

频谱编码内窥成像技术

廖九零 高万荣 方俏然

(南京理工大学电光学院光学工程系, 江苏 南京 210094)

摘要 频谱编码成像技术是一种利用光栅在横向位置编码的新型生物组织成像技术。该技术采用一个光栅和一个聚焦透镜在样品上产生光谱编码线, 无需额外扫描便可得到一条线的图像, 跟频域干涉技术相结合, 再加上慢速的线扫描便可获得三维图像, 在内窥成像上具有很大的实用价值。在分析频谱编码成像技术基本原理的基础上, 推导了主要的性能参数。通过对分辨率测试靶进行成像, 验证分析影响横向分辨率的因素。结果表明, 编码线方向的分辨率与入射光斑直径成反比, 与焦距成正比; 垂直于编码线方向分辨率要弱于编码线方向的分辨率。最后对洋葱样品进行成像, 验证了频谱编码成像技术的可行性。

关键词 成像系统; 医用光学; 频谱编码; 内窥成像

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201434.0611004

Spectrally Encoded Endoscopic Imaging

Liao Jiuling Gao Wanrong Fang Qiaoran

(Department of Optical Engineering, School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China)

Abstract Spectrally encoded imaging (SEI) is a new type of tissue imaging technique in which a grating is used to encode the transverse position. In SEI, a diffraction grating and a miniature lens are used to generate a spectrally encoded line on the sample, and a line image can then be obtained without additional mechanical scanning. In combination with Fourier domain optical coherence tomography and slowly line scanning, SEI is able to provide three dimensional image and is a prospective method in endoscopic imaging. Based on analysis of the basic principle of SEI, the typical performance parameters are derived and the factors that affect lateral resolution are tested by imaging of a resolution target. It is demonstrated that the lateral resolution of SEI for the spectrally encoded line is inversely proportional to the incident light diameter and proportional to focal length of the objective lens. It is also found that the resolution in the direction perpendicular to the spectrally encoded line is poorer than that along the sit. Finally, images of onion cells are presented to demonstrate the feasibility of this technique.

Key words imaging systems; medical optics; spectrally encoded; endoscope

OCIS codes 110.1650; 170.0180; 170.6510

1 引 言

频谱编码内窥镜(SEE)是一种可以实现实时三维组织成像的新型内窥镜。该技术最早由 Tearney 等^[1]在 1998 年提出, 到 2002 年首次将频谱编码应用到内窥技术中^[2], 并得以迅速发展^[3-4]。

现行的微小型内窥镜主要采用光纤束传输二维图像, 但由于硬度和成像不足, 微型内窥镜并不广泛适用^[5]。采用单根光纤进行内窥成像时, 虽然利用

二维微机电系统(MEMS)可以减小整个机械结构的大小, 但还是无法在小尺寸下保持大的扫描范围^[6-7]。SEE 是一项克服了许多光纤束成像限制的内窥成像技术^[8]。在 SEE 中, 由单模光纤发射出的复色光经过一个衍射光栅和微小透镜后, 不同的波长照射组织表面的不同位置, 这样就实现了空间光谱编码代替快速扫描, 第二维的图像可以用慢速的机械扫描来获得。在内窥镜里减小快速扫描可以显著减小

收稿日期: 2014-01-17; **收到修改稿日期:** 2014-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(61275198, 60978069)

作者简介: 廖九零(1990—), 男, 博士研究生, 主要从事生物组织成像方面的研究。E-mail: liaojiulin304@163.com

导师简介: 高万荣(1961—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医学方面的研究。E-mail: wgao@njjust.edu.cn

探针的尺寸^[9],SEE 的整个探头尺寸可以做的跟光纤一样小。频谱编码也能够通过采用干涉的方法提供深度信息,从而实现实时三维内窥成像^[10-11]。

本文首先讨论了频谱编码成像技术的工作原理,然后在小角度近似条件下推导频谱编码成像技术的主要性能参数,并通过采用不同聚焦透镜,不同准直透镜来进行实验验证。最后,给出了洋葱样品的频谱编码图像,证明了频谱编码在生物成像领域的潜力。

