

文章编号 : 0253-2239(2001)07-0796-04

# 混浊介质显微成像中吸收作用的门机制\*

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 : 采用蒙特卡罗方法研究了混浊介质的吸收特性对共焦荧光显微成像的影响。结果表明,混浊介质对光的吸收作用增强了成像的分辨率,同时降低成像强度。因此,混浊介质样品对光的吸收作用是样品本身所固有的分辨散射光的门机制。

关键词 : 显微成像 ; 混浊介质 ; 门机制 ; 蒙特卡罗方法

中图分类号 : O436.2 文献标识码 : A

## 1 引 言

混浊介质的显微成像研究由于其在生物医学领域的应用前景近年来得到广泛关注<sup>[1]</sup>。在对混浊介质的显微成像中,光入射仅数百微米后大部分便变成了弥散光。弥散光束由散射光和非散射光组成。散射光在成像中主要起降低像质的作用,因此为了达到衍射限的分辨就必须屏蔽散射光。对散射光与非散射光之间物理上的差异如渡越时间、相干性、空间分布、角度分布以及偏振状态等差异的研究结果给出了一些有效的门机制来区分散射光与非散射光,如时间分辨(时间门)、弱相干光学层析(相干门)、共焦成像(空间门)、环瞳(角度门)以及偏振门等。同时采用一种或多种门机制的成像系统可在不同程度上提高成像的分辨率<sup>[1,2]</sup>。

光在混浊介质中的弥散可归因于混浊介质中微粒对光的散射和吸收。微粒对光的每次作用改变了光的强度与传播方向。这样,更多次数的散射意味着更多的吸收,吸收作用对非散射光和散射光强度的衰减具有选择性,这表明吸收作用对成像有一定的影响<sup>[3]</sup>。本文基于共焦荧光显微成像的蒙特卡罗模拟,进一步研究了这种影响,分析了其特征,指出吸收作用是样品本身所固有的分辨散射光的门机制,其作用是能够有效提高成像分辨率。其意义在于,可以通过改变样品对光的吸收特性来达到提高共焦荧光显微成像分辨率,改善像质的效果,同时该方法不会引入采用其他门机制所增加的实验设备与数据处理的复杂性。

蒙特卡罗方法是研究混浊介质中光传播的有效手段<sup>[4,5]</sup>。蒙特卡罗方法固有的特点使它难以体现光在混浊介质中传输的波动特性如相干性等,而荧光显微术由于荧光和照明光不相干,从而可以最大程度忽略这种波动特性对成像的影响。

## 2 仿真实验

图 1 为反射式共焦荧光显微成像的仿真光路示意图。其光学系统是一个折迭的  $4f$  系统,放大系数为 1。物镜  $L_1$  和集光透镜  $L_2$  具有相同焦距,置于共轭位置。照明光源为准单色(中心波长为  $\lambda$ )基模( $TEM_{00}$ )高斯光束。物镜  $L_1$  将准直照明光聚焦在混浊样品下  $z_f$  处,激发该处荧光团发出荧光。经样品散射的荧光光子逃逸出样品表面后,为  $L_1$  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,就得到照明光焦点处物的像。物镜  $L_1$  焦点沿轴向和横向扫描可以得到物体的三维像。点探测器一般由光电倍增管(PMT)前放置针孔 P 实现。仿真坐标系的原点定位于物镜  $L_1$  中心位置, $z$  向为照明光传播方向,图 1 为系统  $x-z$  平面剖面图。

采用蒙特卡罗方法模拟混浊介质对光的散射与吸收作用。光在混浊介质的传输模拟由一系列的散射、吸收事件组成。混浊介质的光学特性根据传输理论由以下参数描述:吸收系数  $\mu_a$ 、散射系数  $\mu_s$ 、散射各向异性因子  $g$ 。

光子在位置  $(x_i, y_i, z_i)$ ,  $i = 1, 2, 3, \dots$  遇到介质中的散射子发生散射,改变传播方向传播,直到遇到下一个位置  $(x_{i+1}, y_{i+1}, z_{i+1})$  的散射子。一个典型的

\* 国家自然科学基金(39870205、60025514)资助课题。

收稿日期:2000-04-17;收到修改稿日期:2000-09-27

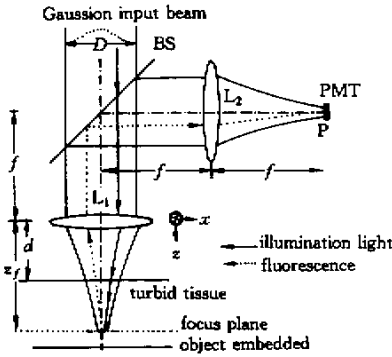


Fig.1 Optical configuration of confocal fluorescence microscope imaging an object embedded in turbid medium

