

文章编号 : 0253-2239(2001)09-1073-06

混浊介质多光子激发荧光显微成像的蒙特卡罗模拟

鲁 强 曾绍群 骆清铭 阮 玉

(华中理工大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 将蒙特卡罗方法与几何光线追踪技术相结合用于研究样品混浊特性对多光子激发荧光显微成像的影响。推导了模拟多层样品显微成像的数学模型, 给出了用程序框图表示的基本仿真系统骨架。对传统蒙特卡罗方法的改进有效地增强了对聚焦光束的模拟能力。初步的模拟结果说明了混浊介质散射特性对显微成像的显著影响。

关键词: 多光子激发; 荧光显微术; 蒙特卡罗方法; 混浊介质

中图分类号: O439 : TN911.73 文献标识码: A

1 引 言

多光子激发(MPE)荧光显微成像术采用长波长照明光激发样品荧光团产生荧光。在对高散射生物样品的成像中, 和共焦荧光显微成像术相比, 这一方法具有增加成像深度和减少光漂白作用的优点, 是目前生命科学中细胞、亚细胞结构研究的重要手段^[1]。

近几年来对该成像术中光学系统作了一系列理论研究, 提出了很多有意义的改进手段, 如采用环瞳(角度门)等。这些理论分析主要基于标量衍射理论, 范围涉及单光子(即共焦成像)、双光子以及三光子激发成像^[2,3]。在对生物样品成像的过程中, 生物样品所具有的混浊特性对成像的影响是显然的。分析样品的光学特性对成像的影响对该成像技术应用和改良有重要意义, 然而其机理分析较少见于报道。其主要原因可以归结为标量衍射理论对多散射光传播的无能为力。相反蒙特卡罗方法则是研究光散射传播的传统手段^[4]。将蒙特卡罗方法和几何光线追踪方法结合研究共焦显微成像可见于文献^[5]。本文将该方法引入到研究混浊介质的多光子激发荧光成像, 给出了模拟的数理模型以及程序骨架。生物样品通常具有多层特性, 采用多层模型模拟混浊介质中光子传播规律的研究可见于文献^[4]。本文在文献基础上推导了模拟多层样品显微成像的数学模型, 并将运行在单层模型下的结果和来自文献的结果进行了比较。

2 仿真模型

多光子激发荧光显微成像系统, 通常在反射式共焦荧光成像系统的基础上, 改用长波长激光作照明光源来构造。对其系统的具体描述可见于文献^[6]。多光子激发显微成像的模拟过程可分为以下几个阶段:

1) 依据高斯光束(中心波长 λ)特征, 产生照明光子; 2) 照明光在显微光学系统中传播; 3) 照明光子经过在混浊样品中的迁移, 聚焦至样品表面下深度 z_f 处; 4) 聚焦点处, 荧光团同时吸收多个照明光子激发单个荧光光子; 5) 荧光光子在混浊样品中迁移; 6) 荧光在显微光学系统中传播; 7) 点探测器对信号光(荧光)进行选择。针对以上阶段的分解, 我们对阶段 2) 和 6) 采用几何光学方法追踪光线来模拟, 阶段 3) 和 5) 则采用传统蒙特卡罗方法研究。混浊样品对多光子激发荧光显微成像的影响也体现在阶段 3) 4) 和 5) 上。在以下内容中给出了模拟中一些关键阶段所需公式的推导。

2.1 光子生成

光子依据光源的特征生成。我们采用基模高斯光束 $I(r)$ 来模拟照明光源:

$$I(r) = I_0 \exp[-\chi(r/w)^2],$$

其中 I_0 为入射强度, r 为光子的径向距离, w 为光斑半径。在不考虑样品情况下, 光束在折射率为 n_0 的浸物(水, 镜头油)中传播到达焦点处, 光斑达到最小为 w_0 , 这样 w 作为传播距离 z (z 轴方向为照明光传播方向)的函数可以按下式计算^[7]。

$w(z) = w_0 \{1 + [\lambda(z-f)(n_0\pi w_0^2)]^2\}^{1/2}$, (1)
其中 f 为显微物镜 L_1 的焦距。考虑其有效直径, 即

