

微腔光声探测技术及其成像方法

蔡秋霞¹ 唐志列^{1,2} 吴泳波¹ 谭治良¹ 张 曼¹

(¹ 华南师范大学物理与电信工程学院, 广东 广州 510631
² 华南师范大学广东省高等学校量子信息技术重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 提出了具有高探测灵敏度的微腔光声探测技术。采用微腔耦合技术,将细胞内产生的光声信号,通过微通道传导到耦合腔,被麦克风接收,成功研制出微腔光声探测器。在相同的温度变化情况下,密闭腔内气压变化量与腔的体积成反比,腔的体积越小,气压变化量越大,探测器对压力的响应度就越高,对于微弱光声信号就越灵敏。因此,设计出的高灵敏度微腔光声探测器,能够探测到连续调制光激发出的微弱光声信号,重建出免标记的细胞水平的光声显微图像。从已获得的分辨率板、洋葱表皮细胞和血红细胞等样品的光声显微图像可以说明这个光声微腔探测器的灵敏度高,分辨率达到 $1.25\ \mu\text{m}$ 。

关键词 显微;光声显微镜;微腔探测器;灵敏度

中图分类号 Q631 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201333.0918001

Microcavity Photoacoustic Detecting Technology and Imaging Method

Cai Qiuxia¹ Tang Zhilie^{1,2} Wu Yongbo¹ Tan Zhiliang¹ Zhang Man¹

(¹ School of Physics and Telecommunication Engineering, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China
² Laboratory of Quantum Information Technology, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract Employing microcavity coupling technology, a microcavity photoacoustic transducer with high sensitivity is proposed. The transducer works like this: the photoacoustic (PA) waves, which carry the information of the sample, transmit across the microchannel to the coupling cavity and are detected by the microphone. In the same case of the temperature change, the pressure variation in an airtight cavity is inversely proportional to the volume of the cavity. So the sensitivity of transducer can be effectively increased by using the microcavity structure, which is more sensitive to the feeble PA signal induced by a modulated continuous wave laser source. By using the technology, the photoacoustic microscopy (PAM) images of onion epidermal cells and RBCs are clearly reconstructed in cellular resolution. The result of resolution test target verifies the resolution of the PAM with microcavity PA transducer is better than $1.25\ \mu\text{m}$.

Key words microscopy; photoacoustic microscope; microcavity transducer; sensitivity

OCIS codes 110.5120; 170.5120; 040.1880

1 引 言

光声(PA)显微镜是近年发展起来的一种新型的具有广泛应用前景的光声成像技术。它利用样品

内源性的光学吸收特性进行成像,可获得组织样品的结构图像和功能图像。结合了声学成像和光学成像的优点,具有灵敏度高、分辨率高、对比度高和较

收稿日期: 2013-02-23; **收到修改稿日期**: 2013-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(61877068)、国家高校博士工程研究基金(20104407110008)、广州市科技计划项目(2012J4300138)

作者简介: 蔡秋霞(1987—),女,硕士研究生,主要从事光声成像方面的研究。E-mail: 514475351@qq.com

导师简介: 唐志列(1963—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事光声成像和激光共聚焦显微镜等方面的研究。

E-mail: tangzhl@senu.edu.cn(通信联系人)

大穿透深度等优点,不仅操作简单而且免标记,无损害,能保持生物组织的自然形态,可进行活体检测^[1-2]。因此被广泛应用于血红蛋白、黑色素、脂质等光学吸收特性物质的探测及其分布的成像。为乳房^[3]、皮肤^[4]、脑部^[5-6]、心血管^[7]、眼睛^[8]等人体部位的组织、微小血管以及细胞成像提供了一种有力的工具。由于多模式成像系统能为生物医学研究和诊断提供更全面的信息,而光声显微镜对细胞的光学吸收敏感,共焦显微镜则对细胞的散射敏感,若将光声显微镜和扫描共焦显微镜结合起来可以对样品实现不同机制的多模式成像,同时得到样品的光吸收分布图和光散射分布图,为细胞的结构以及功能研究提供具有互补意义的工具。