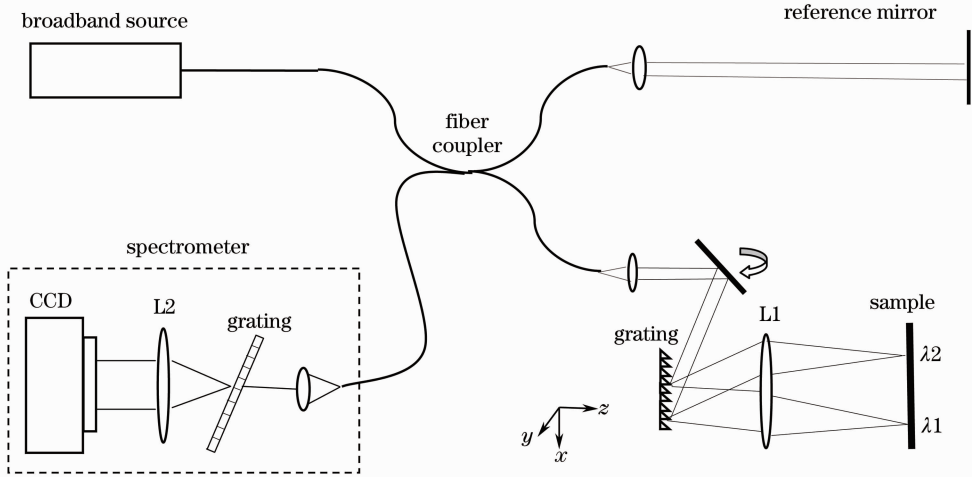


图 1 频谱编码成像系统原理图

Fig. 1 Schematic of the spectrally encoded imaging system

根据光栅方程

$$\sin \theta + \sin \theta_0 = mG\lambda, \quad (1)$$

式中 θ, θ_0 分别表示入射角和衍射角, m 表示衍射级数, G 表示光栅线密度, λ 为波长,一般都取一级衍射进行简化运算。在入射角相同的情况下,宽带光源的每一个波长都以不同的的角度衍射到样品上(如图 1 中的 λ_1, λ_2),沿着光谱线的每个点都可以认为是被不同波长的光照明,这样就实现了无需机械扫描的空间频谱编码。

参考臂同样采用消色差透镜进行准直和聚焦,调节两臂光程使之匹配后,照射到样品上的光经光栅返回后与参考镜反射回的光进行干涉。由于从样品臂返回的光不仅携带了不同 x 位置的信息,而且还携带了样品不同深度处(z 方向)的后向散射光信息。干涉后的光经过准直,被透射式光栅衍射,经过透镜汇聚后不同波长的光照射到 CCD 的不同像素上。不同波长对应不同样品横向位置,而每个像素上照射的光具有一定带宽,利用光谱仪和计算机的计算便可实现波长解码。对于所得到的光谱数据,一般采用短时傅里叶变换进行处理^[12],选择合适的窗函数和窗口大小,就可以实现横向(x 轴)上和纵向(z 轴)上的合适分辨率。通过慢速机械扫描(一

2 基本原理

如图 1 所示,宽带光源发出的光通过单模光纤耦合进迈克耳孙干涉仪。在样品臂,宽带激光被一个高线对数(线对数为 G)的光栅衍射,此时光斑直径为 D 。然后经过一个焦距为 f 的消色差透镜 L1 聚焦到编码线上(x 轴)。在内窥应用中,样品臂的准直镜,光栅,聚焦物镜都是集成在微小的探头中。

