稿日期 : 2000-10-02

介质的多光子激发荧光成像系统的二维点扩散函数 (PSF) 为对荧光点物横向扫描所成的像。这样点扩散函数不仅仅反映显微光学系统的特性,同时也反映了混浊介质光学特性对成像的影响。考虑到多光子荧光辐射是自发辐射过程,荧光向任意方向传播,且相位不相干,因此所讨论的点扩散函数为强度点扩散函数。

由于混浊介质的引入,常采用蒙特卡罗方法求取该点扩散函数^[6,7]。对于混浊介质多光子激发显微成像系统,由于成像过程需要对荧光点物进行多点扫描,直接求取其点扩散函数往往需要巨大的计算量。在横向扫描成像中,由于焦点的扫描和物体的扫描具有等价意义,我们发现对荧光面物体的非扫描成像与荧光点物的扫描成像具有某种关系。当对焦面上荧光面物体进行非扫描成像时,成像信号光在焦面上的强度分布就是系统点扩散函数(如图 1 示的 PSF)。这样,记录荧光面物体非扫描成像时焦面上成像信号光强度分布即可以获得系统点扩散函数。扫描过程的取消极大地提高了模拟效率。

采用蒙特卡罗方法获取该成像信号强度分布时,有关的具体步骤如下:对荧光面物体非扫描成像,当荧光光子或光子束在焦面被激发时,记录其二维空间坐标 (x, y) ,而后通过混浊介质散射和探测显微光学系统传输,到达探测器或不能到达探测器。到达探测器的荧光光子成为成像信号光。对成像信号光按所记录的空间坐标 (x, t) 形成的分布,即多光子激发显微成像系统强度点扩散函数。

多光子激发为非线性过程,即荧光团所激发出的荧光强度 $I_f(X)$ 与照到其上的照明光光强 $I_i(X)$ 的 m 次方成正比^[9]:

$$I_f(X) = C_m I_i^m(X), \quad (2)$$

其中 C_m 为荧光激发系数, m 为激发阶次, $m = 2, 3$ 分别对应双光子、三光子激发过程。在多光子激发模拟中,考虑荧光激发几率是照明光强的非线性函数,对多光子激发非线性过程的模拟一般分两次蒙特卡罗过程实现^[9,10]:首先通过第一次蒙特卡罗过程确定探测面照明光强分布,而后模拟多光子激发过程,根据(2)式确定荧光强度分布,生成荧光光子,再通过第二次蒙特卡罗过程确定荧光是否到达探测器。两次蒙特卡罗过程增加了程序的复杂度,降低了计算效率。

多光子扫描成像系统的强度点扩散函数 $h(X)$ 表达为^[3]:

$$h(X) = [h_i(X)]^m h_p(X), \quad (3)$$

其中 $h_i(X)$ 为照明系统的强度点扩散函数, $h_p(X)$ 为探测系统的强度点扩散函数, X 表示横向坐标 (x, y) ,这也意味着对点扩散函数的求取通常需要两次蒙特卡罗过程。

事实上我们将(3)式改写成:

$$h(X) = [h_i(X)]^{m-1} h_i(X) h_p(X), \quad (4)$$

(3)式的右边可以分为两部分,其中 $[h_i(X)]^{m-1}$ 为照明光强分布相关量, $h_i(X) h_p(X)$ 视为单光子(共焦荧光,线性激发,可由 $m = 1$ 表达)成像点扩散函数。这样我们在获取多光子点扩散函数时就可以简化为普通共焦荧光成像过程来模拟。而对混浊介质普通共焦成像的模拟可以采用一次蒙特卡罗过程即可以完成^[5]。这意味着,如果我们采用共焦荧光模拟的程序逻辑,在光子迁移过程中,通过同时记录照明光强分布,而后由(4)式即可计算出强度点扩散函数,从而可避免非线性带来的两次蒙特卡罗过程。

因此,进一步改进混浊介质多光子激发荧光显微成像系统的点扩散函数的求取过程为:根据光源特性生成照明光子,通过蒙特卡罗方法模拟光子在混浊介质中的迁移。在光子迁移过程中记录照明光光强在探测面上的分布。单个照明光子被吸收处,即生成荧光光子,而不需要荧光光强分布 $I_f(X)$ 的计算。此后继续荧光光子迁移获取信号光分布。最后,将获得的单光子点扩散函数与记录的照明光光强分布按(4)式计算整个系统的点扩散函数。由于避免了两次蒙特卡罗过程,使程序复杂度降低,计算效率提高。

值得指出的是由于混浊介质荧光光学参数与照明光光学参数不相同,以上蒙特卡罗过程改进仅仅采用与共焦荧光成像模拟相同的程序逻辑,而光学参数的选择则应如下处理:在照明光子迁移中采用与双光子照明光波长相关的光学参数,而在荧光光子迁移中采用与荧光波长相关的光学参数。照明光子与荧光光子的转换仅仅按均匀分布重新生成光子传播方向来实现。