因为传统激光扫描共焦显微镜采用连续光作为光源,所以光声显微镜也必须采用连续光作为光源。但是,一方面由于连续调制光的功率远小于脉冲激光,所激发的光声信号比较微弱,对于单个细胞,所激发的光声信号更微弱,在细胞的损伤阈值内不能单靠增强入射光功率来增强细胞的光声信号;而另外一方面,由于压电陶瓷^[9]、聚偏氯乙烯(PVDF)水听器^[10-11]等现行的超声传感器工作在兆赫兹频段,无法响应到连续调制光调制频率(千兆赫兹)的信号,目前已有能够探测到连续调制光激发出来的光声信号的探测器^[12],然而,其灵敏度达不到细胞水平成像。所以,为了将光声显微镜和扫描共焦显微镜结合起来,同时获得生物细胞的光声显微图像和共焦显微图像,必须有适合于连续调制激光工作模式下的高灵敏度的光声探测器。本文介绍了对传统气体传声器进行改造而成的光声微腔探测器,具有高灵敏度,便携轻巧的优点,能得到生物样品高分辨率和高对比度的细胞结构的光声显微图像。

2 光声微腔探测器的原理与设计

图 1 是一个密闭微腔的模型,样品被置于微腔内,其前表面与微腔内气体接触,后表面贴在绝热的有机玻璃上。由于边界层的气体被周期性加热,它将周期性地膨胀和收缩,因而可以看作是一个声活塞作用在微腔内剩余的部分气体上,产生的声压信号在这部分气体中传导。其腔内的压强变化量可以表示为^[13]

$$\delta P(t) = \frac{2\pi\mu'\gamma P_0 S}{T_0} \cdot \frac{\bar{\phi}(t)}{V_0}, \quad (1)$$

其中 γ 为比热, μ' 为热扩散长度, S 为气体边界层的表面积, P_0 和 V_0 分别为腔内的气压和微腔的体积,

T_0 为样品表面的直流温度, $\bar{\phi}(t)$ 为气体边界层内气体的温度, 决定于样品的光吸收系数和入射光功率。由(1)式可以看出,在相同的温度变化情况下,腔内气压变化量与腔的体积成反比,也就是说,腔的体积越小,气压变化量越大,探测器对压力的响应度就越高,所以缩小腔的体积可以有效地提高探测灵敏度。

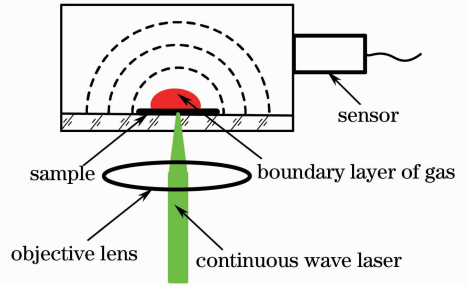


图 1 微腔模型

Fig. 1 Microcavity model

光声探测器的制作材料应满足对光弱吸收甚至不吸收,在所研究的光波长范围内是透明的,入射光或样品散射的光照射到微腔内表面时,其产生的光声信号小,对样品产生的光声信号不影响,因此采用有机玻璃作为探测器的材料。图 2 为设计的光声微腔探测器的结构图,包括微腔、微通道、耦合腔和麦克风 4 部分。微腔的开口处粘着盖玻片,并将样品放在盖玻片上,耦合腔的开口粘着麦克风,整个探测器处于气密状态。当光照射在样品上,产生光声信号,该信号通过微通道传导到耦合腔,被麦克风接收。圆柱形传声器具有容易制造加工的优点,且有大的表面积,可增加探测器灵敏度,所以微腔、耦合腔以及微通道均采用圆柱形结构。在相同的温度变化情况下,腔内气压变化量与腔的体积成反比,腔的体积越小探测器的灵敏度越高,然而,腔的体积也不能无限小,根据 RG(Rosencwaig-Gersho)理论,在距离为 $2\pi\mu'$ 处,气体中的周期性温度变化已衰减为 0,只有样品和腔壁之间的距离 $l' > 2\pi\mu'$ 时,气体才能够在热学上响应样品表面的周期性温度变化。对于室温常压下的空气,当斩光频率 $f = 2.5$ kHz 时, $2\pi\mu' \approx 0.3$ mm,因此,综合微腔与整个系统的配套以及工艺制作等因素,微腔和耦合腔直径均设计为 0.5 mm,高度为 1 mm;为了缩小微腔体积,提高探测器的灵敏度,微通道采用长度为 20 mm,直径为 0.25 mm 的圆柱形结构。麦克风在 100~3000 Hz 中间具有平坦的频率响应特性,灵敏度为 10 mV/Pa。当功率为 3 mW 时,探测器的信噪比为 28 dB。

