

文章编号: 0253-2239(2007)07-1245-4

内窥镜式散斑类共聚焦系统层析能力分析*

吴 萍 吕晓华 易秋实 骆清铭 曾绍群

(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: 本文研究了内窥镜式散斑类共聚焦系统(Endoscope-based speckle quasi-confocal system, EBSQCS)的层析能力。从散斑类共聚焦显微镜(Speckle quasi-confocal microscope, SQCM)成像原理出发,详细分析了内窥镜光学结构对散斑类共聚焦显微镜散斑场波动的影响规律,推导了内窥镜光学结构与内窥镜式散斑类共聚焦系统轴向分辨力的关系。实验测得了基于光纤束的内窥镜式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力曲线。选用放大倍率 4 倍,光纤直径 5 μm 的内窥镜系统的内窥镜式散斑类共聚焦系统轴向分辨力曲线的全峰半高是散斑类共聚焦显微镜的 2.3 倍,与理论计算值相符。实验结果表明内窥镜式散斑类共聚焦系统具有很好的轴向层析能力。

关键词: 医用光学与生物技术; 类共聚焦; 散斑; 内窥镜; 轴向分辨力

中图分类号: TH742 文献标识码: A

Optical Sectioning Capability of the Endoscope-Based Speckle Quasi-Confocal System

Wu Ping Lü XiaoHua Yi Qiushi Luo Qingming Zeng Shaoqun

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

Abstract: The sectioning capability of the endoscope-based speckle quasi-confocal system (EBSQCS) is studied. Based on the theory of speckle quasi-confocal microscope (SQCM), the influence of endoscope on the discipline of speckle quasi-confocal microscope speckle fluctuation is discussed, and analytical expression is derived to describe the relationship between optical structure of endoscope and the axial resolution of Endoscope-based speckle quasi-confocal system. The axial resolution curve is also obtained by experiment of Endoscope-based speckle quasi-confocal system with a fiber bundle. The full width at half maximum (FWHM) of Endoscope-based speckle quasi-confocal system resolution curve is 2.3 times of that of speckle quasi-confocal microscope when the endoscope has a magnification of 4 times and fiber diameter of 5 μm , which is in accordance with the theory. The experimental result shows that eEndoscope-based speckle quasi-confocal system has the quality of axial optical sectioning.

Key words: medical optics and biotechnology; quasi-confocal; speckle; endoscope; axial resolution

1 引 言

共聚焦荧光显微镜的突出优势是能够提供光学层析,即突出的轴向分辨力^[1]。但是共聚焦显微镜需要扫描光束,扫描机构的存在使得成像系统非常昂贵,成像速度慢,同时降低了系统的稳定性。也有用

不扫描的方式得到光学层析图像的方案,例如结构光显微镜能够通过算法实现与共聚焦显微镜同样的层析能力,但不适用于厚生物组织成像^[2]。散斑类共聚焦显微镜(Speckle quasi-confocal microscope, SQCM)能够在非扫描的情况下得到具有层析能力的图像,

* 国家自然科学基金(60410131)和国家海外杰出青年科学基金(30328014)资助课题。

作者简介: 吴 萍(1982-),女,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事生物医学光学成像方面的研究。

E-mail: wikey.wu@gmail.com

导师简介: 曾绍群(1969-),男,湖南洞口人,教授,博士生导师,主要从事成像技术与方法在生物医学、环境监测中的应用以及生物复杂系统整合模拟方面的研究。E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2006-10-17; 收到修改稿日期: 2006-12-07

并特别适合对厚生物组织成像^[3,4]。内窥镜是利用光纤束传像原理制成的医学成像装置,广泛应用于生物医疗领域的临床观察、诊断及治疗中。内窥镜具有便捷、无创伤成像的特点^[5~9]。如果能够将散斑类共聚焦显微镜的优点充分应用于内窥镜探测中,不用进行扫描就能够对体内器官进行高分辨实时检测和分析,将会极大地提高成像速度和系统的稳定性,降低成本,具有很高的临床应用价值和社会价值。本文从散斑类共聚焦显微镜原理出发,研究了内窥镜光学结构对光路的改变及其对系统层析能力的影响,定量计算了内窥镜结构与内窥式散斑类共聚焦系统(Endoscope-based speckle quasi-confocal system, EBSQCS)轴向分辨力的关系,证明了内窥式散斑类共聚焦系统的层析能力。分析得到了制约内窥式散斑类共聚焦系统层析能力的因素并提出了解决思路。