一般是振镜转动),改变编码线的位置,获取沿 y 轴不同位置时的信号,即可合成得到三维图像。

3 系统参数分析

通常照射到光栅上的光斑直径 D 很小,衍射发散角 $\Delta\theta$ 也很小,因此沿编码线方向可分辨的视场大小可以近似认为

$$\Delta x \approx z_0 \cdot \Delta\theta = \frac{\sigma_\lambda G z_0}{\cos \theta_0}, \quad (2)$$

式中 z_0 为物镜 L1 到样品的工作距离, σ_λ 为光源光谱带宽。

沿着编码线方向可分辨的点的个数为

$$N_x = \frac{\sigma_\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{\sigma_\lambda DG}{\lambda_0 \cos \theta}, \quad (3)$$

式中 $\Delta\lambda$ 为样品处光栅光谱分辨率, λ_0 为中心波长。

为了满足较大的衍射效率,光束入射到光栅上要采用利特罗结构^[13],因此入射角等于衍射角,即 $\theta_0 = \theta$ 。一般认为工作距离就是物镜的焦距,因而横向分辨率为

$$S_x = \frac{\Delta x}{N_x} = \frac{\lambda_0 z_0}{D} \approx \frac{\lambda_0 f}{D}. \quad (4)$$

对于横向分辨率的表达式,参考文献^[14]还推导出

横向分辨率为 $S_x = 0.738\lambda_0 f/D$, 文献[15] 提出了 $S_x = 1.029\lambda_0 f/D$, 认为由于采用了非共焦形式, 所以分辨率要比文献[14]的大 35%。在实际内窥应用中, 探头工作环境在体内, 焦距都很小, 因而横向分辨率可以达到微米量级, 也符合内窥应用要求。

根据光轴附近的圆对称性^[14], y 轴的横向分辨率等于 x 轴的横向分辨率

$$S_y = S_x. \quad (5)$$

沿 y 轴的成像范围主要受扫描范围限制, 若采用的是扫描振镜, 扫描角度为 $\Delta\varphi$, 则沿 y 轴的成像范围为

$$\Delta y = 2z_0 \tan(\Delta\varphi). \quad (6)$$

若采用步进电机进行扫描, 则 y 轴的成像范围就等于步进电机的行程。

在样品每一点都由带宽为 $\Delta\lambda$ 的光照射, 这部分光通过低相干测量, 采用直接傅里叶变换就可以获得深度信息^[16]。类比于频域光学相干断层扫描(OCT)的工作原理^[17-18]和深度分辨率公式^[19], SEE 的深度分辨率可以表示为

$$S_z = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\sigma_\lambda/N_x} = 0.44 \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda}. \quad (7)$$

显然采用频谱编码方法, 在深度方向上分辨率要比频域 OCT 差。根据参考文献[14]的数据, 横向分辨率与普通共焦内窥镜相近, 约为微米量级; 而纵向分辨却为数百微米。为了达到较好的深度分辨率, 需要单点所占带宽较大, 这就需要更宽光谱的光源; 或者选取数个横向相邻的点当作横向一个点, 采用加窗傅里叶变换, 可以获得较高的纵向分辨率。后一种方法牺牲横向分辨率, 但是实际应用中横向分辨率较高, 选取合适的窗函数可以实现横向和纵向的高分辨。

在 z 轴, 即深度方向的可分辨点为^[14]

$$N_z = \frac{\Delta\lambda}{\Delta\lambda_{\text{spec}}}, \quad (8)$$

$\Delta\lambda_{\text{spec}}$ 为光谱仪的光谱分辨率, 同轴向分辨率一样, 由于单点带宽很短, 深度方向上可分辨的点也很少。

4 实验结果及分析

为了分析频谱编码成像, 搭建了一个基本的原理实验对分辨率测试靶, 盖玻片以及洋葱鳞片细胞进行了成像。

大部分生物组织对于 600~1300 nm 波长范围内的光辐射的吸收较弱, 光在其中传播时主要发生散射过程。散射过程使光强随着传播深度而衰减, 并可引起光的相干性^[20]和偏振度^[21-22]的变化。由