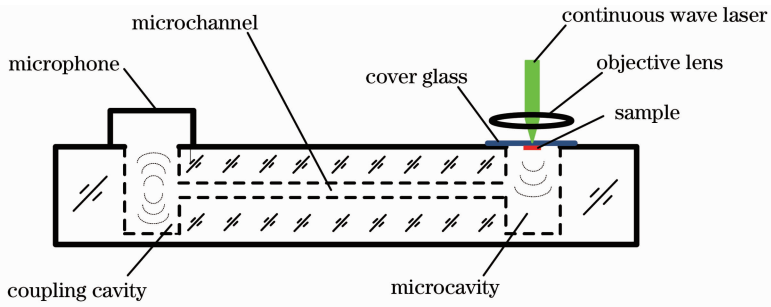


图 2 光声微腔探测器的结构图

Fig. 2 Schematic of the PA microcavity transducer

3 实验方法

图 3 是建立的光声显微系统 (PAM) 原理图。氩离子激光器输出的光经斩波器调制, 调制后的光束通过物镜聚焦到样品上, 同时由振镜控制电路带动振镜 (6231C, Cambridge Technology), 使聚焦光斑相对于样品做水平二维扫描。光声微腔探测器

接收样品产生的光声信号, 将该信号经前置放大器放大后, 再送到锁相放大器 (SR830, Stanford Research Systems) 对其解调并进一步地放大, 由数据采集卡 (PCI6115, National Instrument) 采集数据并存储到电脑, 通过计算机算法重建出样品二维空间分布的光声显微图像。

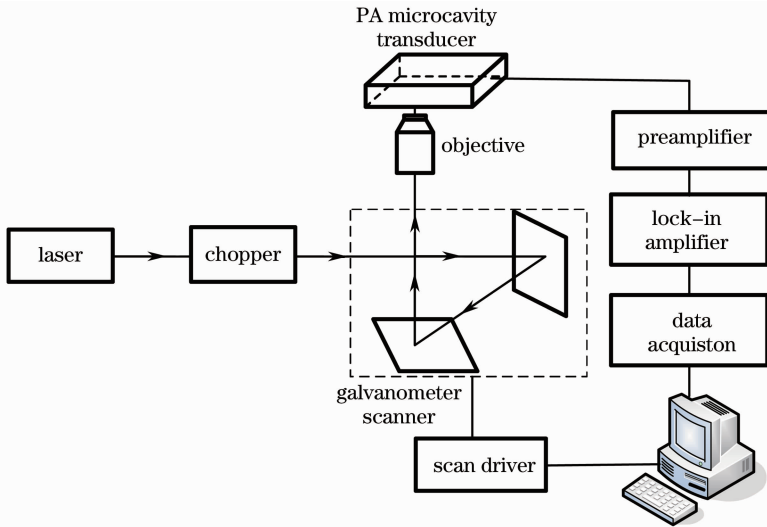


图 3 光声显微系统原理图

Fig. 3 Schematic of the experimental setup of PAM system

4 结果与分析

4.1 植物细胞的光声显微图像

为了验证这设计的微腔光声探测器具有显微成像功能, 首先选择了体积较大的植物细胞进行实验。所选的样品包括有色洋葱表皮细胞和无色洋葱表皮细胞。由于植物细胞较大, 所采用的显微物镜是 $20\times$ 平场透镜。扫描范围为 $400\ \mu\text{m}\times 400\ \mu\text{m}$, 像素为 $256\ \text{pixel}\times 256\ \text{pixel}$ 。