2 内窥式散斑类共聚焦系统

内窥式散斑类共聚焦系统是在散斑类共聚焦显微镜的基础上,增加了内窥镜结构,而组成的成像系统如图 1 所示。激光器发出的激光束照射到可旋转的散射屏,散射屏上的激光光斑在样品表面形成动态散斑场。样品发出的荧光由物镜收集,通过内窥镜传输后由 F_3 会聚于 CCD 靶面成像。内窥镜结构通常

使用光纤束传输光信息,在光纤束的两端需要用透镜耦合光束^[8,9]。内窥镜成像原理图见图 1 插图(c),其中 f_1 耦合镜和 f_2 物镜组成望远镜结构,样品置于 f_2 前焦面,光纤束端面置于 f_1 后焦面,物理距离(Physical distance)指光纤中心间距。

2.1 散斑类共聚焦显微镜原理

入射到样品表面的散斑场分布如图 1 插图(b)所示,点线表示的范围是散斑场照到样品上形成的视场范围 D ,点划线表示焦平面位置。小椭圆表示散斑斑点,在 $|z| \leq D/(NA)$ 的范围之内可以近似看成轴向尺寸为 $\lambda/(NA)$ 的随机分布的光斑,并且有很高的对比度。虚线表示 CCD 探测器上任意一点在焦面附近的点扩展函数,散斑场的形成导致荧光信号在焦平面处的对比最明显,而在离焦的时候变模糊。当散斑场随机变化时,在焦平面处,探测器点扩展函数覆盖的范围只会出现有或者没有散斑斑点,即光强度的波动最剧烈;而在离焦的地方,点扩展函数覆盖的范围较大,散斑场的随机变化并不会对探测到的光强带来很大波动。根据以上分析可知,通过标准差算法提取一系列序列图像的波动信息,就可以获得焦平面处的信号而过滤焦平面以外的信号,达到层析的效果^[10]。

假设在一个强散斑场中,照明和探测中都使用高斯-洛伦兹近似,得到散斑类共聚焦显微镜的轴向分辨力符合一个简单的表达式^[10]:

$$\text{RMS} = \frac{\langle I_s \rangle CA}{\sqrt{3 + 2(z/z_r)^2}}, \quad (1)$$

其中 A 为常数, C 为荧光团浓度, $\langle I_s \rangle$ 为样品中的平均散斑强度, z_r 为聚焦激光束的瑞利长度。 z 比 z_r 大时轴向分辨力 RMS 的变化正比于 $1/z$ 。在共聚焦显微镜中 RMS 的变化正比于 $1/z^2$, 因此散斑类共聚焦显微镜只能提供类似共聚焦的层析效果。

2.2 内窥镜的光学结构

内窥镜成像原理如图 1 插图(c)所示,样品发出的荧光被物镜 f_2 收集,以平行光出射,然后由耦合镜 f_1 会聚于光纤束的端面。使用耦合镜的目的是保证样品的细节信息能够完全到达光纤束端面,此时物镜的分辨力并不会损失。光纤束依靠其中的光纤传输光信息,而光纤是有一定尺寸的,在到达这个尺寸范围内的所有光信息通过同一根光纤传输,在传输过程中这些光信息互相干扰而损失了原有的细节信息,因此光纤束中的光纤成了传输信息的最小单位^[11]。

内窥镜的光学结构导致样品细节信息混叠,从而影响内窥式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力。

