

文章编号: 0253-2239(2007)11-2038-4

组织模型偏振后向散射差分光谱的测量*

杜玲艳 邓 勇 鞠 栅 骆清铭 鲁 强

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 建立了一套用于测量生物组织模型偏振后向散射差分光谱的实验系统。在系统中, 线偏振光入射到样品表面, 检偏器和光谱仪配合记录后向散射光中的平行和垂直分量, 随后计算出差分光谱。采用了平均直径分别为 $5.0\ \mu\text{m}$ 、 $9.0\ \mu\text{m}$ 的两种聚乙烯小球悬浮液进行实验, 结果与蒙特卡罗模拟进行对照, 验证了实验系统的正确性。初步研究了粒子尺寸分布变化对差分光谱的影响, 结果表明, 偏振散射差分光谱能敏感地反映粒子尺寸分布的变化, 在大小粒子的混合液中, 大粒子浓度一定程度的增加, 光谱仍保留小粒子的振荡趋势, 但差分光强减小。该方法对于早期癌症检测具有潜在应用意义。

关键词: 医用光学与生物技术; 偏振散射光谱; 偏振门; 组织模型

中图分类号: Q63; O436.3 文献标识码: A

Measurement of Polarized Backscattering Differential Spectra for Tissue Phantom

Du Lingyan Deng Yong Ju Shan Luo Qingming Lu Qiang

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: A system for measuring polarized backscattering differential spectrum is reported. In the system, linearly polarized light is used to illuminate the sample surface, parallel and perpendicular components of its backscattered light are measured with polarizer and spectroscopy, thereafter, the differential spectrum is calculated. Our system is validated by the comparison with Monte Carlo simulation, in which two kinds of polystyrene spheres with diameters of $5.0\ \mu\text{m}$ and $9.0\ \mu\text{m}$ are used. Based on this, the influence of the distribution of sphere size on differential spectrum is studied initially and roughly. Its result shows the differential spectrum can reflect the change of size distribution sensitively. In the mixtures of small and large spheres, when the relative concentrations of large spheres is increased in limited range, the oscillation frequency keeps identical to the small spheres, but differential signal intensity is weakened. It implies the polarized backscattering differential spectra can be used for pre-cancer detection potentially.

Key words: medical optics and biotechnology; polarized scattering spectrum; polarization gate; tissue phantom

1 引 言

细胞形态学的变化概括了整个肿瘤形成的过程, 是肿瘤确诊的关键特征之一, 肿瘤的形成也往往最先反映于细胞形态的变化。癌症早期最重要的特征即表现为上皮层内肿瘤细胞的细胞核尺寸、核浆比和核染色质的增加。若能检测到这些癌症的早期信号并治疗, 大部分患者可以痊愈^[1]。

通过测量后向散射光谱, 有望无损、在体地获得有关这些细胞形态变化的信息^[1]。病理学研究表明

超过 85% 的癌症源于上皮组织^[1]。光在组织中穿透深度大大超过了上皮细胞层的厚度, 来自于上皮细胞的后向散射光通常被下层组织的漫散射背景光所遮盖。为了有效探测到表层细胞的特征, 从而敏感地检测到早期癌症, 往往需要屏蔽来自深层组织的多次散射背景光。偏振散射光谱术(LSS)引入偏振门技术, 通过测量差分光谱来提取浅表层组织信息^[1]。近年来在其成像机理、技术改进以及临床应用方面的研究, 都有相当显著的进展。

* 国家自然科学基金(30470460)资助课题。

作者简介: 杜玲艳(1983—), 女, 湖北枝江人, 硕士研究生, 主要从事组织光学方面的研究。E-mail: dulingyan927@163.com

导师简介: 鲁 强(1973—), 男, 湖南宁乡人, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物组织光学成像理论及生物信息学等方面的研究。E-mail: luqiang@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2007-01-08; 收到修改稿日期: 2007-06-11