图 4(a) 是有色的洋葱表皮细胞光声显微成像的结果, 图 4(b) 是其光学显微成像的结果。可以看

出, 光声显微镜下所成的洋葱表皮细胞图像结构清晰, 严格与光学显微镜下的细胞图像一一对应, 并且对比度较高, 可以清楚地观察到洋葱表皮细胞的各个结构。细胞边缘对光的吸收较强, 产生强光声信号, 在图像中呈亮区; 而细胞中间对光的吸收较弱, 产生微弱光声信号, 故呈暗区。

为了进一步验证样品色素分布对光声吸收分布的影响, 用无色的洋葱表皮细胞做了一组实验。图 5(a) 是无色洋葱表皮细胞光声成像的结果。可以看出, 由于细胞壁上残留色素, 在光声显微镜上具有光吸收, 产生光声信号, 在图像中呈亮区; 而细胞中

间对光无吸收,不产生光声信号,故呈暗区。图 5(b) 是对其进行相应的光学成像的结果,可以发现,其光声图像与光学图像一一对应。从以上两个实验可以

看出,微腔光声探测器所获得的光声显微图像对比度较高,能分辨出体积较大的植物细胞。

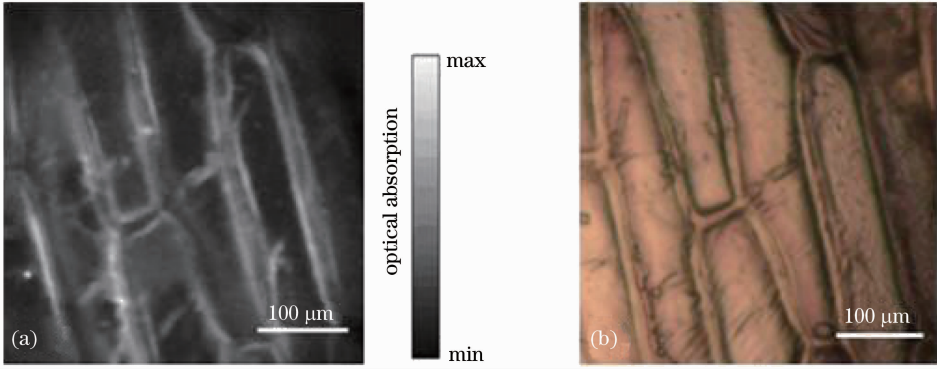


图 4 有色洋葱细胞。(a)光声显微图像;(b)光学显微图像

Fig. 4 Images of onion epidermal cells with colour. (a) Photoacoustic microscopy; (b) optical microscopy

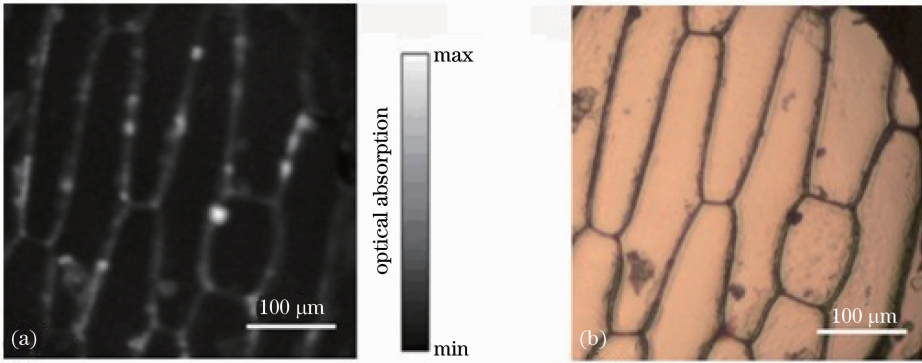


图 5 无色洋葱细胞。(a)光声显微图像;(b)光学显微图像

Fig. 5 Images of onion epidermal cells without colour. (a) Photoacoustic microscopy; (b) optical microscopy