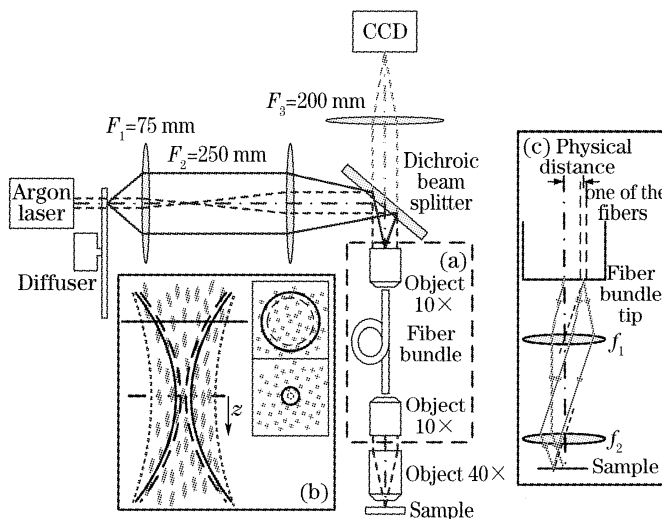


图 1 内窥式散斑类共聚焦系统原理图。虚线框(a)为内窥镜的光学结构;插图(b)为焦面部分散斑场分布示意图;插图(c)为内窥镜成像原理图

Fig. 1 Endoscope-based speckle quasi-confocal system diagram. The inset (a) depicts the optical structure of endoscope part; the inset (b) depicts the speckle field around the focal plane, and the inset (c) depicts the imaging principle of the endoscope part

2.3 轴向分辨力

内窥式散斑类共聚焦系统的内窥镜结构会影响散斑类共聚焦显微镜原有的轴向层析效果。用图 1 插图(b)表示内窥镜光学结构对成像带来的变化。图中点线表示视场范围;实线对为光纤能够接收的散斑场范围;虚线对为散斑类共聚焦显微镜单点探测器在焦平面附近的点扩展函数,光通过内窥镜结构后单点探测器上点扩展函数在焦平面附近的分布是所有发生混叠的点扩展函数的平均值。

焦平面处的波动信息,由照明点扩展函数与探测器上的自相关函数积分得到。不使用光纤束时照明点扩展函数和探测器上的自相关函数分别为^[3]

$$\text{PSF}(\boldsymbol{\rho}, z) = \frac{1}{1 + \zeta^2} \exp\left[-\frac{2\rho^2}{\omega_0^2(1 + \zeta^2)}\right], \quad (2)$$

$$R_{\text{det}}(\Delta\boldsymbol{\rho}, z_c) = \frac{\pi\omega_0^2}{4(1 + \zeta_c^2)} \exp\left[-\frac{\Delta\rho^2}{\omega_0^2(1 + \zeta_c^2)}\right], \quad (3)$$

其中(2)式中 z 为轴向坐标, $\boldsymbol{\rho}$ 为散斑场半径, $\zeta = \lambda z / (\pi\omega_0^2)$ 表示 z 与光束瑞利长度 $\pi\omega_0^2/\lambda$ 的比值。(3)式为探测点扩展函数的自相关,其中 $\Delta\boldsymbol{\rho} = |\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}'|$, z_c 为样品在轴向的坐标值, $\zeta_c = \lambda z_c / (\pi\omega_0^2)$ 。

假设每根光纤通光面积可容纳 N 个散斑斑点,使用光纤束时探测器探测到的信号是 N 个原始探测信号的平均值。探测器上的自相关函数变为^[12]

$$R_{\text{det}N}(\Delta\boldsymbol{\rho}, z_c) = \frac{\pi\omega_0^2}{4N(1 + \zeta_c^2)} \exp\left[-\frac{N\Delta\rho^2}{\omega_0^2(1 + \zeta_c^2)}\right], \quad (4)$$

散斑信号方差为

$$V_N(\rho_d) = \langle I_s \rangle^2 C^2 \int R_{\text{det}N}(\Delta\boldsymbol{\rho}, z_c) \text{PSF}_{\text{ill}}(\Delta\boldsymbol{\rho}, 0) d^2 \Delta\boldsymbol{\rho} = \frac{\langle I_s \rangle^2 C^2 A^2}{N(N + 2 + 2\zeta_c^2)}, \quad (5)$$

内窥式散斑类共聚焦系统的分辨力曲线为

$$\text{RMS}_N = \frac{\langle I_s \rangle CA}{\sqrt{N(N + 2 + 2\zeta_c^2)}}, \quad (6)$$

设轴向分辨力为 K , 由

$$\zeta_c = \frac{\lambda z_c}{\pi\omega_0^2}, \quad \omega_0 = 0.61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (7)$$

内窥式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力为

$$K_N = \frac{2.86\lambda}{(NA)^2} \sqrt{N + 2}, \quad (8)$$

内窥镜结构的放大倍数为 $M = 4$, 单根光纤直径 $d_{\text{fiber}} = 5 \mu\text{m}$; 入射激光波长 $\lambda = 488 \text{ nm}$, 物镜数值孔径 $NA = 0.9$, 得到 $N = \left(\frac{d_{\text{fiber}}}{M \times D_{\text{speckle}}}\right)^2 = 14$, 由