在蒙特卡罗模拟中,混浊介质一般由吸收系数 μ_a 、散射系数 μ_s 、散射各向异性因子 g 、折射系数 n 、厚度 d 等参数表征^[11]。对多光子激发显微成像的蒙特卡罗模拟详尽的阐述,可参见参考文献 [4, 12]。

3 结果与讨论

一组实验的点扩散函数在图 2 给出,其中曲线由内而外分别对应单光子、双光子、三光子激发成像

时的计算结果。图 2 中横坐标为径向坐标 $r = \sqrt{x^2 + y^2}$, 纵坐标为按最大值归一化的点扩散函数。模拟的均匀混浊组织为小鼠肝脏, 采用相同荧光探针。其对应具体光学参数见表 1^[13]。

Table 1. Tissue optical parameters used in calculations corresponding to that in Fig. 2

	λ /nm	μ_a /cm ⁻¹	μ_s /cm ⁻¹	g
fluorescence	488	12.2	173.5	0.93
illumination light (1p)	488	12.2	173.5	0.93
illumination light (2p)	800	5.7	97.0	0.94
illumination light (3p)	1064	5.9	60.9	0.92

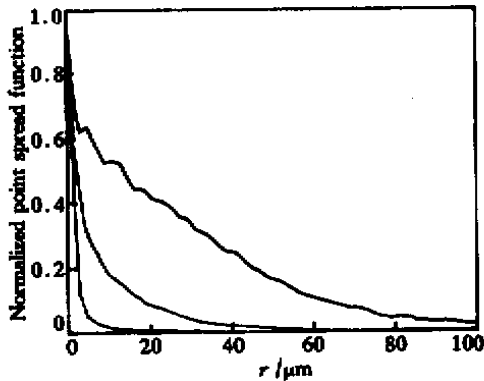


Fig. 2 PSF of single photon, two photon, three photon excitation microscopic imaging through turbid medium

其他参数为折射率 $n = 1.4$, 圆形共焦针孔半径 3 mm, 透镜数值孔径 $NA = 0.7$, 组织厚度 $d = 400 \mu\text{m}$ 。

从图 2 中可以看出, 三光子激发成像具有最窄的点扩散函数, 而单光子激发的点扩散函数最宽。也就是说, 对混浊介质成像的多光子激发方式, 按成像分辨率从高到低排列依次为: 三光子激发、双光子激发和单光子激发。该结果与文献中来自生物样品实验的结果相同^[14]。我们依赖于模拟, 分析混浊介质多光子激发比单光子激发具有更高分辨率的原因, 可以主要归结为如下两个方面。第一, 从表 1 中可以看出, 混浊介质对多光子激发的照明光具有较小的散射作用。散射通常是混浊介质成像产生降质的主要原因, 更小的散射意味着带来更高的分辨率。第二, 从(4)式可以看出, 多光子激发所特有的非线性效应, 引起系统点扩散函数变窄 $[h_f(X)]^{n-1}$ 表现为抑制散射光的门。也就是说, 对焦区内荧光激发有更强选择性, 该选择性可以进一步的提高成像分辨率。

对含有混浊介质的成像系统(1)式所表述的成像卷积关系是否满足, 是本文所述方法的基础。我

们以前的工作给出了基于扩散方程的理论证明^[8], 文献[6, 7]给出了基于蒙特卡罗计算的实验证明。本文在混浊介质多光子激发荧光成像中, 对该关系进行进一步验证。对埋在混浊介质中的锐边进行双光子激发荧光成像, 来自直接蒙特卡罗方法和快速模型方法的结果如图 3 所示。计算参数同图 2。从图 3 可以看出, 采用基于点扩散函数的快速模型可以获得和直接蒙特卡罗模拟无显著差别的计算结果。

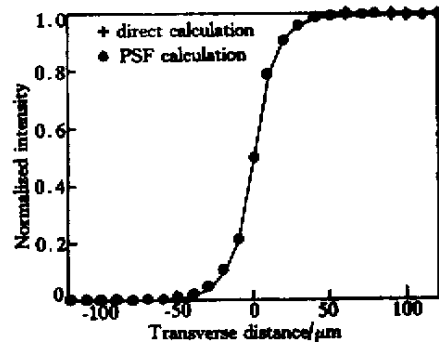


Fig. 3 Images of sharp edge for different calculation methods-direct and rapid PSF Monte Carlo

