

# 具有自适应成像功能的荧光显微内窥镜

冯志锋<sup>1</sup> 王立强<sup>1</sup> 陆祖康<sup>1</sup> 段会龙<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027)  
(<sup>2</sup> 浙江大学 生物医学工程研究所, 浙江 杭州 310027)

**摘要** 研制了一种用于体内成像诊断和光动力学治疗的荧光显微内窥镜, 可根据探测的荧光信号强度, 采用反馈算法快速调节不同成像区域的激发光强度, 获取高信噪比、大动态范围的荧光图像, 实现交互式荧光诊断与光动力学治疗分析。根据反馈的治疗效果, 自适应地连续实时调整光剂量, 获得最佳的光动力学治疗结果。激发光强度的动态调整由计算机控制数字微镜器件的开关状态及驻留时间来实现。荧光显微内窥镜的外径尺寸为 8 mm, 工作长度为 250.3 mm, 可装配在腹腔镜管鞘中, 适用于体内病灶的显微成像诊断。实验结果表明, 显微成像视场为  $\phi 600 \mu\text{m}$ , 光学分辨率优于  $2.2 \mu\text{m}$ , 图像动态范围可增强 200 倍以上, 有效改善了荧光微弱区域和荧光饱和区域的图像细节和信噪比, 提高了诊断准确性。此技术可进一步扩展为共焦三维成像, 实现在体组织细胞学分析。

**关键词** 荧光显微内窥镜; 数字微镜器件; 自适应成像; 高动态范围

中图分类号 TH741 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201131.1218001

## Fluorescence Endomicroscopy with Adaptive Imaging Function

Feng Zhifeng<sup>1</sup> Wang Liqiang<sup>1</sup> Lu Zukang<sup>1</sup> Duan Huilong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)  
(<sup>2</sup> Biomedical Engineering Institute, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

**Abstract** A kind of fluorescence endomicroscopy which can be used for in-vivo imaging in diagnosis and photodynamic therapy is described. According to the fluorescence signal intensity detected, the fluorescence endomicroscope can adjust the excitation power in different regions rapidly using feedback algorithm, to obtain high signal noise ratio (SNR) and high dynamic range images, and achieve interactive fluorescence diagnosis and photodynamic analysis. It can also adjust the light dose continuously according to the feedback treatment effect, getting the best results of photodynamic therapy. Dynamic adjustment of excitation intensity is realized by the ON-OFF state and the residence time of computer-controlled digital micromirror device. The outer diameter of the fluorescence endomicroscope is 8 mm, working length is 250.3 mm. It can be assembled in the sheath tube of standard laparoscope, and adapted to in vivo microscopic imaging diagnosis of the lesion easily. The experimental results show that the field of view is  $\phi 600 \mu\text{m}$ , optical resolution is better than  $2.2 \mu\text{m}$ , and the image dynamic range can be enhanced more than 200 times. The fluorescence endomicroscope can improve the details and SNR of fluorescence saturation regions and fluorescence weak regions, and improve diagnostic accuracy at the same time. This technology can be extended to confocal 3D imaging further, and achieve in vivo histological analysis.

**Key words** fluorescence endomicroscopy; digital micro-mirror device; adaptive imaging; high dynamic range

**OCIS codes** 110.1085; 300.6280

## 1 引言

荧光显微术是早期肿瘤诊断的重要方法之一,

但需要取样至体外进行组织病理学分析, 是一个有损伤、费时、昂贵的过程, 伴随着出血、感染和漏诊等

收稿日期: 2011-05-31; 收到修改稿日期: 2011-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(60808030)和国家科技支撑计划(2011BAI12B06)资助课题。

作者简介: 冯志锋(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: fzf1002@163.com

导师简介: 王立强(1977—), 男, 博士, 副教授, 主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: wangliqiang@zju.edu.cn

(通信联系人)