* 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: 2000-04-03; 收到修改稿日期: 2000-09-27

$1/e^2$ 宽度为 D , 腰斑 w_0 可以如下确定:

$$w_0 \approx 2f\lambda(n_0\pi D) = \lambda(\pi n_0 NA), \quad (2)$$

其中 $NA = D(2\varphi)$ 为物镜 L_1 数值孔径。高斯光束的发散角是决定聚焦光束入射样品表面的初始角度的重要因素, 我们通过对(1)式中 z 求导获得其半发散角 θ_E 的正切 $\tan\theta_E$:

$$\tan\theta_E(z) = \frac{dw(z)}{dz} = NA \frac{|z-f|}{(n_0\pi w_0^2/\lambda)\sqrt{1+[|z-f|\lambda(n_0\pi w_0^2)]^2}}, \quad (3)$$

从(3)式有: $z \rightarrow f$ 时, $\tan\theta_E(z) \rightarrow 0$, 而 $z \rightarrow \infty$ 时, $\tan\theta_E(z) \rightarrow NA$ 。

光子的位置和运动方向可用五元参数组 $(x_i, y_i, z_i, \theta_i, \varphi_i)$, $i = 0, 1, 2, 3, \dots, m$ 来描述。 (x_i, y_i, z_i) 描述光子的位置, θ_i, φ_i 分别为散射角和方位角。 $i = 0$ 时 $(x_0, y_0, z_0, \theta_0, \varphi_0)$ 用来描述光子生成的初始位置和初始方向。

考虑高斯光束光强在横截面上服从高斯分布, 那么光子的径向距离 r 服从概率分布

$$f(r) = 1 - \exp[-r^2/(2\varepsilon^2)],$$

式中 ε^2 为方差。这样光子的生成位置 (x_0, y_0, z_0) , 径向距离 r_0 可以下式表示:

$$r_0 = \sqrt{-2\varepsilon^2 \ln \xi_0}, \quad (4)$$

$$x_0 = r_0 \cos(2\pi\xi_1), \quad y_0 = r_0 \sin(2\pi\xi_1). \quad (5)$$

在本文中 ξ_i ($i = 0, 1, 2, \dots$) 为 0 到 1 上独立均匀分布的随机变量, ε^2 取 2 倍 $w(z = z_0)$, 这样可以确定任意轴向距离 z_0 处生成光子的位置 (x_0, y_0, z_0) 。

初始散射角则可通过如下式确定:

$$\tan\theta_0 = r/w(z = z_0) \tan\theta_E(z = z_0). \quad (6)$$

若成像时 $|z_0 - f| \gg n_0\pi w_0^2/\lambda$, 则简化计算后可得

$$\tan\theta_0 \rightarrow r/w(z = z_0) NA. \quad (7)$$

在文献[5]中对共焦成像模拟时, 提到的选择策略是采用 $\tan\theta_0 = NA\xi_2$ 。在我们后面的讨论中认为该策略因为忽略了聚焦特性, 对混浊介质显微成像中较深入射的高斯光束的模拟不及(7)式准确。而初始方位角 φ_0 与生成位置相关, 服从 0 与 2π 之间均匀分布, 故可以简单确定。

考虑混浊样品成像时, 样品的引入不影响样品外高斯光束的光场。设 d 为透镜与样品间的距离, 这样在样品外紧靠表面处 ($z_0 = d$) 生成入射光子。显微系统的 z 向扫描 (聚焦) 即可确定 d 。对多层样品模型, 假设光束聚焦在第 k 层样品上 ($k = 0$ 表示物

镜 L_1 到样品上表面的物质层, 如干物镜的空气、油镜的镜头油等 $d = d_0$) 则成像位置 z_f (透镜与焦点间距离) 与 d_0 的关系经推导可得

$$z_f = (f/n_0 - \sum_j d_j/n_j) n_k + \sum_j d_j, \quad (8)$$

$$j = 0 \dots k-1,$$

其中 d_j, n_j 分别表示第 j 层的厚度和折射率。仿真中, 在 z_f 已知的情况下由(8)式确定 d_0 。

2.2 光子迁移

混浊介质对光的散射吸收特性将影响多光子激发荧光显微成像。组织的光学特性依据传输理论可以由以下参数表征: 吸收系数 μ_a , 散射系数 μ_s , 散射各向异性因子 g , 光学厚度 d 等^[4]。在多层介质情况下, 可用多组参数来确定光子在不同位置的迁移特性。光在混浊介质中的迁移由一系列散射、吸收事件组成, 对其模拟属于传统蒙特卡罗方法的范畴, 详细的描述可见于文献[4]和[6]。