Backman^[1~4]通过测量上皮组织的偏振后向散射差分光谱,结果显示了偏振散射差分光谱对上皮组织光学特性参量的敏感性,对测量的差分光谱进行傅里叶分析,获得了正常的和癌变的结肠细胞核的尺寸分布、粒子数密度以及相对折射率; Mourant^[5,6]和 Sokolov^[7]等则在测量中采用基于光纤式探头设计,能更好地获得表层组织的形态信息。在这些研究中,入射到样品上的光大多是小角度入射,入射角约为 15° 。Shan Ju 等^[8]利用蒙特卡罗模拟方法对偏振散射光谱术的关键问题——探测深度进行了探讨,结果表明,对于各向异性因子 g 较大 ($g > 0.95$) 的生物上皮组织,增加入射角能够有效地减小平均探测深度。

本文建立了一套大角度入射的偏振后向散射光谱测量系统,并研究了粒子尺寸分布对偏振后向散射光谱的影响。

2 方 法

2.1 测量原理

生物组织等效粒子的粒度大小在可见光区远远大于波长,可以通过米氏散射理论对其散射光强进行计算与分析^[9]。散射光强是粒子相对折射率、直径及入射波波长的函数。粒子的尺寸将影响散射子对光的散射作用。而对于同一种粒子,散射光强也将随着波长的变化而变化。

偏振门技术是利用线偏振的入射光经过散射介质后就变成椭圆偏振光的特性进行光子选通。如果让线偏振光入射到生物组织等混浊介质上,出射光通过另一检偏器进行检测,让检偏器的偏振方向与起偏器偏振方向成不同的夹角,如 0° 和 90° , 测量平行分量和垂直分量,计算两者之差得到偏振散射差分光谱。

2.2 实验系统

图 1 给出了测量组织模型偏振后向散射光谱的实验光路。光源是功率为 100 W 的卤素灯 (LG-PS2, OLYMPUS), 发射波长范围为 400~900 nm, 经光纤导出, 再经聚光镜 C 聚光。透镜 L1 ($f = 50.8$ mm)、L2 ($f = 50.8$ mm) 和光阑 A1 共同组成 4- f 准直系统, 其中 A1 位于 L1、L2 的焦平面上, 调节光阑 A1 的孔径, 可以改变光线的准直程度, 将光阑孔径调节到最小时, 可得到准直的可见光。偏振片 P1 用来对可见光起偏, 产生线性偏振光。线性偏振光斜入射到装有聚乙烯小球悬浮液的比色皿上, 该比色皿对可见光是完全透过的, 厚度为 5 mm。

入射角 α 约为 30° , 样品表面光斑直径约为 2.5 mm。

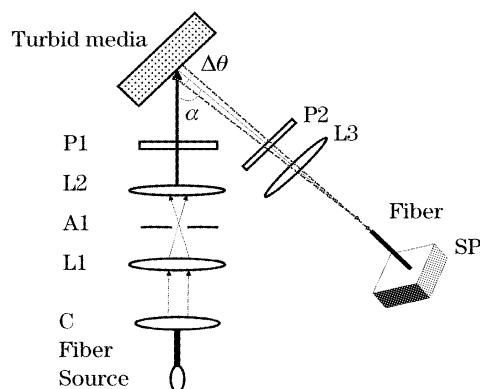


图 1 偏振后向散射差分光谱测量系统

Fig. 1 System measuring polarized backscattering differential spectrum

当入射光束到达被测混浊介质表面时,一部分将在介质表面发生镜面反射,一部分则进入介质中发生漫散射。漫散射光又分为前向散射光和后向散射光,前向散射光透过容器壁不被探测,实验中所收集的是以容器表面法线为中心的立体角范围约为 0.0275 rad 的后向散射光,完全避开了镜面反射光。在散射光的检测部分,转动偏振片 P2,先让其偏振化方向平行于入射光的偏振方向,后让其偏振化方向垂直于入射光的偏振方向,先后测量后向散射光中两个偏振方向互相正交的分量 $I_{\parallel}(\lambda)$ 、 $I_{\perp}(\lambda)$ 。经样品所散射的光由透镜 L3 ($f = 30.8$ mm) 聚焦后通过一根孔径为 400 μm 光纤导入光谱仪 (HR-2000, Ocean optics) 进行探测,光谱仪中的探测器为线性硅 CCD (ILX511, Sony) 阵列,共有 2048 个像素值,每个像素的尺寸为 14 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$,波长分辨力为 0.46 nm。光谱仪的感光范围为 200~1100 nm, 操作软件 OOIBase32。

