

文章编号: 0253-2239(2006)08-1214-6

用基于方位分辨的漫后向散射光确定粒子尺寸分布 及相对折射率*

邓 勇 鲁 强 骆清铭**

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉光电国家实验室生物医学光子学研究部, 武汉 430074)

摘要: 基于偏振门技术, 提出了利用漫后向散射光随线偏振光入射方位的变化来测量双层模型表层的粒子尺寸分布及相对折射率。双层物理模型用来模拟上皮组织, 上层分别由聚苯乙烯小球或 HeLa 细胞悬浮液组成, 下层由脂肪乳溶液组成, 每层的光学特性与上皮组织光学特性匹配。根据米氏(Mie)散射理论, 建立了与散射体形态参量相关的偏振后向漫散射强度随入射偏振方位变化的理论模型, 并采用浮点遗传算法反演程序获得表层粒子的尺寸分布(PSD)及相对折射率。将理论值和实验测量值进行比较。研究结果表明通过测量随方位变化的后向漫散射光的偏振差分信号, 能够获得类上皮组织模型表层的形态结构信息。

关键词: 医用光学与生物技术; 尺寸分布及折射率; 偏振光; 双层模型

中图分类号: Q631; O436.2 文献标识码: A

Measurement of Particle Size Distribution and Refractive Index Using Azimuth-Resolved Based Diffuse Backscattering Light

Deng Yong Lu Qiang Luo Qingming

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

Abstract: The measurement of particle size distribution and refractive index of the thin layers in two-layer tissue phantoms by using the diffuse backscattering light dependent on the azimuth angle of the linearly polarized incident light. In the two-layer model, the upper layer consists of polystyrene spheres suspension or HeLa cells, and the bottom layer is intralipid solution. Optical properties of both layers are supposed to match those of biological tissue. Based on Mie theory, the theoretical model for dependence of particle morphological parameters related polarized diffuse backscattering light intensity on the polarization angle of the incident light is built up. The particle size distribution and relative refractive index are derived by using inverse program of floating genetic algorithm. Comparison of theoretical and experimental results are made, and it is found that the morphological structure information of thin layer tissue can be drawn by measuring and analyzing the polarized differential signal of the azimuth angle-dependent diffuse backscattering light.

Key words: medical optics and biotechnology; size distribution and refractive index; polarized light; two-layer phantoms

1 引 言

在体获得高分辨率的上皮组织的结构变化图像或抽取定量的形态参量, 为早期癌症诊断提供客观依据, 正成为生物光学领域的一个研究热点。病理

学研究表明超过 85% 的癌症源于上皮组织。上皮组织是覆盖体表或体腔内表面的一层粘膜。癌症早期特征即表现为上皮层内细胞核尺寸增大、核染色质增加。常规的临床检测方法是对怀疑的位点进行

* 国家自然科学基金(60440420131, 30470460)和国家科技攻关计划(2005BA711A04)资助课题。

作者简介: 邓 勇(1966~), 女, 副教授, 博士后, 主要从事生物医学和光学成像的研究。E-mail: ydeng_1992@126.com

** 通信联系人。E-mail: qlu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-09-12; 收到修改稿日期: 2006-02-05

病理切片、细胞涂片等组织活检手段,这种方法是侵入式的,给患者带来很大痛苦。光学方法具有非侵入性、高灵敏性,特别适合于早期癌症检测。国际上很多小组正在进行这方面的工作。R. V. Kuranov^[1]采用光学弱相干层析(OCT)方法,研究了正常的食道上皮和瘤细胞扩散引起的结构变化和粘膜表面的不规则;K. B. Sung^[2]采用光纤共焦显微术(FCRM)能够从各种深度的共焦图像中抽取上皮细胞的形态特征,包括细胞核尺寸和核质比;L. T. Perelman 和 V. Backman 小组通过探测上皮粘膜组织的后向散射光谱,把细胞核看作米氏散射体,采用最小二乘拟合光谱数据获得上皮细胞核的尺寸分布及折射率^[3~9];Matthew Bartlett 以皮肤癌为模型,用偏振散射光谱测量薄层介质的尺寸分布^[10,11]。这些研究都是基于上皮组织是双层散射介质,正常的上皮组织表层的上皮细胞对光的后向散射是单次散射。研究目的在于获取上皮组织结构的变化特征,获取上皮细胞的形态变化和密度变化^[12]。本文提出了利用波片及偏振片,使线偏振光以不同的方位入射,探测随方位变化的后向漫散射光的垂直和平行偏振分量,并对测量的强度采用浮点遗传算法反演^[13],从而获得双层组织模型表层的尺寸分布及折射率,且双层模型的光学特性与上皮组织光学特性匹配。这种测量方法的优点是单波长点源入射,避免了散射光谱术忽略介质折射率随波长变化的缺点,与共焦显微术和光学弱相干层析相比,所用仪器少,操作简便。