4.2 动物细胞的光声显微图像

血红细胞(RBC)内含有丰富的血红蛋白,血红蛋白对光具有强烈的吸收,它是样品组织当中最主要的光学内源性吸收源之一。通过血红细胞内血红蛋白的分布情况,可以估计血红细胞的健康程度,例如缺铁性贫血。为了验证本文所设计的微腔光声探测器

具有细胞水平分辨率,可以为人体细胞诊断提供有力信息,下面采用了人体血红细胞作为样品进行光声成像。采用的物镜的放大倍数是 60 倍,扫描范围为 $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$,像素为 $250\ \text{pixel} \times 250\ \text{pixel}$ 。

图 7(a)是血红细胞光声显微成像的结果,图 7(b)是血红细胞光学显微成像的结果。由于血红

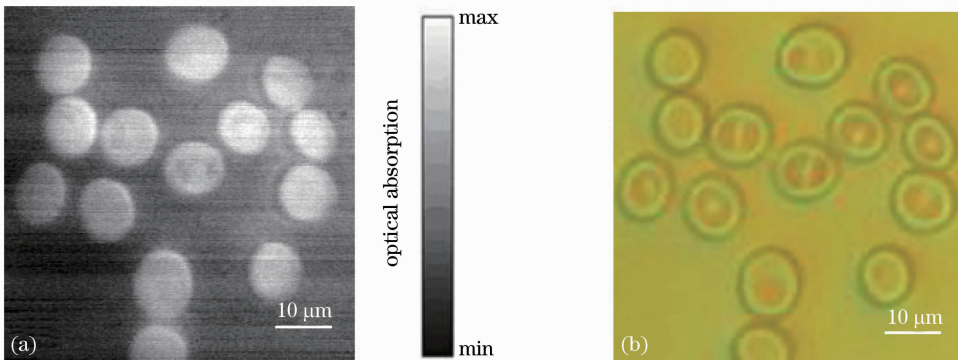


图 6 血红细胞。(a)光声显微图像;(b)光学显微图像

Fig. 6 Images of RBCs. (a) Photoacoustic microscopy; (b) optical microscopy

细胞含有丰富的血红蛋白,对光的吸收很强,利用其产生的强光声信号重建的光声图像边缘清晰,分辨率高,与其用光学显微镜拍出来的光学显微图像一一对应。血红细胞的直径小于 $10\ \mu\text{m}$,由此可以看出这个探测器具有极高的灵敏度,能够实现高分辨率的细胞水平的光声显微成像。

4.3 微腔光声显微成像分辨率测试

为了测试设计的微腔光声探测器获得光声显微

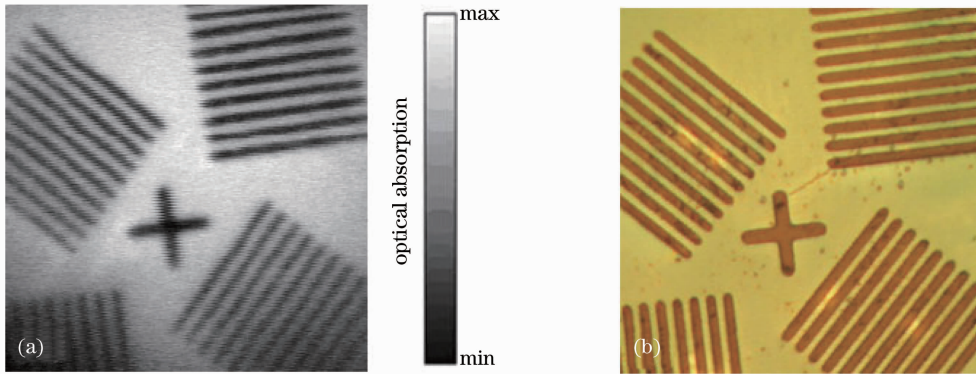


图7 分辨率板。(a)光声显微图像;(b)光学显微图像

Fig. 7 Images of the resolution test target. (a) Photoacoustic microscopy; (b) optical microscopy