传统蒙特卡罗方法的最大不足在于其模拟计算的效率极低。本文采用重要性抽样的方法以提高计算效率^[5]。即, 采用

$$I_0 = -z_f \ln \xi_4 \quad (9)$$

代替 $I_0 = -l_1 \ln \xi_4$ 来选择第一次自由程, 其中 l_1 为平均自由程。为了消除这一措施带来的估计偏差, 引入权重 $w_1 = z_f/l_1 \exp[l_0(1/z_f - 1/l_1)]$ 来衡量采样重要性, 在对模拟后所研究的物理量进行计算时将 $W \cdot W_1$ 替代权重 W ($W \leftarrow W \cdot W_1$, 符号 \leftarrow 表示赋值), 即可保证估计无偏。

考虑多层样品, 迁移的光子到达样品边界或多层介质界面处, 按照菲涅耳公式计算透射系数 T 。从而根据 $\xi_5 < T$ 确定该光子束是否迁移到下一层介质, 否则发生反射, 在同层介质中继续传输。最后, 当迁移的光子遇到以下几种情况时终结: 1) 为探测器捕获; 2) 散射出媒质和光学系统; 3) 经过 20 次散射仍然不满足以上两个条件。

2.3 荧光激发

多光子激发过程中, 荧光团同时吸收多个光子 ($1, 2, 3 - p$) 激发一个荧光光子。由于荧光激发属于自发辐射过程, 因此在照明光子吸收处生成的荧光光子在各个方向上服从均匀分布。考虑到多光子激发荧光强度 $I_{n,F}$ 和照明光强度 $I_{n,E}$ 的关系^[9]:

$$I_{n,F} = \alpha_n I_{n,E}^n, \quad (10)$$

其中, $n = 1, 2, 3$ 分别对应单光子、双光子和三光子激发, α_n 为单光子、双光子、三光子激发系数。那么

荧光光子的权重 W 按 (11) 式生成：

$$W = \alpha_n I_{n,E}^2. \quad (11)$$

对荧光光子在混浊介质中的迁移,我们近似地认为在单光子激发中照明光和荧光波长满足关系 $\lambda_E^{1p} = \lambda_F^{1p}$,在双光子和三光子激发中则相应为 $\lambda_E^{2p} = 2\lambda_F^{2p}$, $\lambda_E^{3p} = 3\lambda_F^{3p}$ 。照明光和荧光波长的不同引起在混浊样品中有不同的传输特性,模拟中通过平均自由程、散射各向因子的不同来描述其差异。按照散射理论,平均自由程和混浊介质中的散射子特性有如下关系：

$$l_1 = (N_s \sigma_s)^{-1},$$

其中 N_s 为散射子密度, σ_s 为散射子散射截面。按照散射子半径和波长的关系,散射分为各向同性 ($r_s \ll \lambda$) 和各向异性 ($r_s \gg \lambda$)。在各向同性的散射中散射截面和波长满足关系 $\sigma_s \propto \lambda^{-4}$,而各向异性的散射则有关系 $\sigma_s \propto \lambda^{-2}$ 。以双光子激发为例,在各向同性介质中, $l_F^{2p}/l_E^{2p} = 1/16$,而对各向异性而言则满足 $l_F^{2p}/l_E^{2p} = 1/14$ 。因此在混浊样品中照明光和荧光的传播的不同特性主要通过平均自由程的差异来模拟研究。

值得指出的是,通过测量不同波长下组织光学特性参数,根据测量参数结果模拟多光子成像是较好的选择^[10]。

2.4 荧光探测

在多光子激发荧光显微成像中,由于多光子具有激发选择性,因而不需要针孔来提供层析能力,但是很多来自理论和实验的结果表明采用针孔可以获得更好的轴向和横向分辨率^[8]。因此,我们在蒙特卡罗模拟中仍然对针孔予以保留。在这里使用光线追踪来模拟针孔对离焦光子的屏蔽。