2 理论模型及实验方法

如图1所示,入射光、探测器和入射点构成散射平面。 z 轴是光传播方向, y 轴垂直于散射平面, x 轴平行于散射平面,入射光的偏振方位角位于 xy 平面

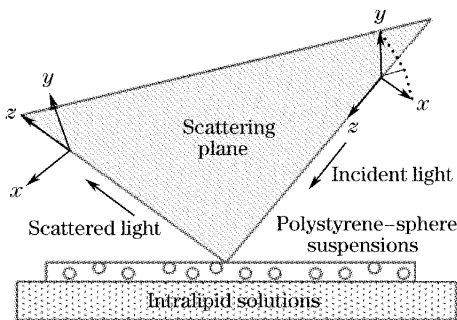


图1 散射面坐标系示意图

Fig. 1 Schematic diagram of scattering plane and coordinate system

内,定义为与 x 轴的夹角 ϕ 。

对于双层介质,线偏振光入射后,由于用于模拟上皮细胞核的上层散射体,对光信号的单次散射,仍然保持其偏振性,即

$$I_{//u}^s \gg I_{\perp u}^s, \quad (1)$$

$I_{//u}^s$ 表示来自上层与入射偏振平行的散射强度分量, $I_{\perp u}^s$ 表示上层与入射偏振垂直的偏振分量。而底层介质模拟对光有强烈的去偏性的纤维网状结构的基膜有

$$I_{//b}^s \gg I_{\perp b}^s, \quad (2)$$

$I_{//b}^s$ 表示来自底层与入射偏振平行的散射强度分量, $I_{\perp b}^s$ 表示来自底层与入射偏振平行的散射强度分量。

对组织模型取入射偏振平行的散射强度分量 $I_{//}$,该平行分量由两部分组成:一部分来自于上层的单次散射 $I_{//u}^s$,还有一部分来自于底层经历了多次散射,失去了原来的偏振性为 $I_{//b}^s$;然后旋转入射偏振片 90° ,这时探测的光不包含上层的单次散射的光部分,是来自下层多次散射的光可作为 $I_{\perp b}^s$,取

$$\Delta I = I_{//u}^s + I_{//b}^s - I_{\perp b}^s \approx I_{//u}^s, \quad (3)$$

这样 ΔI 是来自上层的散射光,消除了下层背景信号的干扰。

根据米氏理论,波长为 λ 的平面波,被一个直径为 d ,相对折射率为 n 的均匀各向同性的小球散射,其散射场由下式决定

$$\begin{bmatrix} E_{s//} \\ E_{s\perp} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_2(\theta) & 0 \\ 0 & S_1(\theta) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{i//} \\ E_{i\perp} \end{bmatrix} \frac{\exp(-ikr + i\omega t)}{ikr}, \quad (4)$$

$E_{s//}$, $E_{s\perp}$ 为散射光平行和垂直于散射平面的两个分量, $E_{i//}$, $E_{i\perp}$ 为入射光垂直于散射平面的两个分量。 κ 和 ω 分别是光的波数和角频率, r 是散射粒子和观察点之间的距离。函数 $S_i(\theta)$ ($i=1,2$)是散射幅值, θ 是入射方向和散射方向的夹角。其散射强度,有

$$\begin{aligned} I_p^s &= |S_2(\theta)|^2 I_p^i, \\ I_s^s &= |S_1(\theta)|^2 I_s^i, \end{aligned} \quad (5)$$