散射事件如图 2 所示,  $i = 1$ 。两次散射之间的距离称为自由程  $l$ , 它服从概率密度分布,

$$p(l) = 1/l_1 \exp(-l/l_1),$$

其中  $l_1 = 1/(\mu_a + \mu_s)$  为平均自由程 (mfpl), 因此自由程由以下算式生成:

$$l = -l_1 \ln \xi. \tag{1}$$

本文中, 随机变量  $\xi$  服从  $(0, 1]$  区间上的均匀分布。散射后光子传播方向的改变由散射角  $\theta$  和方位角  $\varphi$  表示。方位角服从  $0$  到  $2\pi$  上的均匀分布,  $\varphi = 2\pi\xi$ 。散射角  $\theta$  根据亨耶-格林斯坦 (Henye-Greenstein) 相函数方程得到:

$$\cos \theta = \left[ \frac{(1 + g^2) - (1 - g^2)(1 - g + 2g\xi)^2}{2g} \right]^{-1/2}, \tag{2}$$

散射各向异性因子  $g$  即定义为该相函数的平均余弦  $g \equiv \langle \cos(\theta) \rangle$ 。

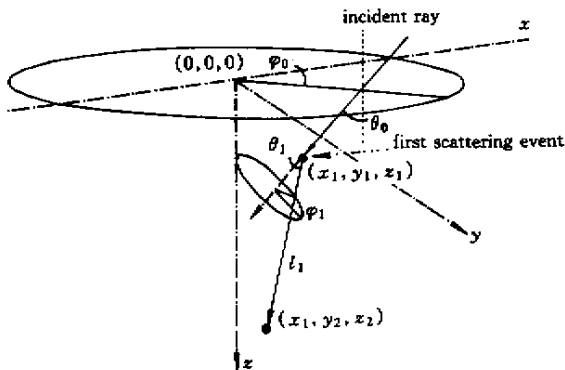


Fig.2 Example of the trajectory of a scattered photon in turbid medium

吸收系数  $\mu_a$  和散射系数  $\mu_s$  分别定义为每单位无限小自由程中光子吸收和散射的概率。为了提高模拟效率通常用无限窄光子束代替单个光子进行模拟, 光子束用权重  $w$  来衡量, 这样吸收事件可以近似以如下方式模拟<sup>[5]</sup>:

$$w \leftarrow w[1 - \mu_a/(\mu_a + \mu_s)]. \tag{3}$$

对混浊介质显微成像蒙特卡罗模拟更加详细的描述可见参考文献 [4]。

模拟研究通过对埋在混浊介质中的横向锐边成像来进行。这样成像的横向分辨率可由可分辨距离  $\Gamma$  来描述, 分辨距离  $\Gamma$  定义为<sup>[2]</sup>:

$$\Gamma \equiv |r_{0.9} - r_{0.1}|, \tag{4}$$

其中  $I(r_{0.9}) = 0.9, I(r_{0.1}) = 0.1, I(\cdot)$  为按最大值归一化后的荧光强度,  $r$  为横向坐标。可分辨距离越大意味着分辨率越低。

### 3 结果与讨论——门机制

在混浊介质成像时, 通常认为携带样品信息的非散射光保持入射方向, 而散射光经历多次散射以后丢失原有的样品信息成为成像噪声, 该噪声的存在极大地降低了成像的分辨率。由于多次散射通过较长路径, 因而多散射经历较多吸收, 得到较多衰减。这意味着混浊介质吸收作用对散射光强度的衰减大于对非散射光强度的衰减<sup>[3]</sup>。吸收对散射光和非散射光这种选择性的抑制表明, 吸收作用可有效地抑制散射光, 从而达到提高成像分辨率的效果。

考虑到非散射光保持入射方向, 显微光学系统光轴 (径向距离为 0) 附近所激发和传输的荧光主要为散射次数较少的光 (称少散射光), 而偏离光轴的荧光则主要为散射次数较多的光 (称多散射光<sup>[2]</sup>)。图 3 给出了在数值孔径为 0.7、波长为 800 nm 条件下, 对混浊样品 400  $\mu\text{m}$  下荧光面共焦成像时, 在探测面 ( $L_2$  焦面) 上荧光的径向分布。其中曲线 1、2 分别为  $\mu_a = 0, \mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}; \mu_a = 50 \text{ cm}^{-1}, \mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$  时的分布, 其横坐标为径向距离, 纵坐标为对数尺度的荧光强度, 按入射光强归一化 (纵坐标轴