因为物镜 L_1 和集光透镜 L_2 共轭,所以信号光

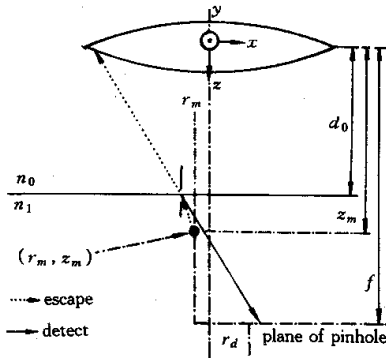


Fig.1 Optical path of fluorescence photon detected through the confocal pinhole

追踪的图示如图 1 给出。图中 R_d 为针孔半径。不妨假设荧光光子逃逸出样品表面前,最后一次散射后,在第一层组织样品中到达的位置坐标和方向余弦分别为 (x_m, y_m, z_m) ($\mu_{xm}, \mu_{ym}, \mu_{zm}$)。在不考虑像空间和物镜 L_1 浸物折射率差异的情况下,光子到达探测针孔面 (L_2 焦平面) 上的位置 (x_d, y_d) 可以由傍轴近似得到如下公式：

$$\left. \begin{aligned} x_d &= -\frac{\mu_{xm}}{\mu_{zm}} \left(\frac{f}{n_0} - \frac{z_m}{n_1} + \frac{d_0}{n_0} - \frac{d_0}{n_1} \right) n_1 + x_m, \\ y_d &= -\frac{\mu_{ym}}{\mu_{zm}} \left(\frac{f}{n_0} - \frac{z_m}{n_1} + \frac{d_0}{n_0} - \frac{d_0}{n_1} \right) n_1 + y_m. \end{aligned} \right\} \quad (12)$$

当探测针孔面上光子径向距离 $r_d = \sqrt{x_d^2 + y_d^2}$ 大于针孔半径 R_d ($r_d > R_d$) 时表示荧光光子为针孔屏蔽,反之探测到成像信号。

3 仿真软件

考虑到 (10) 式中 $I_{n,F}$ 与 $I_{n,E}$ 的非线性关系,我们将模拟分为两个过程实现:荧光激发和荧光探测。在荧光激发和探测过程中的光子传输是相似的,其差别仅仅在于光子束产生和终结的过程以及照明光与荧光的组织光学参数。

在荧光激发过程中,照明光光子按高斯光束产生,而在多光子吸收处(一般为物镜 L_1 的焦面)终结;在探测过程中,荧光光子在照明光光子吸收处生成,而通过集光透镜 L_2 的焦面针孔到达探测器终结(如图 2 示)。图 2 中①、②、③、④为流程图连接点。从①到②、③到④分别表示单个照明光光子和荧光光子的传输(点划线框内为相同部分,为传统蒙特卡罗模拟光子的迁移过程)。在成像过程中为了得到较可信的结果,一个点的成像通常需要计算的入射光子数为 10^7 。这样在②结束后,求取照明光强度分布 $I_{n,E}$,从而可按 (11) 式确定荧光光子权重,开始③荧光光子的传输模拟。

L_1 焦点的扫描,一般通过样品扫描得到模拟。根据扫描特征,可以获得 2 维断层或 3 维立体像。实际上由于计算量的巨大,在蒙特卡罗模拟成像特征时一般采用 1 维像来分析。

采用蒙特卡罗方法对多光子激发成像进行研究,其优点还在于可以用它来分析很多在真实系统实验中难以测量记录的物理量。使用径向 r 、轴向 z 的 2 维栅格 $A(r, z)$ 记录光子吸收,可以得到混浊介质内的光强分布。这些分布是研究多光子激发荧