5 结 论

成功地设计出灵敏度极高的微腔光声探测器,能够探测到连续调制光激发出的微弱光声信号,结合激光扫描的方法实现了在连续调制激光工作模式下的细胞光声显微成像。通过动植物的细胞样品实验,说明本文所设计的微腔光声探测器具有细胞水平的空间分辨力,并通过分辨率测试板验证了实际分辨力达到 $1.25\ \mu\text{m}$ 以下,对医学上研究生物细胞的功能图像与结构图像有很大的实际应用意义。

参 考 文 献

- 1 Paul Beard. Biomedical photoacoustic imaging [J]. Interface Focus, 2011, 1(4): 602–631.
- 2 Zhang Leihong, Ma Xiuhua. Study on influential factor of photoacoustic signal excited by intensity-modulated continuous-wave laser in biological tissue [J]. Chinese J Lasers, 2011, 38(11): 1104002.
- 3 张雷洪, 马秀华. 生物组织中强度调制的连续光激发的光声信号影响因素研究[J]. 中国激光, 2011, 38(11): 1104002.
- 4 S Manohar, S E Vaartjes, J C van Hespem *et al.*. Initial results of in vivo non-invasive cancer imaging in the human breast using near-infrared photoacoustics [J]. Opt Express, 2007, 15(19): 12277–12285.
- 5 E Zhang, J Laufer, P C Beard. Backward-mode multiwavelength photoacoustic scanner using a planar Fabry-Perot polymer film ultrasound sensor for high-resolution three-dimensional imaging of biological tissues [J]. Appl Opt, 2008, 47(4): 561–577.

图像的分辨率,选用国家标准分辨率板(JJG 827-1993, RTA-07)进行光声显微成像实验。图7(a)是对分辨率板进行光声显微成像的结果,图7(b)是相对应的光学显微图像。分辨率板的线条宽度及线条之间的宽度均为 $1.25\ \mu\text{m}$,从图7(a)中可以看出,线条边缘清晰,能够清晰地辨认出每一条,因此可以确定该光声微腔探测器的分辨率小于 $1.25\ \mu\text{m}$ 。

- 5 J Laufer, E Zhang, G Raivich, *et al.*. Three-dimensional noninvasive imaging of the vasculature in the mouse brain using a high resolution photoacoustic scanner [J]. Appl Opt, 2009, 48(10): D299–D306.
- 6 Liu Yanyan, Yang Xiaoquan, Luo Qingming. Method of sliding focus photoacoustic microscopic[J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(5): 0517002.
- 7 刘炎炎, 杨孝全, 骆清铭. 滑动焦点光声显微成像方法[J]. 光学学报, 2012, 32(5): 0517002.
- 7 B Wang, J L Su, J Amirian, *et al.*. Detection of lipid in atherosclerotic vessels using ultrasound-guided spectroscopic intravascular photoacoustic imaging [J]. Opt Express, 2010, 18(5): 4889–4897.
- 8 R H Silverman, F Kong, Y C Chen, *et al.*. High-resolution photoacoustic imaging of ocular tissues [J]. Ultrasound Med Biol, 2010, 36(5): 733–742.
- 9 C H Li, L V Wang. High-numerical-aperture-based virtual point detectors for photoacoustic tomography [J]. Appl Phys Lett, 2008, 93(3): 033902.
- 10 C G A Hoelen, F F M De Mul, R Pongers, *et al.*. Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue [J]. Opt Lett, 1998, 23(8): 648–650.
- 11 Y Q Lao, D Xing, S H Yang, *et al.*. Noninvasive photoacoustic imaging of the developing vasculature during early tumor growth [J]. Phys Med Biol, 2008, 53(15): 4203–4212.
- 12 K Maslov, L V Wang. Photoacoustic imaging of biological tissue with intensity-modulated continuous-wave laser [J]. J Biomed Opt, 2008, 13(2): 024006.
- 13 Zhiliang Tan, Yanfei Liao, Yongbo Wu, *et al.*. Photoacoustic microscopy achieved by microcavity synchronous parallel acquisition technique [J]. Opt Express, 2012, 20(5): 5802–5808.