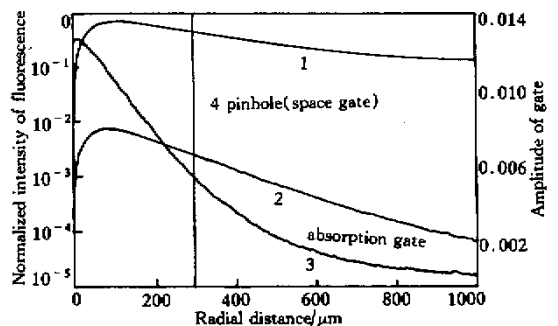


Fig.3 Absorption gating mechanism effect of absorption coefficient on radial distribution of photons

如图 3 左侧),比较曲线 1 和 2,可以明显看出样品对荧光强度的吸收作用。通过曲线 2 与曲线 1 的比较得到曲线 3(纵坐标轴如图 3 右侧,线性),即反映吸收对散射光的抑制作用。作为比较,在共焦成像时,空间门(针孔尺寸  $300\ \mu\text{m}$ )对散射光的抑制作用由曲线 4 给出。通过曲线 3 可以看出吸收作用对远离光轴的多散射光具有更强的抑制作用。同时,这种抑制作用和径向距离具有近似于指数的函数关系。对曲线 3 进行指数拟合,我们获得荧光强度随径向距离变化的函数  $G_a(r)$ :

$$G_a(r) = 0.0146\exp(-r/293).$$

该函数关系的具体参数值与成像深度以及样品吸收特性有关。

进一步考虑该混浊介质吸收作用对成像的影响。将混浊介质看作成像系统的一部分,那么入射光束在探测面上弥散斑的大小直接表示成像系统的分辨率。图 4 给出了按最大值归一化的弥散斑光强的径向分布。对于曲线 1,  $\mu_a = 0, \mu_s = 100\ \text{cm}^{-1}$ ; 对于曲线 2,  $\mu_a = 50\ \text{cm}^{-1}, \mu_s = 100\ \text{cm}^{-1}$ 。从图中可看出,吸收作用使弥散斑变小。较小的弥散斑意味着较高的分辨率。

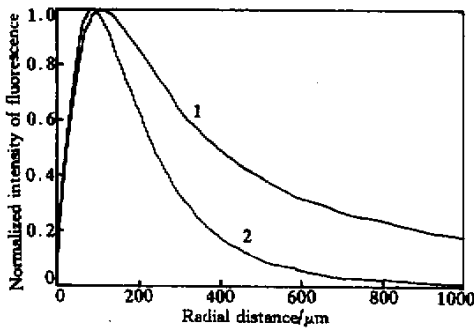


Fig. 4 Effect of absorption on diffused spot of image system

为了研究吸收作用对成像分辨率的影响,将荧光锐边掩埋在混浊介质表面下  $400\ \mu\text{m}$  深度处。当针孔尺寸为  $300\ \mu\text{m}$  时,不同吸收、散射系数对锐边成像的影响见图 5 横坐标为横向距离,纵坐标为归一化的荧光信号强度。其它计算参数同图 3。图 5 中分别给出了  $\mu_a = 0, \mu_s = 100\ \text{cm}^{-1}$ ;  $\mu_a = 50\ \text{cm}^{-1}, \mu_s = 100\ \text{cm}^{-1}$ ;  $\mu_a = 0, \mu_s = 200\ \text{cm}^{-1}$  三组参数下的像。比较图 5 中的曲线可以看出,保持  $\mu_s$  不变的情况下,  $\mu_a$  从 0 到  $50\ \text{cm}^{-1}$  变化时,锐边像变锐,表明分辨率的提高;而保持  $\mu_a$  不变的情况下,  $\mu_s$  从  $100\ \text{cm}^{-1}$  增加到  $200\ \text{cm}^{-1}$  时,分辨率降低。这一结果表明了吸收作用有利于增强混浊介质成像

的分辨率,而散射作用却降低成像的分辨率。

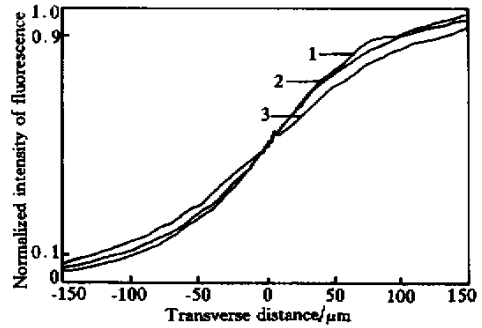


Fig. 5 Sharp edge images under various absorption and scattering coefficients

吸收系数变化引起成像分辨率的变化曲线如图 6 所示,计算参数同图 5。纵向坐标为(4)式定义的可分辨距离,单位为  $\mu\text{m}$ 。计算中  $\mu_s = 100\ \text{cm}^{-1}$ 。