光成像轴向层析能力和横向分辨力的手段。记录穿越针孔的光子 ($r_d < R_d$) 可以获得物镜 L_1 焦点处荧光团的像。如果进一步记录探测到光子的散射次数, 那么根据散射次数可以区分散射和非散射光子, 从而分别成像。根据成像的比较可以获得散射对成像的影响。通过记录光子传输的时间, 可以研究采用时间门技术对混浊介质成像的改进程度。而按逃逸出介质的角度区分到达光子, 则可以分析环瞳(角度

门)对成像的影响。当然改变诸如数值孔径、针孔尺寸、针孔形状、物镜油折射系数等光学系统参数, 组织折射率、散射吸收系数、各向异性因子等组织光学参数, 锁模状态等光源参数, 以及聚焦深度等测量参数则可以方便地获得这些因素对成像的影响。进一步, 其它研究方法难以涉足的非线性环节如探测器的非线性效应对成像的影响也可以方便地得到模拟研究。

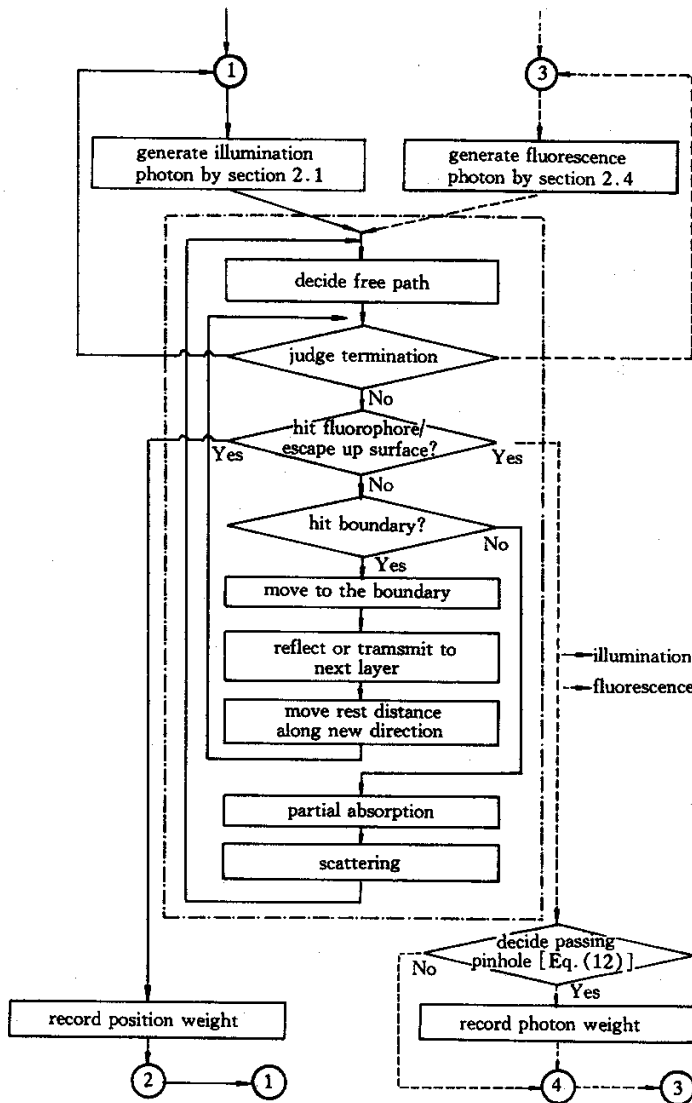


Fig.2 Flow chart of simulation of illumination photon and fluorescence photon transport in MPE imaging (the components in dashdot frame are the same for two cases) ① ② ③ ④ are the connecting points

因为蒙特卡罗方法通常需要巨大的计算资源, 所以采用个人计算机用于该模拟比较勉强。我们采用美国国家标准 (ANSI C) 语言编写了该软件以保证程序在不同计算机系统之间的方便移植, 同时采用一些小技巧 (如尽量减少三角函数运算等) 来实现运算速度的提高。

4 实验与讨论

图 3 和图 4 给出的是单光子激发在不同聚焦深度下, 成像强度随小孔尺寸变化的曲线, 而文献 [11] 中仅仅考虑了光学系统的结果也一并给出。计算中 $NA = 0.7$, $\lambda = 800 \text{ nm}$, 单层样品参数 $\mu_a = 0$, $\mu_s =$