风险,且无法与光动力学治疗结合在一起。因此,无创、在体的荧光显微内窥镜得到了越来越广泛的研究和应用<sup>[1~5]</sup>。

在体内病灶的显微成像诊断中,高动态范围成像有利于观察图像饱和区域和图像微弱区域的细节结构,提高这些区域的分辨率和信噪比,从而提高诊断的准确性。由于空间光调制器具有像素级精度的精确控制,已成功应用于机器视觉<sup>[6]</sup>、军事探测<sup>[7]</sup>、荧光分析<sup>[8]</sup>和生物显微<sup>[9]</sup>等多个成像领域的动态范围扩展。本文将在荧光显微内窥镜上实现动态范围扩展成像,并进一步可实现光动力学治疗中光剂量的动态调整,共焦扫描等多个自适应成像功能。

体内肿瘤诊断时,由于病变组织的不同位置荧光剂浓度差异较大,荧光成像时可能某些位置的荧光信号强度已经饱和,而某些位置的荧光信号强度则太弱导致看不清楚细节,若增大激发光强度或者增加探测器的积分时间,虽然能够增强弱信号区域的图像细节,但进一步扩大了信号饱和区域,反之,若看清饱和区域细节,则弱信号区域进一步扩大。为克服上述问题,将根据 CCD 探测的荧光信号强度,采用反馈算法快速调整数字微镜器件每个像素所对应不同成像位置的激光强度,有效改善了荧光微弱区域和荧光饱和区域的图像细节和信噪比。通过主动改变照明和成像的方式,获得自适应的高动态范围的成像,并且能够同时实现共焦扫描。此方法亦可实现交互式荧光诊断与光动力学治疗分析,根据反馈的荧光图像,自适应地连续调节光剂量,为研究光动力学治疗机制提供新的技术方法。

## 2 光学系统

### 2.1 整体结构

荧光显微内窥镜的光学结构如图 1 所示<sup>[10]</sup>,激光器 LD-1 的波长靠近荧光标记物的吸收峰值,用作荧光成像的激发光源。激光器 LD-2 的波长靠近荧光标记物的热力学特征波长,用作光动力学治疗的手术光源。

在荧光成像的时候,打开激光器 LD-1,关闭激光器 LD-2,激光器 LD-1 发射出来的光束经过准直扩束光学系统,形成光斑形状和发散角符合一定要求的光束,通过荧光滤色片后,以  $24^\circ$  的角度入射到数字微镜器件(DMD)。DMD 由尺寸为  $13\ \mu\text{m}$  的  $1024 \times 768$  个微反射镜阵列构成,仅处于 ON 状态的微镜将激光反射到耦合系统  $L_1$  的孔径内,处于 OFF 状态的微镜将激光反射至消光部件。进入耦

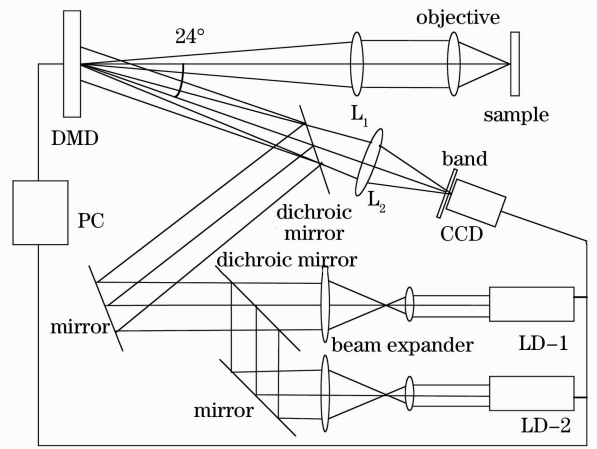


图 1 具有自适应成像功能的荧光显微内窥镜的光学系统  
Fig. 1 Optical system of fluorescence endoscope with adaptive imaging function

合系统  $L_1$  的激光通过物镜最终入射到样本上面,激发样本上面的荧光试剂,获得的荧光信号由物镜收集,通过耦合系统  $L_1$  后到达 DMD,被 ON 状态的微镜反射,到达荧光滤色片,透射后到达耦合系统  $L_2$ ,最终成像在 CCD 探测器上。

在治疗的时候,关闭激光器 LD-1,打开激光器 LD-2,激光器 LD-2 发出的激光通过准直扩束光学系统和二色镜反射后被耦合进入系统,最终到达样本。实现体内病变器官的光动力治疗,不同病变程度的激光强度与驻留时间由 DMD 模式决定。同时激光器 LD-1 可随时打开,可以观察治疗效果,获得荧光图像及治疗结果图像。用计算机控制激光器 LD-1 和激光器 LD-2 的开关非常方便,可实现交互式的治疗、反馈、再治疗循环,并及时调整光剂量,获得最佳疗效。