(3)式和(7)式可见, 光源的带宽越宽, 可分辨的点数越多, 平面和深度分辨率越高。在实验中, 采用超发光二极管光源(BLM-S-840-B-1-20, Superlum)中心波长为 840 nm, 其光谱带宽达到 50 nm, 并且有超过 15 mW 的输出光功率。样品臂采用的是中心波长在 750 nm, 线对数为 600 的反射式光栅, 此光栅工作波段接近光源波长范围。为了测试聚焦透镜焦距对成像系统的影响, 选取了不同焦距的聚焦物镜。测试臂是利用线对数为 1200 的透射式光栅进行衍射, 光谱分辨率好于样品臂光谱分辨率。CCD 选用的是 2048 pixel 的线阵 CCD(AViiVA EM4 2014, e2v), 该 CCD 线扫频率最高可达到 70 kHz, 满足快速实时成像的要求。

4.1 焦距对横向分辨率的影响

采用步进电机进行 y 轴扫描, 对 USAF-1951 分辨率测试靶进行平面成像测试。样品臂处采用等效焦距为 11 mm, 通光孔径为 4.4 mm 的光纤准直器进行准直, 理论出射光斑大小为 2.35 mm, 在样品处分别采用焦距为 30 mm 和 60 mm 的消色差透镜进行聚焦。步进电机的行程都为 10 mm, 图 2 只截取其中感兴趣的区域。图 2(a), (b) 分别表示 60 mm 透镜和 30 mm 透镜所成的像, 认为分别能看清第 4 组的第 6 个元素和第 5 组的第 6 个元素。由表 1 可以看出, 理论值跟实际值相差较大, 主要原因可能在于分辨率测试靶不在聚焦透镜焦点处, 还有人为判断能分辨的线对数不够准确。为了使衍射光垂直入射到样品上且获得比较大的衍射光强, 实验中并未采用利特罗结构, 而是采用了接近 -1 级衍射的光路结构。入射角约为 7° , 衍射角约为 34° 。当物镜焦距为 60 mm 时, 代入(2)式得出理论视场横向视场大小为 2.17 mm。同理, 当物镜焦距为 30 mm 时, 理论横向视场大小为 1.08 mm。对第 4 组的第 1 个元素的横向图样(长度为 0.156 mm)进行像素个数测量, 在焦距为 60 mm 时, 测得所占像素数为 117.5(对 3 个横向图样取平均的值), 视场为 $0.156 \times 2048/117.5 = 2.72$ mm。同理, 在焦距为 30 mm 时, 测得该图样的所占像素数为 207, 视场为 1.54 mm。由视场除以分辨率即可得到可分辨点数, 分别为 77 和 88。由实际测量值可以看出, 分辨率, 视场范围与聚焦物镜的焦距成正比。可分辨的点与光栅的光谱分辨率有关, 利用焦距为 30 mm 的聚焦透镜能获得 88 个可分辨点, 对于快速内窥成像是非常有利的。