100 cm^{-1} , $g = 0.9$, $n = 1$ 。图中横坐标为针孔半径, 纵坐标为荧光强度(针孔捕获荧光光子数按入射光子数的归一化值)。

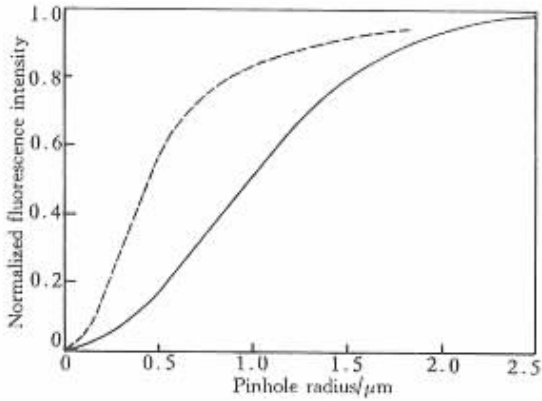


Fig. 3 Fluorescence intensity as a function of pinhole size with incident depth equal to 0. Dashed line denotes result from Ref. [11], and solid line is result from the simulation of this work

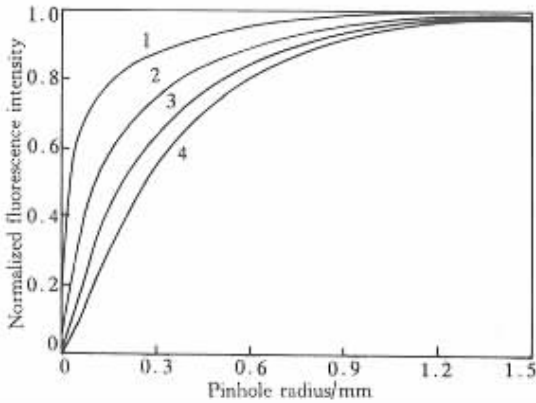


Fig. 4 Fluorescence intensity as a function of pinhole size for various incident depth (1 - 4 denote depth of $1l - 4l$)

参考文献 [11] 中基于光学系统的分析认为针孔尺寸超过第一级艾里斑大小时, 针孔尺寸的改变对成像强度影响不明显, 此时称为饱和针孔尺寸。在比较中, 考虑强度 0.9 处为饱和针孔尺寸大小。在来自参考文献 [11] 的结果中, 该针孔尺寸约为 $1 \mu\text{m}$ (如图 3 虚线所示)。采用蒙特卡罗方法模拟样品表面成像的结果约为 $1.6 \mu\text{m}$ (如图 3 实线所示), 属于同量级。而成像深度增加至 1、2、3、4 倍平均自由程 ($l_1 = 100 \mu\text{m}$) 时该尺寸分别增加至约 0.4 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm 处。该尺寸比样品表面成像时增加约两个数量级。这可以解释为混浊样品对光子的散射使光束严重扩散。由此可见混浊样品的特性对成像的影响非常显著。这一结论与来自文献 [12] 的结果一致。因此我们认为, 在生物样品的成像中仅仅依靠光学系统本身的分析来指导实验是远

远不够的。

在 2.1 中我们引入了一种选择初始散射角的方法。图 5 给出了采用该选择方法和采用文献 [5] 中方法的模拟结果的比较。计算中, 认为荧光物质充满整个混浊样品, 其他参数同前。图 5 记录的是双光子激发成像深度为 $2l$ 时, 激发荧光在混浊介质中的空间分布在 $x - z$ 平面上的投影。图 5(a) 为采用本文方法的结果, 图 5(b) 为采用文献 [5] 中方法的结果。从图 5(a) 中可以明显看出聚焦高斯光束形成的焦点, 而图 5(b) 中则未能体现高斯光束的聚焦。最近 Ying 用实验方法给出了该分布^[13]。与文献 [12] 中图 2(d) 入射深度为 $2.2l$ (平均自由程) 相比, 图 5(a) 更接近实验真实情况。这说明本文方法对聚焦高斯光束模拟改进是有效的。