考虑到测量的目的是微小球悬浮液的偏振散射差分光谱,空气中的灰沉粘附于比色皿表面后会对实验结果产生一定的影响。为了减小实验误差,在将样品放入容器之前,必须先测出比色皿容器平行和垂直分量的后向散射光谱,并作为噪声减去。由于收集角度小,所收集的后向散射光较弱,为了提高信噪比,需适当延长光谱仪中 CCD 的曝光时间,设置 CCD 的积分时间为 600 ms。

用一标准的漫反射参考平面 (WS_1 Diffuse Reflection Standard, Ocean Optics) 来修正光源发出的光在各个波长处光强的不一致。当样品台上放一漫反射平面时,测得平行和垂直分量 $I_{\parallel R}(\lambda)$ 、 $I_{\perp R}(\lambda)$ 。 $I_{\parallel}(\lambda)$ 、 $I_{\perp}(\lambda)$ 、分别经 $I_{\parallel R}(\lambda)$ 、 $I_{\perp R}(\lambda)$ 的和归一化后得差分光谱

$$\Delta I(\lambda) = \frac{I_{\parallel}(\lambda) - I_{\perp}(\lambda)}{I_{\parallel R}(\lambda) + I_{\perp R}(\lambda)}$$

2.3 组织模型

在发展和测试一种生物光学新技术的过程中,往往采用聚乙烯小球悬浮液来模拟生物组织的混浊特性。聚乙烯小球是一种标准的,可重复性的模型^[7]。实验采用服从高斯分布(平均直径分别为 $5.0\ \mu\text{m}$ 、 $9.0\ \mu\text{m}$,方差分别为 $0.05\ \mu\text{m}$ 、 $0.09\ \mu\text{m}$),相对折射率为1.19,质量分数为0.3%聚乙烯小球悬浮液(Duke Scientific, Palo Alto, CA)构建组织模型。

混合两种不同尺寸的粒子构成组织模型。考虑到人体发育正常的上皮细胞核直径的典型值一般为 $5\sim 7\ \mu\text{m}$ ^[9],采用小粒子模拟正常细胞核,大粒子模拟生理异常细胞如早期癌细胞的细胞核。通过改变大粒子的相对浓度,模拟癌细胞的发展与扩散过程。

3 结果与分析

3.1 实验系统验证

为了验证实验系统的正确性,开发了适合于后

向散射光谱的蒙特卡罗程序^[10],采用与实验相同的条件进行模拟。

分别对平均直径为 $5.0\ \mu\text{m}$ 、 $9.0\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球悬浮液的偏振后向散射差分光谱进行了实验测量和蒙特卡罗模拟。小粒子和大粒子的粒子数密度分别为 $4.5837\times 10^7/\text{ml}$ 、 $7.8595\times 10^6/\text{ml}$ 。将这两种水悬浮液分别装入厚度为 $5\ \text{mm}$ 的比色皿容器中,其光学厚度(光学厚度 $\tau = \mu_s z$ 其中 μ_s 为散射系数, z 为物理厚度)约为8和5。

实验测得的这两种组织模型的偏振后向散射差分光谱如图2(a)、图2(b)中实线,蒙特卡罗模拟的相应实验条件下差分光谱的结果如图2(a)、图2(b)中虚线。在蒙特卡罗模拟中,粒子直径均服从高斯分布($5.0\pm 0.05\ \mu\text{m}$ 、 $9.0\pm 0.09\ \mu\text{m}$,单次模拟光子数为 10^8 个。其他光学参量均由实验条件确定。结果表明,实验和模拟光谱基本吻合,特别是振荡频率和极值位置。对于光谱振幅的差异,我们初步认为来自于入射光发散角的差异。实验中的准直入射光具有一定的发散角,约为 2° ,而模拟中入射光完全准直。