### 2.2 物镜系统

在实际应用中,大视场、高分辨率、长距离图像中继传输是显微内窥镜的基本要求,同时进入体内的探头尺寸要求尽可能小,可方便装配在腹腔镜管鞘中。

目前内窥镜的传像系统为多级 Hopkins 棒状镜,其数值孔径很小(小于 0.1),无法实现体内显微成像,因此,设计一种全新的望远式棒状传像透镜进行传像,将共焦扫描器放置在体外,实现了小尺寸的内窥镜探头,并且克服传像光纤束分辨率低、栅格影响严重的缺点,能够获得高清晰度的显微图像。

荧光显微内窥镜的物镜系统分为三个透镜组,如图 2 所示。第一透镜组是由  $L_1, L_2$  胶合组成的  $f$ -theta 透镜,实现体外线性激光共焦扫描,保证全视场的均匀成像,当逐点控制 DMD 上单个微镜单

元 ON-OFF 状态时,在某一时刻,仅有一个微镜单元处于 ON 状态,此微镜单元在该时刻既实现激光照明共焦小孔的功能,又实现荧光成像共焦小孔的功能,顺序改变 DMD 上每个微镜的状态,即可实现共焦扫描;第二透镜组(L3,L4)用于望远式传像,仅用 2 个胶合透镜组就实现了 200 mm 以上的图像中继,不仅加工生产方便,且光线经过的折反射次数少,清晰度高;第三透镜组(L5~L9)实现倍率为

10×的显微成像,数值孔径大,图像分辨率接近衍射极限,相邻像素无信号串扰,解决了使用光纤束时分辨力低,相邻芯径光线串扰的问题。在光学设计中,这三组光学系统的像差综合考虑,在整个内窥镜范围内进行像差校正,而基于光纤的传像系统(无论是传像光纤束还是单根光纤)均无法克服物镜的残留像差。因此,此物镜系统可获得更佳的成像质量。

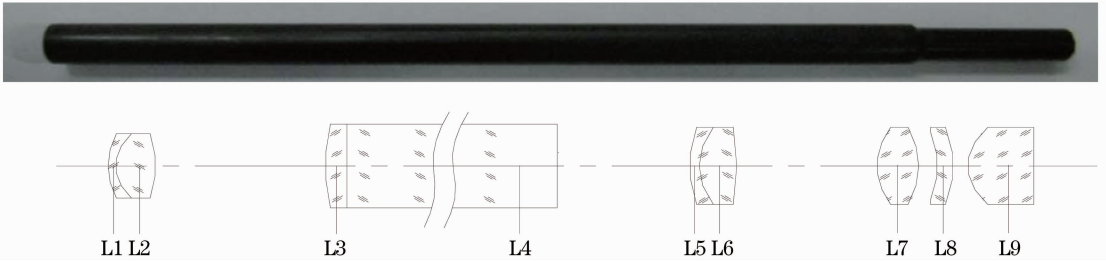


图 2 荧光显微内窥镜的扫描物镜系统的结构

Fig. 2 Structure of scanning objective lens system for fluorescence endoscope

设计出的物镜成像视场为  $\phi 600 \mu\text{m}$ ,数值孔径为 0.35,外径尺寸为 8 mm,工作距离优于 200 mm,且在可见光波长范围内,全视场的分辨率优于  $2.2 \mu\text{m}$ ,并且可装配在腹腔镜管鞘中,适用于体内病灶的显微成像诊断。

镜在激光波长时的点扩散函数,  $S'$  为到达样本上的激光强度,  $*$  为卷积积,有<sup>[10]</sup>:

$$S' = |S_D * h_1|^2, \quad (1)$$

$h_2$  为物镜在荧光波长时的点扩展函数,  $O$  为组织上面荧光试剂的浓度,  $I$  为回到 DMD 上面的荧光信号强度,有:

$$I = (S'O) * |h_2|^2, \quad (2)$$

$I_c$  为 CCD 上面的荧光信号强度,  $\langle \rangle$  表示求平均,有:

$$I_c = \langle IS_D \rangle, \quad (3)$$

联立以上三式,有:

$$I_c = \langle (|S_D * h_1|^2 O) * |h_2|^2 S_D \rangle, \quad (4)$$

从(4)式可以知道 CCD 接收到的荧光信号强度  $I_c$  和 DMD 的模式  $S_D$  有直接的对应关系,而 DMD 的模式代表 DMD 上面每个微镜的反射率,这样就可以通过调节 DMD 上显示图像的灰度来控制微镜的反射率,从而调节到达样本的激光强度和调节 CCD 接收到的荧光强度。