(6)式~(8)式作图,得到 N 分别为 1 和 14 时系统的分辨力曲线如图 2(a)所示。内窥式散斑类共聚焦系统虽然相对于散斑类共聚焦显微镜轴向分辨力有所下降,但仍保持了一定的轴向分辨力即层析能力。图 2(b)给出了轴向分辨力随 N 的变化关系,可以看出其轴向分辨力随着 N 增大而逐渐变差。因此实际系统设计中应先用合适的系统参量,避免增大 N 值。

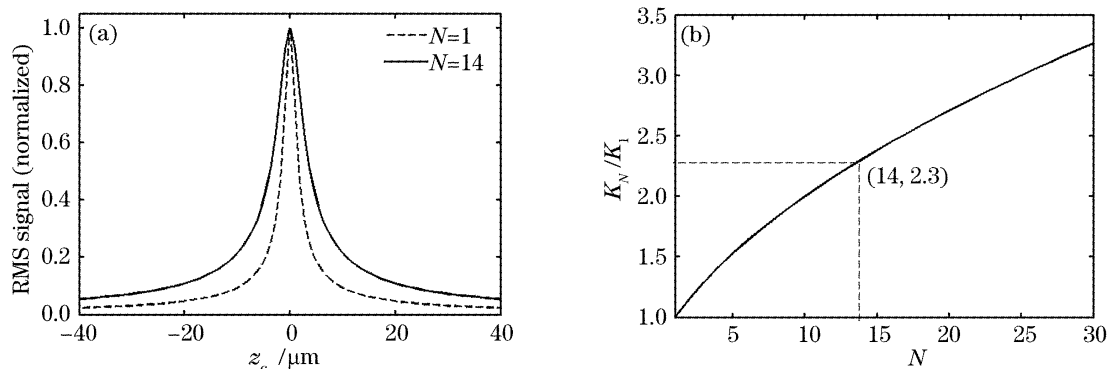


图 2 N 取不同值时轴向分辨力曲线(a), 轴向分辨力 K_N 相对于 K_1 的倍数(b)

Fig. 2 Axial resolution curves (a) and the ratio of axial resolution K_N to K_1 (b) for different N

3 实验与讨论

根据原理图 1 建立了相应的实验系统,使用 Ar 离子激光器发出 488 nm 的激光照射到散射屏上,透镜 F_1 和 F_2 共焦放置,散斑场通过光纤束照明样品;样品发出的荧光被物镜接收,然后通过内窥镜传

输, F_3 透镜将荧光信号会聚在 CCD 靶面成像。透镜 F_1 和 F_2 须选择合适的放大率使光束充满物镜的后焦面;使用 olympus 40×物镜,数值孔径 0.9;光纤束(型号: SCHOTT LB0138)长 1.35 m,直径 1.65 mm,由 18000 根独立的光纤组合而成,每根光纤直径 5 μm ,相邻光纤间距 11.6 μm ,数值孔径

0.5; 样品使用若丹明(rhodamine)6G 荧光薄片。

实验中先测量散斑类共聚焦显微镜轴向分辨力; 然后加入内窥镜结构, 测量内窥式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力。轴向分辨力实验曲线如图 3 所示。

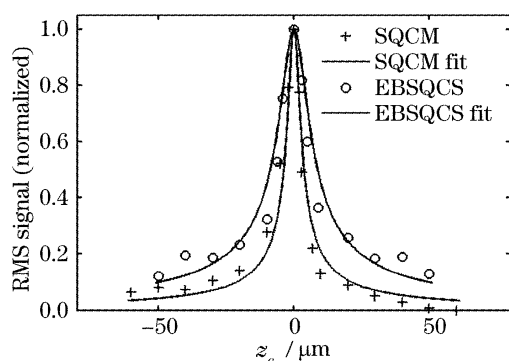


图 3 内窥式散斑类共聚焦系统和散斑类共聚焦显微镜轴向分辨力曲线比较

Fig. 3 Axial resolution curves of endoscope-based speckle quasi-confocal system and speckle quasi-confocal microscope

将内窥式散斑类共聚焦系统和散斑类共聚焦显微镜的轴向分辨力实验曲线图 3 与理论曲线图 2 进行对比, 可以看出通过实验测得的内窥式散斑类共聚焦系统轴向分辨力与理论曲线是相符的。图 3 中内窥式散斑类共聚焦系统和散斑类共聚焦显微镜曲线的半峰全宽值相对于图 2 中的理论曲线均有一定展宽, 这是由于实验中采用的样品有一定厚度导致的。但是这并不影响对比评价内窥式散斑类共聚焦系统相对于散斑类共聚焦显微镜轴向层析能力的变化。