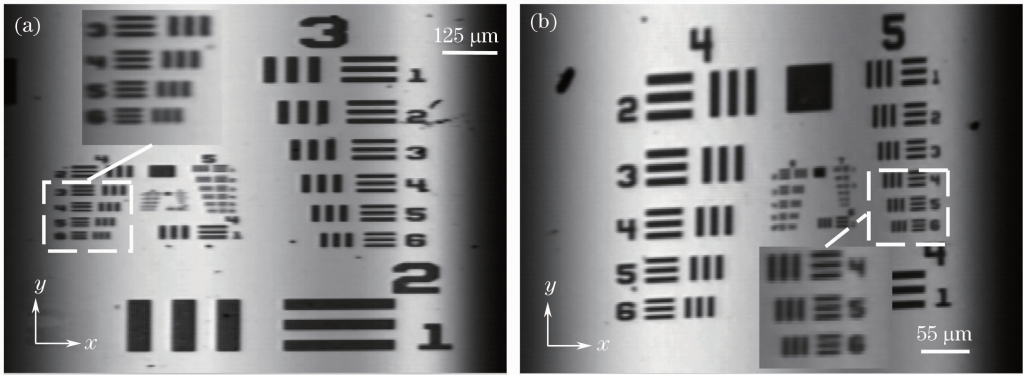


图 2 不同焦距下 USAF 分辨率测试靶图像。(a) 60 mm; (b) 30 mm

Fig. 2 Image of the USAF resolution target by objective lens at different focal lengths. (a) 60 mm; (b) 30 mm

表 1 焦距为 60 mm 和 30 mm 时的成像性能比较

Table 1 Comparison of the imaging performance with focal length of 60 mm and 30 mm

Objective lens focal length	Resolution (theoretical value)	Imaging range (theoretical value)	Resolvable points (theoretical value)
60 mm	35.08 μm (25.68 μm)	2.72 mm (2.17 mm)	77 (85)
30 mm	17.54 μm (12.84 μm)	1.54 mm (1.08 mm)	88(85)

4.2 入射光斑大小对横向分辨率的影响

为了验证照明光斑对横向分辨率的影响,又采用了焦距为 30 mm 消色差透镜对激光进行准直,理论光斑大小 6.42 mm,然后采用 30 mm 聚焦物镜对 USAF-1951 分辨率测试靶成像得到了图 3(a)。图 3(b)是第 7 组第 1 个元素的竖向图样(即沿频谱编码线方向, x 轴)进行滤波处理后的归一化强度分布图,线宽是 7.81 μm 。图 3(c)是第 6 组第 2 个横向

图样(即机械扫描方向, y 轴)的归一化强度分布图,线宽是 13.92 μm 。理论上 x 轴分辨率与 y 轴分辨率相等,但是由于步进电机移动速度较快,抖动较大,导致沿 y 轴方向采集时出现了混叠,从而使得扫描方向分辨率要差于沿频谱编码线的方向。理论和实际上都表明,采用更大光斑的光进行照明横向分辨能力更好。但在实际内窥应用中,为了使得系统微小化不能将探头做得太大。