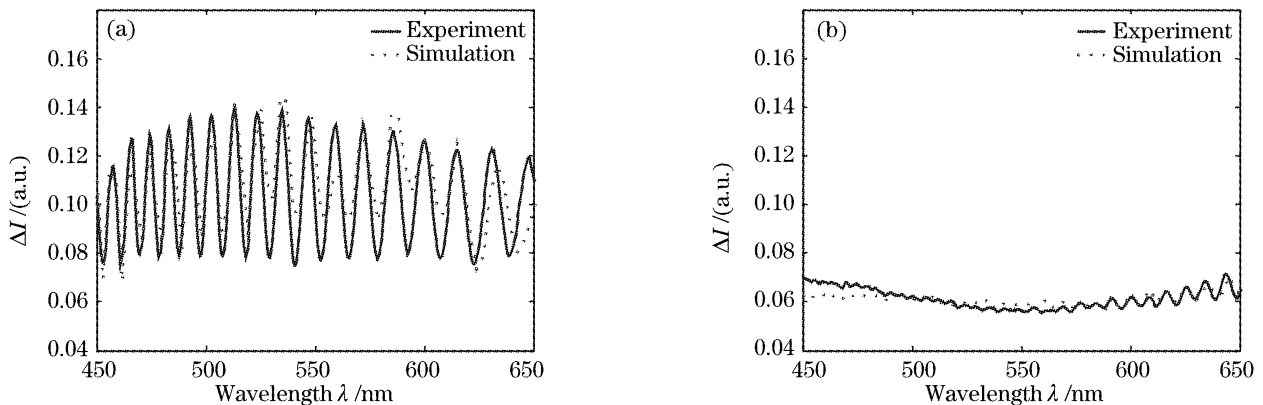


图2 实验结果与模拟结果的比较。(a) 小球直径 $d=5.0\ \mu\text{m}$,相对折射率 $n=1.19$, (b) 小球直径 $d=9.0\ \mu\text{m}$,相对折射率 $n=1.19$

Fig. 2 Comparison of experimental and simulated results. (a) Diameter spheres $d=5.0$, relative reflectivity $n=1.19$, (b) $d=9.0$, $n=1.19$

从图2也可以看出,大小粒子后向散射光谱的振幅、频率具有显著差异。同时,两组偏振后向散射差分光谱呈现以下特点:大、小粒子的光谱的振荡频率均随波长的增大而略有减小。

3.2 偏振散射差分光谱对粒子尺寸敏感性

癌症早期细胞形态的最重要特征之一就是细胞核尺寸增大,且这些癌细胞的数量以较快的速率增长,为了研究偏振后向散射差分光谱对粒子尺寸分布变化的敏感性,往装有小粒子悬浮液的容器中逐步加入大粒子,先后让它们以 $10:0$, $10:2$, $10:4$,

$10:8$ 四种不同的体积比混合,相应的大粒子数与小粒子数之比分别为 0 , 3.43×10^{-2} , 6.86×10^{-2} , 1.372×10^{-1} 。所测量偏振后向散射差分光谱结果,如图3所示。

从图3可以看出,随着大粒子浓度的增加,后向差分光谱振幅发生明显变化。随着大粒子数的增多,光谱的差分光谱强度越来越小。对比图2可知,大粒子的振幅远比小粒子的振幅小,一般而言大粒子的振荡被小粒子的振荡所遮盖,在大粒子数不断增大的过程中,光谱线仍然保留着小粒子的振荡特征。

表 1 给出了四种混合液在 450~650nm 波段测得的差分光强的均值及其减少的百分比。由表 1 可以看出,大粒子数每增加一倍,相应差分光强的均值减少的百分比依次为 4.84%, 5.18%, 9.43%, 差分光谱可以敏感的显现出这种变化。

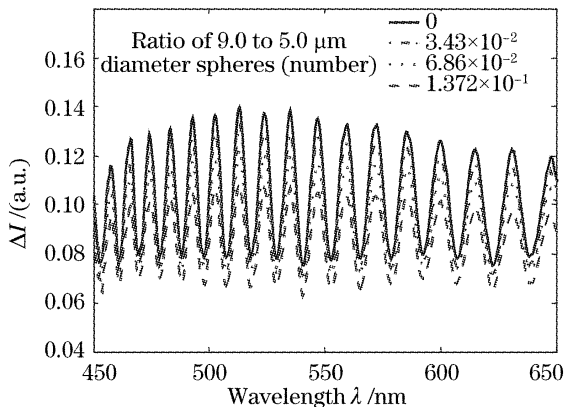


图 3 不同粒子尺寸分布组织模型的偏振后向散射差分光谱
Fig. 3 Polarized backscattering differential spectrum for particles with different size distribution