内窥式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力曲线比散斑类共聚焦显微镜的轴向分辨力曲线宽, 内窥式散斑类共聚焦系统的轴向分辨力曲线的半峰全宽是散斑类共聚焦显微镜的 2.3 倍, 与理论计算值相符 [图 2(b)]。实验结果表明, 内窥式散斑类共聚焦系统也具有很好的轴向分辨力特性, 在不扫描的条件下能得到与共聚焦显微镜类似的层析能力。虽然内窥镜结构会使传输的信息发生混叠, 导致焦面与非焦面处的波动剧烈程度对比不明显, 在一定程度上减弱了内窥式散斑类共聚焦系统的层析能力。但这种影响可以通过控制实验条件得到改善。减小内窥镜中光纤的直径, 或提高内窥镜结构的放大率, 均可以减小混叠程度, 提高轴向分辨力, 使其最终趋向于散斑类共聚焦显微镜的层析能力。

4 结 论

散斑类共聚焦显微镜具有类似共聚焦显微镜的层析能力而不用进行扫描, 适合对厚生物组织成像, 将其引入内窥镜探测中也能较好地保持层析能力。本文较深入分析了内窥镜光学结构对内窥式散斑类共聚焦系统的影响, 从理论和实验两个方面分析和验证了内窥式散斑类共聚焦系统具有较好的共聚焦特性。并提出了进一步提高系统性能的方法。

参 考 文 献

- 1 T. Wilson, R. Juskaitis, M. A. A. Neil *et al.*. Confocal microscopy by aperture correlation [J]. *Opt. Lett.*, 1996, **21**(23): 1879~1881
- 2 M. A. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope[J]. *Opt. Lett.*, 1997, **22**(24): 1905~1907
- 3 Cahive Ventalon, Jerome Mertz. Quasi-confocal fluorescence sectioning with dynamic speckle illumination[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(24): 3350~3352
- 4 Cathie Ventalon, Jerome Mertz. Dynamic speckle illumination microscopy with translated versus randomized speckle patterns [J]. *Opt. Exp.*, 2006, **14**(16): 7198~7209
- 5 Ge Huayong, Ren Qiushi, Wang Baohua *et al.*. Confocal endoscopic optical imaging system[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2004, **41**(8): 32~34 (in Chinese)
葛华勇, 任秋实, 王保华 等. 共聚焦内窥镜光学成像系统[J]. *激光与光电子学进展*, 2004, **41**(8): 32~34
- 6 Jia Xiaohang, Yan Qinglai, Wen Yan. Evaluation base and method of medical rigid endoscope distortion[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(8): 1226~1230
贾晓航, 颜青来, 文 燕. 医用硬性内窥镜畸变的评定基础和方法[J]. *光学学报*, 2006, **26**(8): 1226~1230
- 7 Fang Fang, Lin Meirong, Li Yingjie *et al.*. Design and study of micro-fiber imaging system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2000, **20**(5): 654~658
房 芳, 林美荣, 李英杰 等. 微型光纤图像传输系统的设计与研究[J]. *光学学报*, 2000, **20**(5): 654~658
- 8 Arthur F. Gmitro, David Aziz. Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle[J]. *Opt. Lett.*, 1993, **18**(8): 565~567
- 9 Andrew R. Rouse, Angeline Kano, Arthur F. Gmitro. Development of a fiber-optic confocal microendoscope for clinical endoscopy[C]. *SPIE*, 2002, **4613**: 244~253
- 10 Cathie Ventalon, Jerome Mertz. Quasi-confocal fluorescence sectioning with dynamic speckle illumination[C]. *SPIE*, 2006, **6091**: 60900M-1~60900M-6
- 11 Werner Göber, Jason N. D. Kerr, Axel Nimmerjahn *et al.*. Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiber bundle and a gradient-index lens objective[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(21): 2521~2523
- 12 Liu Cihua, Wan Jianping. *Probability and Mathematical Statistics* [M]. Beijing: China Higher Education Press, 1999. 113~119 (in Chinese)
刘次华, 万建平. *概率论与数理统计* [M]. 北京: 中国高等教育出版社, 1999. 113~119