由图 1 可以得知 CCD 获取荧光图像为离轴成像方式,即 DMD 主轴与 CCD 主轴为  $12^\circ$  的夹角。因此首先通过二维纹理映射的方法找到 CCD 图像和 DMD 上面对应的区域,图 4(a)是 CCD 的图像,图 4(b)是经过对应匹配后 DMD 上显示的图像。

CCD 图像和 DMD 显示的图像位置有如下对应关系:

$$\begin{aligned} u &= (h_{11}x + h_{12}y + h_{13}) / (h_{31}x + h_{32}y + 1) \\ v &= (h_{21}x + h_{22}y + h_{23}) / (h_{31}x + h_{32}y + 1), \end{aligned} \quad (5)$$

### 3 实验验证

图 3 是用荧光显微内窥镜的对美国空军 (USAF) 标准鉴别率板成像的图像,从图中可以清楚的看出第 7 组第 6 条的线对,对应  $228 \text{ lp/mm}$  的分辨率,相对应的线宽为  $2.2 \mu\text{m}$ 。表明荧光显微内窥镜的光学分辨率优于  $2.2 \mu\text{m}$ 。

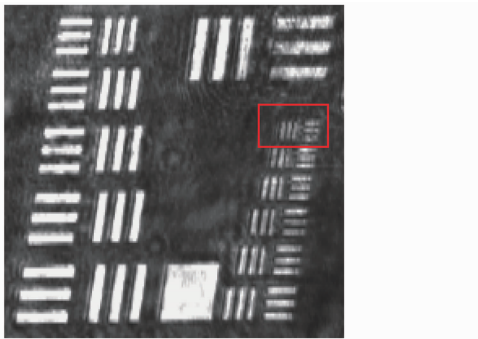


图 3 对美国空军标准鉴别率板成像的图像

Fig. 3 Image of a United States Air Force (USAF) resolution target

### 4 自适应成像

在显微成像系统中  $S_D$  为 DMD 的模式,  $h_1$  为物

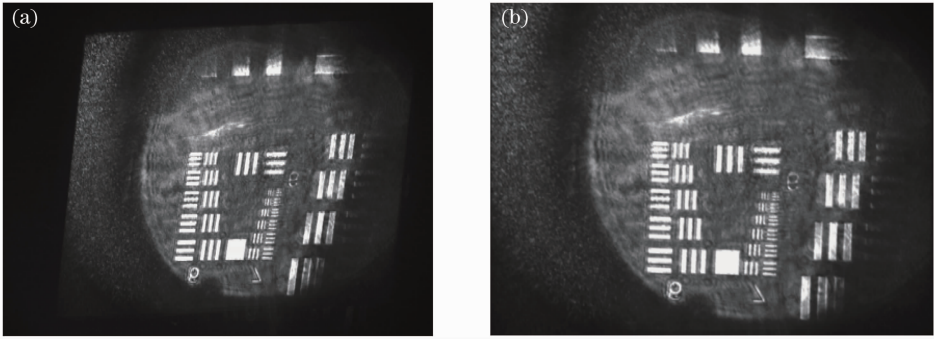


图 4 二维纹理映射。(a) CCD 的图像;(b)经过对应匹配后 DMD 上显示的图像

Fig. 4 Two-dimensional texture mapping. (a) image of CCD; (b) image displayed on DMD after corresponding match