这里 I_p^s , I_s^s , I_p^i , I_s^i 分别是平行于散射平面和垂直于散射平面的散射强度和入射强度。若方位角为 ϕ 的线偏振光入射,设入射立体角为 $\Delta\Omega_0$,强度为 I_0 ,散射收集角为 $\Delta\Omega$,这样与入射偏振平行的散射光强为

$$I_{//}^c(\theta, \varphi, \lambda) = \frac{I_0}{k^2 r^2} \int_{\Delta\Omega} \int_{\Delta\Omega_0} ds_0 [\cos^4 \varphi \cos^2 \theta |S_2^z|^2 + \sin^4 \varphi |S_1^z|^2 + 2 \cos^2 \varphi \sin^2 \varphi \cos \theta \operatorname{Re}(S_1, S_2^*)], \quad (6)$$

实验中,入射立体角非常小, $\Delta\Omega_0 \approx 0$,且由于探测的信号来自多个粒子的贡献,把每个粒子的贡献都考虑在内,因此 ΔI 有

$$I_{//}^c(\theta, \varphi, \lambda) = \frac{I_0}{k^2 r^2} \int_{d_1 \theta_1}^{d_2 \theta_2} [\cos^4 \varphi \cos^2 \theta |S_2^z|^2 + \sin^4 \varphi |S_1^z|^2 + 2 \cos^2 \varphi \sin^2 \varphi \cos \theta \operatorname{Re}(S_1, S_2^*)] f(x) \sin \theta d\theta dx, \quad (7)$$

d_1, d_2 是粒子尺寸分布范围, θ_1, θ_2 是收集角的范围,本实验系统的收集角为 0.03 rad, $f(x)$ 是粒子尺寸分布,根据文献正态分布或修正的对数正态分布能够重现生物组织的散射特性^[14],本文采用高斯正态分布。对每一个方位角测量,其总强度为

$$I_{\text{tot}}^c = I_{//\text{inc}}^c(\theta, \varphi, \lambda) + I_{\perp\text{inc}}^c(\theta, \varphi, \lambda), \quad (8)$$

为了消除由光学元件和机械部件引起的强度误差,归一化方程(3),可得到

$$\frac{I_{//}^c(\theta, \varphi, \lambda)}{I_{\text{tot}}^c} = \frac{I_{//\text{a}}^c + I_{//\text{b}}^c}{I_{\text{tot}}^c} - \frac{I_{//\text{b}}^c}{I_{\text{tot}}^c} = \int_{d_1 \theta_1}^{d_2 \theta_2} [\cos^4 \varphi \cos^2 \theta |S_2^z|^2 + \sin^4 \varphi |S_1^z|^2 + 2 \cos^2 \varphi \sin^2 \varphi \cos \theta \operatorname{Re}(S_1, S_2^*)] f(x) \sin \theta d\theta dx, \quad (9)$$

C 是与实验系统有关的常数。

实验系统由 He-Ne 线偏振激光器输出功率为 10 mW,发射波长 λ 为 632.8 nm,1/2 波片(HWP)及线偏振片(LP1)组合产生不同入射方位的线偏振光。随后通过透镜($f=19$ cm)把光束聚焦到样品上,聚焦后高斯光束光斑直径为 0.1 mm,为了避免镜面反射,入射光束与样品表面法线方向约成 4° 入射。来自样品表面的后向漫散射光,通过分束镜、线性检偏器 LP2,可以提取出与入射偏振方向平行和垂直的偏振信号。随后通过直径为 2 mm 的孔径光阑,直接通过装有制冷 CCD 相机(Roper Scientific Analytical Instrumentation)的光学显微镜成像(奥林巴斯)。CCD 芯片的像素数 1392×1040 ,每个像素尺寸为 $6.45 \mu\text{m} \times 6.45 \mu\text{m}$ 。CCD 的动态范围为 12 位,操作软件 RSI。

入射光路上的 1/2 波片 HWP 及线偏振片 LP1 和后向漫散射光的检偏片安装在手动角度旋转装置上,旋转角间距为 1° 。测量时,首先设置检偏片的偏振轴与散射平面的夹角 ϕ ,随后旋转 1/2 波片 HWP 及线偏振片 LP1,使入射光的偏振方向与检偏片偏振轴平行,测得光强记为 I_{ϕ}^{\parallel} ,然后使入射光偏振方向旋转 90° ,测得光强记为 I_{ϕ}^{\perp} ,这样对每次检偏方位,测量两套数据,一套是检偏片和取偏片的偏振轴互相平行;另一套是取偏片和检偏片的偏振轴互相垂直。