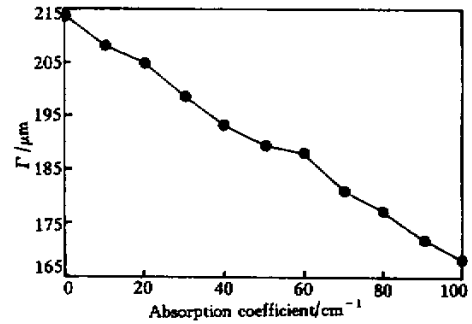


Fig. 6 Image resolution as a function of absorption coefficient

从图中可以看出,随着吸收系数的增加可分辨距离逐渐减小,也就是成像分辨率在逐渐提高。因此,可以说混浊介质吸收作用可以有效提高成像分辨率。但是吸收对成像强度同时存在衰减作用,如图 7 所示(计算参数同图 5,成像强度取图 5 中横向距离为 0 处)。图 7 中纵轴为按入射光强归一化荧光强度,横轴为吸收系数。

从图 7 中可以看出,随吸收系数的增加成像强

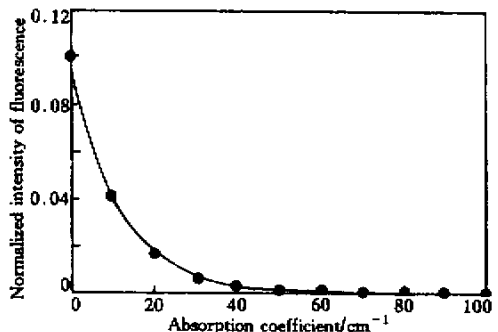


Fig. 7 Image intensity as a function of absorption coefficient

度成指数衰减。对图 7 的指数拟合结果为

$$I = 0.0976 \exp(-0.0878 \mu_a).$$

在图 7 中, ● 标记为模拟结果, 曲线为指数拟合结果。

以上实验结果表明, 吸收作用对成像的影响包括两个内容: 提高成像分辨率和降低成像强度。吸收作用提高成像分辨率这一特性, 来源于其对散射光抑制所具有的选择性: 对多散射光子具有更强衰减的能力。这种作用和其它门机制如空间门的作用是类似的, 同时它又是混浊样品所有固有的。因此说混浊介质的吸收作用是混浊介质本身所固有的分辨散射光的门机制。

在共焦荧光成像中, 这一结论具有的启发意义在于, 可以通过改变样品的吸收特性来提高成像的分辨率。考虑混浊样品具有的荧光吸收谱, 在保证成像强度的条件下, 选择吸收作用较强的荧光探针可以获得更高的像质。由于吸收门机制是混浊介质本身所固有的特性, 因此对共焦显微成像以外的其他混浊介质成像<sup>[3]</sup>, 该结论也同样是有意义的。

结语 本文研究了混浊介质的吸收作用对成像分辨

率的影响。共焦显微成像的蒙特卡罗模拟结果表明, 混浊介质对光的吸收作用能够有效提高成像的分辨率, 但同时降低成像强度。混浊介质样品对光的吸收作用是样品本身固有的分辨散射光的门机制。这一结论加深了对混浊介质成像的理解, 同时具有指导实验的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Gan X, Gu M. Modified Monte-Carlo simulation of multi-dimensional photon distribution for microscopic imaging. *Optik*, 1998, **10**(3):129~136
- [2] Gan X, Schilders S P, Gu M. Image formation in turbid media under a microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1998, **15**(8):2052~2058
- [3] Yoo K M, Liu F, Alfano R R. Imaging through a scattering wall using absorption. *Opt. Lett.*, 1991, **16**(14):1068~1070
- [4] Schmitt J M, Ben-Letaief K. Efficient Monte-Carlo simulation of confocal microscopy in biological tissue. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1996, **13**(5):952~961
- [5] 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

## Absorption Gating Mechanism in Microscopy of 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 17 April 2000; revised 27 September 2000)

**Abstract:** Image formation in turbid medium under a microscope is studied using Monte-Carlo technique. The relationship of image resolution with absorption property of turbid medium is discussed. The results show that the enhancement of absorption increases the image resolution, and more absorption contributes lower image intensity. It is concluded that the absorption in turbid medium is an intrinsic gating mechanism to refuse the scattered light.

**Key words:** microscopy; turbid media; gating mechanism; Monte-Carlo technique