式中 $(u, v)$ 为 DMD 中的像素坐标,  $(x, y)$ 为 CCD 图像中四边形的像素坐标, 由 DMD 矩形和 CCD 图像中四边形的 4 个顶点一一对应的关系, 建立 8 个方程, 用高斯消元法求解  $h_{11}$ 、 $h_{12}$ 、 $h_{13}$ 、 $h_{21}$ 、 $h_{22}$ 、 $h_{23}$ 、 $h_{31}$ 、 $h_{32}$  这 8 个未知数, 就可以根据  $(u, v)$  反算其在 CCD 图像中四边形的映射点  $(x, y)$ 。一般说来  $(x, y)$  都落不到整点上, 可用 4 个邻近点做双线性插值来求得。然后通过调节 DMD 对应像素位置处微镜的灰度来控制 DMD 微镜的反射率, 实现自适应的调节。

自适应调节的过程如图 5 中所示,  $I_t$  代表 CCD 上面某一像元探测的荧光信息,  $R_{t+1}$  代表计算得到的要下次送入 DMD 对应像素位置处微镜的反射率, 是在  $R_t$  的基础上通过反馈控制算法调节后的信号, 如果  $I_{t+1}$  不符合要求, 则继续改变送入 DMD 微镜的反射率  $R_{t+2}$ , 直到达到一个动态平衡为止。

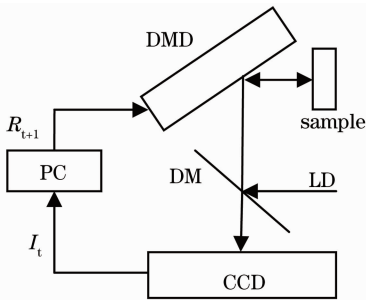


图 5 负反馈成像的实现方式

Fig. 5 Realization of feedback imaging

在非自适应成像的荧光显微内窥镜中, CCD 的灰度级为 256 级 8 bit 的, 动态范围为

$$D = \frac{I_{\max}}{I_{\min}}, \quad (6)$$

式中  $I_{\max}$  和  $I_{\min}$  为 CCD 线性检测到入射光的最大和最小光强, 假设  $I_{\min}$  对应的灰度级为 1, 则  $I_{\max}$  对应的灰度级为 255, 系统的动态范围为 255。

在自适应成像的荧光显微内窥镜中, DMD 微

镜的灰度级也为 255, 也就是 DMD 微镜的反射率有 255 级, 相当于 CCD 的每个灰度级都可以通过 DMD 继续细化 255 倍, 这样扩展动态范围为

$$D_{\text{adr}} = \frac{I_{\max}}{I_{\min}} \cdot \frac{R_{\max}}{R_{\min}}, \quad (7)$$

式中  $I_{\min}$  对应的灰度级仍然为 1, 但是最大的能探测的灰度级变成了  $I_{\max}(R_{\max}/R_{\min})$ ,  $R_{\max}$  为 DMD 的最大反射率,  $R_{\min}$  为 DMD 的最小反射率。这样自适应成像的荧光显微内窥镜的动态范围为  $255 \times 255$ , 是非自适应成像的荧光显微内窥镜动态范围的 255 倍。

生物组织上面不同位置的荧光试剂浓度不同, CCD 探测到的荧光强度和荧光浓度是成正比的:

$$I = kR^2O, \quad (8)$$

式中  $I$  为 CCD 探测到荧光强度,  $k$  为物镜点扩散函数等正相关的系数。  $R$  为 DMD 微镜的反射率。

图 6 中 $O^{(1)}$ 和 $O^{(2)}$ 分别为生物组织两个不同荧光试剂位置处的浓度, 在非自适应成像的荧光显微内窥镜中对应的荧光强度的灰度值为 $I_t^{(1)}$ 和 $I_t^{(2)}$ , 对应的点分别为 A 点和 B 点, 可以看出 A 点的灰度值 $I_t^{(1)}$ 太小, 而 B 点的灰度值 $I_t^{(2)}$ 则过曝了, 调整 DMD 的反射率后, 在自适应成像的荧光显微内窥镜