3 实验材料准备

第一组实验介质模型的表层由聚苯乙烯小球(Duke Scientific Co.)组成。母液浓度为 0.3%,平均直径分别为 $9 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球,经过计算,粒子数密度分别为 $4.584 \times 10^7/\text{ml}$ 、 $7.861 \times 10^6/\text{ml}$ 。首先把质量分数为 0.3%,平均直径分别为 $9 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球,用去离子的蒸馏水分别稀释到所需浓度,分别滴在直径为 34 mm,深度为 10 mm 的玻璃器皿中,使其光学厚度约为 1。

第二组实验介质模型的表层由 HeLa(宫颈癌细胞)细胞。用微量移液器从计数板边缘轻轻滴 1~2 滴细胞悬液用计数板进行计数,获得以细胞数/ml 表示的不同的细胞粒子数浓度。实验采用的细胞母液的密度为 $1.0 \times 10^8/\text{ml}$,然后用细胞完全培养液[DMEM 培养液中加入 10% NCS(小牛血清)]稀释到不同浓度,分别滴在直径为 34 mm,深度为 10 mm 的玻璃器皿中,形成光学厚度为 1 左右的细胞薄层。

底层介质都采用标准的组织模型体积分数 20% 脂肪乳溶液(Fresenius Kabi Co.),用去离子的蒸馏水调整浓度,使其约化散射系数 $\mu'_s = 2.0/\text{mm}$,然后加一滴合盼蓝(英国进口封装,上海化学试剂站分装厂),吸收系数 $\mu_a = 0.002 \sim 0.4 \text{ mm}^{-1}$,近似上皮基底膜的光学特性,放在直径为 16 mm,深度为 18 mm 的 24 孔板中。使偏振激光照射在该底物上,偏振探测能够使 $I_{\perp} \approx I_{//}$,表明达到完全消偏效果。

4 结 果

4.1 聚苯乙烯小球模型实验

图 2(a)是表层粒子直径为 $9 \mu\text{m}$, 标准偏差 $0.09 \mu\text{m}$, 相对折射率 1.19 , 散射系数 μ_s 约为 1 mm^{-1} , 光学厚度近似为 1 的聚苯乙烯小球溶液时, 测量检偏方向与入射偏振方向平行和垂直的后向散射光的强度随入射偏振方位角的变化。图中表明, 平行分量显著高于垂直分量。图 2(b)是其对应

的平行分量和垂直分量的差值的归一化(ΔI)以及根据米氏理论, 由方程(7)预测的后向散射强度($I_{//\nu}$)随入射偏振方位角的变化。同样, 表层粒子采用直径分别为 $5 \mu\text{m}$, 标准偏差 $0.05 \mu\text{m}$, 散射系数 μ_s 约为 1 mm^{-1} , 光学厚度近似为 1 的聚苯乙烯小球溶液时的测量结果如图 2(c)、图 2(d)所示。显然粒子直径不同, 探测的偏振后向散射强度随方位角的变化具有不同的变化趋势。