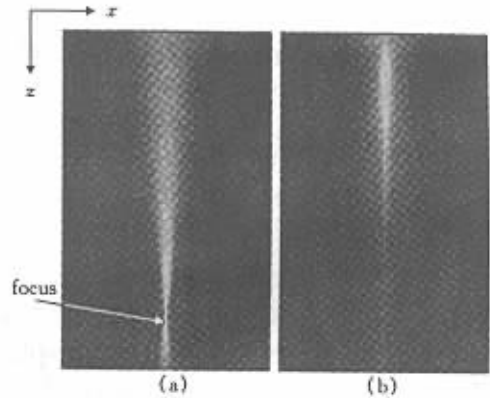


Fig. 5 Spatial distributions of fluorescence emitted for various methods of initial scattering angle selection. (a) Results from our method, (b) Results from method in Ref. [5]

结语 本文给出了用于多光子激发荧光成像显微术研究的蒙特卡罗方法, 该方法的主要特点为几何光线追踪和传统蒙特卡罗方法的结合。本文对该方法的贡献在于推导了多层混浊介质显微成像的仿真数学模型, 改进了对聚焦照明光束的模拟, 并给出了整个模拟的实现程序。另外, 不同成像深度下, 成像强度随针孔尺寸变化的模拟实验结果显示了混浊介质对成像的显著影响, 为实验时选择最佳针孔大小提供了参考。在以上蒙特卡罗方法的研究中, 缺少对一般成像研究的重要内容——干涉的讨论。我们认为, 在多光子激发荧光成像中, 由于荧光的非相干性以及滤光片对照明光的隔离作用, 干涉的影响实际上可以忽略。

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] Gu M , Sheppard C J R. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy. *J. Microsc.* , 1995 , **177**(2) : 128 ~ 137
- [3] Gu M. Resolution in three-photon fluorescence scanning microscopy. *Opt. Lett.* , 1996 , **21**(13) 988 ~ 990
- [4] Wang L , Jacques S L , Zheng L. MCML-Monte Carlo modeling of photon transport in multi-layered tissues. *Comp. Meth. and Prog. Biomed.* , 1995 , **47**(2) : 131 ~ 146
- [5] 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
- [6] 鲁 强 , 曾绍群 , 骆清铭 等. 混浊介质显微成像中吸收作用的门机制. *光学学报* , 2001 , **21**(7) : 796 ~ 799
- [7] 吕百达. *激光光学*. 成都 : 四川大学出版社 , 1986. 85 ~ 89
- [8] Gauderon R , Lukins P B , Sheppard C J R. Effect of a confocal pinhole in two-photon microscopy. *Microsc. Res. and Tech.* , 1999 , **47**(2) 210 ~ 214
- [9] Shen Y R. *The Principles of Nonlinear Optics*. New York : John Wiley & Sons Inc. , 1984. 334
- [10] Cheong W , Pahl S A , Welch A J. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quant. Electron.* , 1990 , **26**(12) 2166 ~ 2185
- [11] Sheppard C J R. *Confocal Laser Scanning Microscopy*. London : BIOS Scientific Pub. , 1997. 33 ~ 43
- [12] Gan X S , Schilders S P , Gu M. Image formation in turbid media under a microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)* , 1998 , **15**(6) 3052 ~ 3058
- [13] Ying J , Liu F , Alfano R R. Spatial distribution of two-photon-excited fluorescence in scattering media. *Appl. Opt.* , 1999 , **38**(1) 224 ~ 229

Monte Carlo Simulation for MPE Fluorescence Microscopy in Turbid Media

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 3 April 2000 ; revised 27 September 2000)

Abstract : A numerical program , which combines Monte Carlo method with geometrical ray trace used to study the behaviour of multi-photon excitation (MPE) fluorescence microscopic imaging through turbid media , is presented. The mathematical model used to microscopically image multi-layered tissues is presented. The basic skeleton of the simulation program is demonstrated with flow chart. A skill is introduced to improve the traditional Monte Carlo method , which enhances the capability of simulation of the converging light. The prominent effect on microscopic imaging caused by scattering characteristics of turbid media is shown through preliminary simulation experiments.

Key words : multi-photon excitation ; fluorescence microscopy ; Monte Carlo method ; turbid media