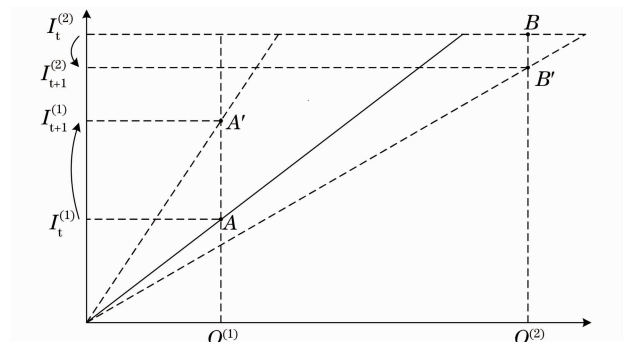


图 6 高动态范围成像

Fig. 6 Imaging in high dynamic range

中对应的点分别为  $A'$  点  $B'$  点, 荧光的灰度值为  $I_{\text{出}}^{(1)}$  和  $I_{\text{出}}^{(2)}$ , 可以看出  $I_{\text{出}}^{(1)}$  提高了很多, 而  $I_{\text{出}}^{(2)}$  不再饱和, 同时提升了弱光区域和强光区域的图像细节与信噪比, 图 6 中三条直线和 DMD 显微镜的反射率  $R$  正相关, 斜率越大代表 DMD 显微镜的反射率  $R$  越大, 斜率越小代表 DMD 显微镜的反射率  $R$  越小, 这样就可以通过 DMD 显微镜反射率的调节来扩大 CCD 的动态范围。在实验中, CCD 和 DMD 的帧频最高为 60 Hz, 从获得 CCD 原始图像, 到更改 DMD 上不同区域的反射率, 得到新的 CCD 反馈图像, 再经过重建算法处理, 获取高动态范围图像, 整个过程耗时 0.187 s, 可实现 5 Hz 以上的动态荧光成像。

对肌腱组织成像的实验中, 首先给 DMD 输入的信号如图 7(a) 所示, 图片中的每个点的灰度代表 DMD 上面每个显微镜的反射率, 所有显微镜的反射率都是一样的, 得到的图像如图 7(b) 所示, 可以看出图像中有一部分过曝, 而图像左侧有一小块灰度太小, 通过反馈控制算法调节后输入 DMD 的信号如图 7(c) 所示, 调高了部分区域的反射率, 同时调低了部分区域的反射率。重新得到的图像如图 7(d) 所示, 在图 7(d) 中可以清晰看出图 7(b) 中过曝的部分, 同时能看出图 7(b) 中看不到的部分, 在保证弱荧光成像的同时, 有效改善了荧光饱和区域的图像细节。

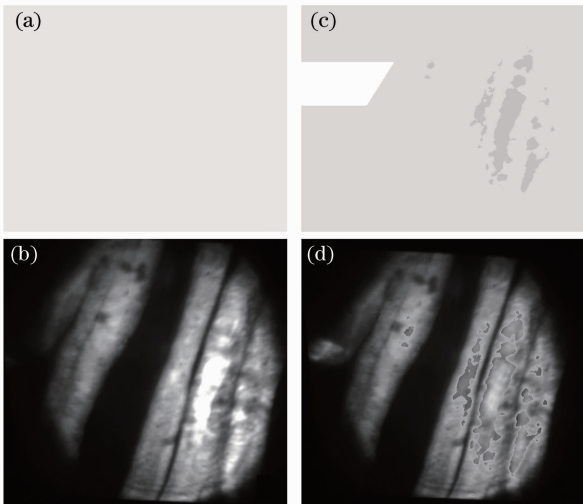


图 7 负反馈和高动态范围成像。(a)首次输入 DMD 的信号;(b)首次得到的 CCD 图像;(c)调整后输入 DMD 的信号;(d)调整后得到的 CCD 图像

Fig. 7 Negative-feedback and high-dynamic-range imaging. (a) Original signal of DMD; (b) original image of CCD; (c) adjusted signal of DMD; (d) adjusted image of CCD

在图 7(d) 中可以清晰看出图 7(b) 中荧光过曝的部分以及荧光过弱的部分, 但是过曝部分和过弱部分的灰度本来不是这样, 为了还原出整个肌腱组织荧光物质的强度, 需要把 DMD 显微镜的反射率的变化考虑进去, 通过伪彩色编码的方式重建出原来肌腱组织荧光物质的强度图。

图 8 中通过伪彩色编码的图片扩展灰度达到 4000, 为采用非自适应成像方式动态范围的 16 倍, 重建出了消除荧光过弱和过曝影响的 24bit 真彩色图像, 能够比较明显的看出荧光信息分布。