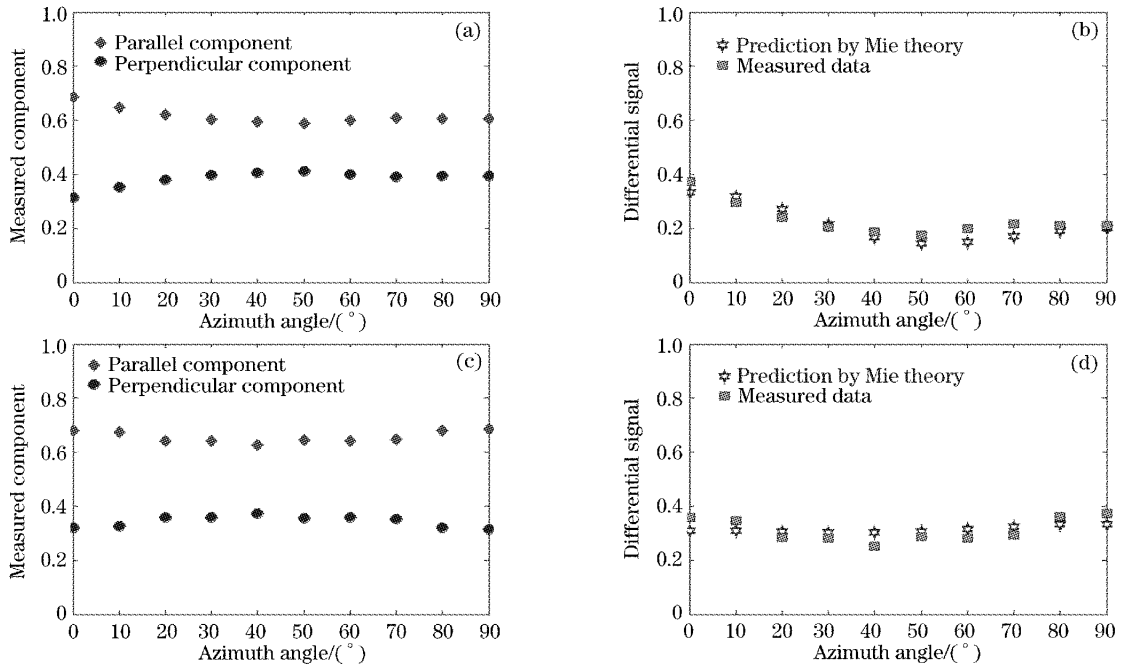


图 2 双层模型平行和垂直偏振分量、差值 ΔI 和预测值

Fig. 2 The measured parallel and perpendicular components, differential signal ΔI and calculations by Mie theory in two-layer phantoms

根据测量的后向漫散射强度 ΔI , 根据米氏理论模型方程(7), 采用浮点遗传算法反演, 经过多次反

演平均, 可获得的粒子尺寸分布(PSD)如图 3 所示。多次测量结果统计平均得到粒子平均尺寸测量误差

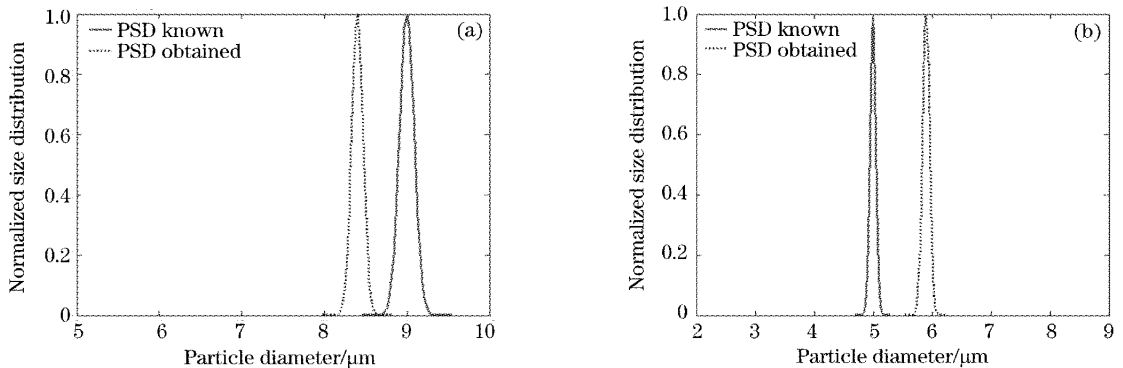


图 3 (a)根据图 2(a),(b)抽取的小球直径为 $8.5 \mu\text{m}$, 标准偏差 0.1 , 相对折射率 1.09 ; (b)根据图 2(c),(d)抽取的小球直径为 $5.9 \mu\text{m}$, 标准偏差 0.06 , 相对折射率 1.12

Fig. 3 Microspheres size distributions extracted from ΔI in Fig. 2(a),(b), diameter of $8.5 \mu\text{m}$, standard deviation 0.1 , and relative refractive index 1.09 , (b) microspheres size distributions extracted from ΔI in Fig. 2(c),(d) diameters of $5.9 \mu\text{m}$, standard deviation 0.06 , relative refractive index 1.12