表 1 不同粒子尺寸分布的组织模型在 450~650 nm 波段偏振散射差分光强均值对比

Table 1 Comparison among the mean of polarized backscattering differential intensity for particles with different size distribution over a wavelength range from 450 nm to 650 nm

Experiment	Ratio of 9.0 to 5.0 diameter spheres / 10^{-2}	The mean of differential intensity	Percentage change in mean differential intensity
Experiment 1	0	0.1034	—
Experiment 2	3.43	0.0984	4.84±0.01%
Experiment 3	6.86	0.0933	5.18±0.01%
Experiment 4	13.72	0.0845	9.43±0.01%

4 结 论

建立了一套测量偏振后向散射差分光谱的光学系统,利用该系统测量了平均直径分别为 5.0 μm 、9.0 μm 的两种聚乙烯小球悬浮液的差分光谱。将实验结果与蒙特卡罗模拟结果对比,验证了其正确性。进一步,将两种聚乙烯小球悬浮液按不同体积比混合,初步模拟了癌细胞扩散过程。实验结果表明偏振后向散射差分光谱对粒子尺寸分布变化比较敏感,同时该光谱能有效反应粒子浓度的变化。这一实验系统对于早期癌症的检测技术的发展具有潜

在研究价值。

参 考 文 献

- Vadim Backman, Rajan Gurjar, Kamran Badizadegan *et al.*. Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures in situ[J]. *IEEE J. Sel. Quant. Electron.*, 1999, **5**(4): 1019~1026
- Young L. Kim, Yang Liu, Ramesh *et al.*. Simultaneous measurement of angular and spectral properties of light scattering for characterization of tissue microarchitecture and its alteration in early precancer[J]. *IEEE J. Sel. Quant. Electron.*, 2003, **9**(2): 243~256
- 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
- Yang Liu, Yong L. Kim, Vadim Backman. Development of a bioengineered tissue model and its application in the investigation of the depth selectivity of polarization gating[J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(12): 2288~2299
- Judieh R. Mourant, Andreas H. Hielscher, Angelia A. Eick *et al.*. Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells[J]. *Cancer (Cancer Cytopathol)*, 1998, **84**(6): 366~374
- T. M. Johnson, J. R. Mourant. Polarized wavelength-dependent measurements of turbid media[J]. *Opt. Exp.*, 1999, **4**(6): 200~216
- Konstantin Sokolov, Rebekah Drezek, Kirk Gossage *et al.*. Reflectance spectroscopy with polarized light; is it sensitive to cellular and nuclear morphology[J]. *Opt. Exp.*, 1999, **5**(13): 302~317
- Ju Shan, Deng Yong, Luo Qingming *et al.*. Monte Carlo simulation of polarization grating for superficial tissue detection[J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(7): (in Chinese)
鞠 珊,邓 勇,鲁清铭等. 浅表组织后向散射检测中偏振门的蒙特卡罗研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(7):
- Craig F. Bohren, Donald R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* [M]. New York: Wiley, 1983. 82~129
- Ju Shan, Deng Yong, Lu Qiang *et al.*. Parallel Monte Carlo program for the spectroscopy of polarized light scattering[J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(3): 510~514 (in Chinese)
鞠 珊,邓 勇,鲁 强等. 用于偏振散射光谱术研究的并行蒙特卡罗程序[J]. *光学学报*, 2007, **27**(3): 510~514
- Deng Yong, Luo Qingming, Lu Qiang. Analyses of single backscattering spectra of 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
- Dizem Arifler, Richard A. Schwarz, Sung K. Chang *et al.*. Reflectance spectroscopy for diagnosis of epithelial precancer: model-based analysis of fiber-optic probe designs to resolve spectral information from epithelium and stroma [J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(20): 4291~4305
- Jessica C. Ramella-Roman, Scott A. Prael, Steve L. Jacques. Three Monte Carlo programs of polarized light transport into scattering media; part I[J]. *Opt. Exp.*, 2005, **13**(12): 4420~4438
- Yang Liu, Xu Li, Young L. Kim *et al.*. Elastic backscattering spectroscopic microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(18): 2445~2447