进一步考虑计算的效率。在图 3 所示模拟中入射光子数 5×10^7 , 采用 P II -366 64 MB PC 计算。采用快速模型模拟, 计算时间为 145 min。而采用直接模拟, 计算时间为 2175 min。可以看出快速模型的计算效率显著高于直接蒙特卡罗模拟的计算效率。我们分析, 直接蒙特卡罗模拟中, 随采样点数的增加计算量近似线性增加。采用快速模型, 采样点数仅仅和卷积计算量有关。由于获取一个像点的卷积计算时间小于 1 s, 因此采用快速模型可以更加方便获取多采样点数的较高精度成像。特别是在二维物体的成像模拟中, 由于受多采样点数引起的巨大计算量的制约, 采用直接蒙特卡罗模拟几乎不可行, 而快速模型却可以很快获得成像结果。

结论 本文所引入的基于点扩散函数的快速模型在获得和直接蒙特卡罗模拟相同准确性的前提下, 可以大幅度提高模拟计算效率。该模型对单光子、双光子、三光子成像模拟具有相同的计算量。同时计算量不随采样点数的增加而显著变化。此外, 采用快速模型的计算结果表明在混浊介质的多光子显微成像中, 多光子激发成像具有比单光子激发成像高的横向分辨率。

值得指出的是, 由于对混浊介质多光子激发荧光显微成像在 z 向不满足平移不变性。因此, 以上讨论仅仅局限于横向二维扫描成像的讨论, 其方法

难以推广至三维。

参 考 文 献

- [1] Denk W , Strickler J H , Webb W W . Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* , 1990 , **248** (4958) :73 ~ 76
- [2] Sheppard C J R , Gu M . Image formation in two-photon fluorescence microscopy. *Optik* , 1990 , **86** (3) :104 ~ 106
- [3] Gu M . Resolution in three-photon fluorescence scanning microscopy. *Opt. Lett.* , 1996 , **21** (13) :988 ~ 990
- [4] Blanca C M , Saloma C . Monte Carlo analysis of two-photon fluorescence imaging through a scattering medium. *Appl. Opt.* , 1998 , **37** (34) :8092 ~ 8102
- [5] Schmitt J M , Ben-Letaief K . Efficient Monte Carlo simulation of confocal microscopy in biological tissue. *J. Opt. Soc. Am. (A)* , 1996 , **13** (2) :952 ~ 961
- [6] Dunn A , DiMarzio C . Efficient computation of time-resolved transfer functions for imaging in turbid media. *J. Opt. Soc. Am. (A)* , 1996 , **13** (1) :65 ~ 70
- [7] Gan X , Gu M . Effective point-spread function for fast image modeling and processing in microscopic imaging through turbid media. *Opt. Lett.* , 1999 , **24** (11) :741 ~ 743
- [8] Zeng S , Luo Q , Gong H *et al.* . On the linear shift invariance of photon diffusion imaging in highly scattering media. *J. Mod. Opt.* , 1999 , **46** (14) :1985 ~ 1993
- [9] Gan X , Gu M . Fluorescence microscopic imaging through tissue-like turbid media. *J. Appl. Phys.* , 2000 , **87** (7) :3214 ~ 3221
- [10] Dunn A , Wallace V P , Coleno M *et al.* . Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples. *Appl. Opt.* , 2000 , **39** (7) :1194 ~ 1201
- [11] Wang L , Jacques S L , Zheng L . MCML-Monte Carlo modeling of photon transport in multi-layered tissues. *Comput. Meth. & Prog. Biomed.* , 1995 , **47** (2) :131 ~ 146
- [12] 鲁 强 , 曾绍群 , 骆清铭 等 . 混浊介质多光子激发荧光显微成像的蒙特卡罗模拟. *光学学报* , 2001 , **21** (9) :1073 ~ 1078
- [13] Cheong W , Prahil S A , Welch A J . A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE. J. Quantun Electron.* , 1990 , **QE-26** (12) :2166 ~ 2185
- [14] Centonze V E , White J G . Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys. J.* , 1999 , **75** (4) :2015 ~ 2024

Rapid Modeling of MPE Microscopic Imaging Through Turbid Medium

Lu Qiang Zeng Shaoqun Luo Qingming Ruan Yu

(The Key Laboratory of Biomedical Photonics , Ministry of Education , China ,
Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430074)

(Received 23 June 2000 ; revised 2 October 2000)

Abstract : A rapid and accurate model used to study microscopic imaging through turbid medium is presented which combines traditional Monte Carlo with two-dimensional point spread function (PSF). The research shows that the rapid model is much faster than a pure Monte Carlo method with the help of convolution operation , when it is used to simulate multi-photon excitation (MPE) fluorescence scanning microscopic imaging through turbid medium . Besides , one run instance illustrates that higher transverse resolution can be obtained in imaging through turbid medium by MPE than by confocal fluorescence microscopy .

Key words : microscopic imaging ; turbid medium ; point spread function ; multi-photon excitation