近似为 $\pm 1.5 \mu\text{m}$, 相对折射率为 ± 0.1 。从测量的后向散射强度分量与理论预测值及反演结果来看, 理论预测值和实验测量值之间、实际值与测量值有一定的误差。通过分析, 测量误差是由于系统元件的机械误差和光学误差造成。主要包括: 1) 系统中光学元器件的固有缺陷, 在系统测量方法的理论推导过程中, 所有光学元器件均被看作理想器件。但是, 实际用于系统搭建的光学元器件与理想器件相比有一定差距。本系统中所用到的偏振元件主要有偏振片、波片和消偏振分光棱镜, 理想的偏振片消光比 $P=\infty$, 是直线偏振器, 但是本系统中所用到的偏振片的消光比 $P=1000$, 只是部分偏振器; 2) 各偏振器件的方位角机械误差, 系统中的偏振片和波片的光轴的方位角需要多次设定, 而偏振片夹持装置能够达到的精度为 1° , 即方位角的设定的精度为 1° , 经过计算所带来的误差不超过 3.48% ; 3) CCD 相机本身的电子噪声和测量环境中的背景噪声均对测量结果有影响; 4) 浮点遗传算法反演误差。经过 70 代反演迭代, 每个参量的相对误差趋于稳定, 最小的达到 0.02% 左右, 最大的约为 0.4% 。

4.2 癌细胞模型实验

图 4 是宫颈癌 (HeLa 细胞) 的荧光显微图像, 放大倍数为 20。根据显微测量结果可估算出细胞核的平均直径约为 $17 \mu\text{m}$, 细胞的平均直径为 $36 \mu\text{m}$ 。细胞是由许多超微结构组成的体系, 其散射

光强是各种细胞器的总贡献, 包括线粒体、细胞核、核仁等。但是实验研究表明小细胞器主要是大角度散射, 而细胞核经历了小角度散射, 因此后向散射偏振分量主要来自经细胞核散射的光强, 理论预测时, 细胞核周围的介质折射率采用为 $1.36\sim 1.38$, 细胞核的折射率采用 $1.43\sim 1.45$ ^[14]。用 HeLa 细胞溶液构成双层模型的表层, 细胞密度为 $1.0\times 10^6/\text{ml}$, 深度 $400 \mu\text{m}$, 使其光学特性与上皮组织匹配。测量随入射方位变化的平行和垂直偏振分量的差值 ΔI , 并与基于米氏理论的预测值比较如图 5(a) 所示。图 5(b) 是根据所测数据反演的尺寸分布 (PSD) 结果和显微测量估算的值的比较。HeLa 细胞的平均直径, 标准偏差, 折射率的测量结果分别为 $15.7 \mu\text{m}$ 、 1.2 、 1.1 , 和估算的值吻合较好。

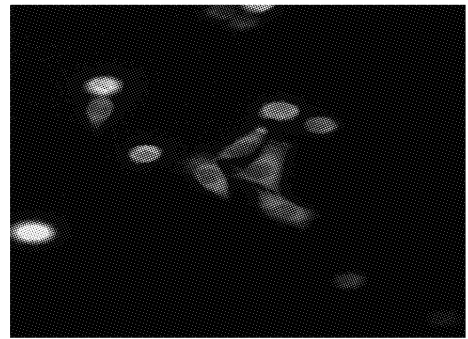


图 4 HeLa 细胞的荧光成像。放大 20 倍

Fig. 4 Fluorescence microscopic image of HeLa cells at $20\times$ magnification

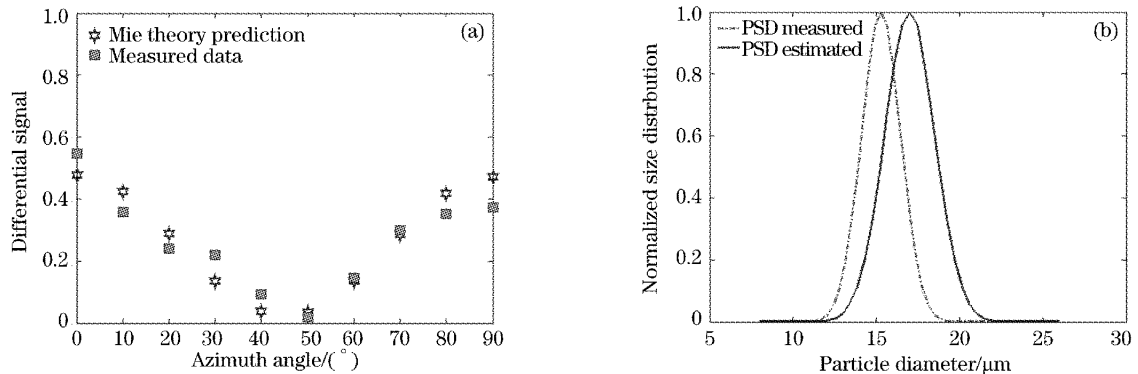


图 5 双层模型癌细胞 (a) 平行和垂直偏振分量的差 ΔI 以及基于米氏理论的预测值, (b) 根据 ΔI 抽取的尺寸分布及显微测量值

Fig. 5 (a) Comparison of the measured differential signal ΔI of the parallel and perpendicular components measurement with the predictions based on the calculations by Mie theory, (b) HeLa cells size distributions extracted from ΔI and estimated from the fluorescence microscopic measurement