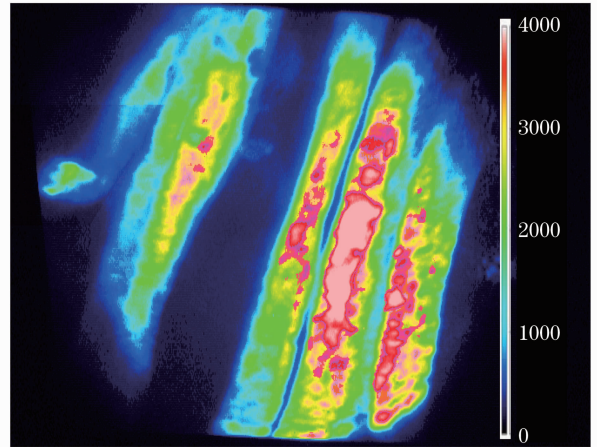


图 8 荧光信息分布的伪彩色重建

Fig. 8 Pseudo-color reconstruction of fluorescence distribution-information

## 5 结 论

介绍了一种具有自适应成像功能的荧光显微内窥镜, 光学系统的数值孔径为 0.35, 外径尺寸为 8 mm, 能够实现高分辨率和高灵敏度的荧光成像。实验结果表明, 显微成像视场为  $\phi 600 \mu\text{m}$ , 光学分辨率优于  $2.2 \mu\text{m}$ , 图像动态范围可增强 200 倍以上, 并且能够实现自适应成像。该法可实现共焦扫描, 同时可以进一步研究实现交互式荧光诊断与光动力学治疗分析, 实现交互式的治疗、反馈、再治疗循环, 并及时调整光剂量, 获得最佳治疗效果。

## 参 考 文 献

- 1 P. J. B. Robert, H. K. Tony, C. J. Juergen *et al.*. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy[J]. *Nature Medicine*, 2011, **17**(2): 223~228
- 2 K. Pilhan, C. Euiheon, Y. Hiroshi *et al.*. In vivo fluorescence cellular imaging by side-view endomicroscopy [J]. *Nature Medicine*, 2010, **7**(4): 303~305
- 3 A. T. Anthony, R. R. Andrew, A. U. Joshua *et al.*. Clinical confocal microlaparoscope for real-time in vivo optical biopsies [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2009, **14**(4): 044030

- 4 Lin Xiaogang, Pan Yingjun, Guo Yongcai. Study on autofluorescence spectral feature for cancer cell in different stages of cell cycle[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(5): 1328~1331  
林晓钢, 潘英俊, 郭永彩. 癌细胞细胞周期自体荧光光谱特征[J]. *光学学报*, 2009, **29**(5): 1328~1331
- 5 Wei Yanchun, Wu Baoyan, Yang Liyong *et al.*. Upconversion fluorescence monitoring near infrared during tumor photothermal therapy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(11): 2719~2724  
魏言春, 吴宝艳, 杨利勇 等. 上转换荧光实时监测近红外实现肿瘤热疗[J]. *中国激光*, 2010, **37**(11): 2719~2724
- 6 J. Xu, Z. B. Chen, X. X. Ni *et al.*. The stability research of one kind of high dynamic range imaging system[J]. *Opt. Eng.*, 2008, **47**(3): 033202
- 7 Zhou Wang. Study on enhancing dynamic range of CCD image based on digital micro-mirror device[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(3): 638~642  
周 望. 基于数字微镜器件技术提高面阵 CCD 相机动态范围的研究[J]. *光学学报*, 2009, **29**(3): 638~642
- 8 N. Takeharu, Y. Shuichi, T. Takashi. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  by circularly permuted yellow [C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**(29): 10554~10559
- 9 A. A. Adekunle, B. Neil, E. D. Thomas. Applications of digital micro-mirror devices to digital optical microscope dynamic range enhancement[J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(3): 1831~1843
- 10 S. H. Jiang, J. G. Walker. Speckle-illuminated fluorescence confocal microscopy, using a digital micro-mirror device [J]. *Measurement Science and Technology*, 2009, **20**(6): 065501
- 11 S. K. Nayar, V. Branzoi. Adaptive dynamic range imaging: Optical control of pixel exposures over space and time [C]. Ninth IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV'03), 2003, **2**: 1168

栏目编辑: 韩 峰