5 结 论

本文提出了用基于方位分辨的漫后向散射光确定粒子尺寸分布及相对折射率, 建立了基于米氏理

论的单个后向散射强度随偏振方位变化的理论模型。采用聚苯乙烯小球标准溶液验证了该方法的可行性, 并对 HeLa 细胞模型进行了测量。结果表明,

通过测量双层组织模型随入射偏振方位变化的后向漫散射光的平行分量和垂直分量,并对其差分信号采用浮点遗传算法反演,能够获得表层组织的尺寸分布及相对折射率。

致谢 感谢本实验室的胡锐硕士对实验所作的工作,以及林居强博士提供的 HeLa 细胞。

参 考 文 献

- 1 R. V. Kuranov, V. V. Sapozhnikova, I. V. Turchin *et al.*. Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues [J]. *Opt. Exp.*, 2002, **10**(15): 707~713
- 2 Kung-Bin Sung, Rebecca Richards-Kortum, Michele Follen *et al.*. Fiber optic confocal reflectance microscopy: a new real-time technique to view nuclear morphology in cervical squamous epithelium in vivo[J]. *Opt. Exp.*, 2003, **11**(24): 3171~3181
- 3 L. T. Perelman, V. Backman, M. B. Wallace *et al.*. Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue; a new technique for measuring nuclear size distribution[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1998, **80**(3): 627~630
- 4 Michael B. Wallace, Lev T. Perelman, Vadim Backman *et al.*. Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy [J]. *Gastroenterology*, 2000, **119**(3): 677~682
- 5 Vadim Backman, Rajan Gurjar, Kamran Badizadegan *et al.*. Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial structures in situ[J]. *IEEE J. Sel. Topics Quant. Electron.*, 1999, **5**(4): 1019~1026
- 6 V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman *et al.*. Diagnosing cancers using spectroscopy [J]. *Nature*, 2000, **406**(6791): 35~36
- 7 Rajan S. Gurjar, Vadim Backman, Lev T. Perelman *et al.*. Imaging human epithelial properties with polarized light-scattering spectroscopy [J]. *Nature Medicine*, 2001, **7**(11): 1245~1248
- 8 Vadim Backman, Ven Katesh Gopal, Marim Kalashnikov *et al.*. Measuring cellular structure at submicrometer scale with light scattering spectroscopy [J]. *IEEE J. Sel. Topics Quant. Electron.*, 2001, **7**(6): 887~892
- 9 Rebekah Drezek, Martial Guillaud, Thomas Collier *et al.*. Light scattering from cervical cells throughout neoplastic progression; influence of nuclear morphology, DNA content, and chromatin texture[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**(1): 7~16
- 10 Matthew Bartlett, Huabei Jiang. Measurement of particle size distribution in multilayered skin phantoms using polarized light spectroscopy [J]. *Phys. Rev. E*, 2002, **65**(3): 031906-1~031906-6
- 11 Huabei Jiang. Subcellular sizing with polarized light spectroscopy [J]. *Opt. Commun.*, 2003, **226**(2003): 279~283
- 12 Deng Yong, Luo Qingming, Lu Qiang. Analyses of singly backscattering spectra for a two layer scattering medium[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(4): 595~599(in Chinese)
邓 勇, 骆清铭, 鲁 强. 双层散射介质的单次后向散射光谱分析[J]. *光学学报*, 2006, **26**(4): 595~599
- 13 Yong Deng, Rui Hu, Qingming Luo *et al.*. Float genetic algorithm for determination of particle size distribution and refractive index in polarized LSS[C]. *Proc. SPIE*, 2005, **5693**: 10~16
- 14 Judith R. Mourant, Tamara M. Johnson, James P. Freyer. Characterizing mammalian cells and cell phantoms by polarized backscattering fiber-optic measurements[J]. *Appl. Opt.*, 2001, **40**(28): 5114~5123