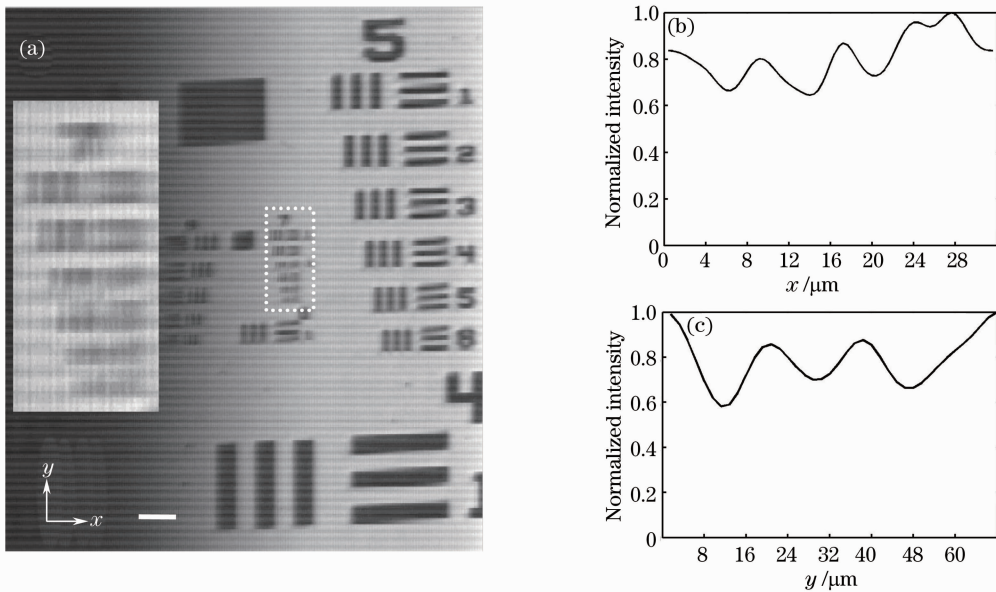


图 3 (a) USAF 分辨率测试靶图像; (b) 第 7 组第 1 个元素沿 x 轴方向强度分布; (c) 第 6 组第 2 个元素沿 y 轴强度分布。比例尺为 20 μm

Fig. 3 (a) Image of the USAF resolution target; (b) line profiles crossing the three perpendicular lines at Group 7, Element 1; (c) line profiles crossing the three horizontal lines at Group 6, Element 2; scale bar is 20 μm

4.3 盖玻片成像测试

采用等效焦距为 11 mm 的光纤准直器进行光束准直,光栅分光后经过 30 mm 焦距的消色差透镜汇聚到一层盖玻片。横向可分辨的点理论上为 85 个,每个横向可分辨的点对应所占的带宽为 0.59 nm。在光谱仪中,整个带宽的光刚好充满 CCD 像素,每 24 个像素点($2048/85=24.09$)对应样品横向的一个点。图 4(a)是盖玻片干涉原图,对干涉图样进行以 Hamming 窗为窗口的短时傅里叶变换。图 4(b)~(d)是窗口宽度(奇数)分别采用为 23 个像素,71 个像素,141 个像素时还原出的盖玻片图像。图 4(b)~(d)分别对应横向上 1 个点,3 个点和 6 个点,根据(7)式,对应的深度分辨率为 527.8、175.9、88.0 μm 。盖玻片的厚度约为 130~170 μm ,图 4(b),(c)中盖玻片上下表面还是混叠无法分辨开来,图 4(d)图可以分辨出盖玻片的上下表面。

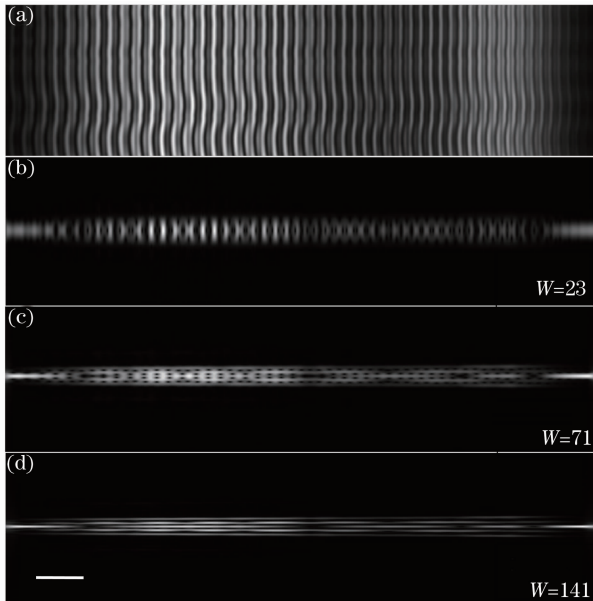


图 4 (a)盖玻片的干涉图;(b)~(d)为采用不同 Hamming 窗的短时傅里叶变换图。比例尺为 1 mm

Fig. 4 (a) Interference pattern of coverslip; (b)~(d) short-time Fourier transform with Hamming window of various sizes. Scale bar is 1 mm

把样品横向上 6 个点当作 1 个点牺牲了横向分辨率和横向可分辨的点数,但是提高纵向分辨率,合理地选择系统参数,可以实现横向和纵向的高分辨。

4.4 洋葱样品成像

图 5(a)是采用频谱编码技术对洋葱鳞状细胞切片进行一维扫描得到的图像,利用的是焦距为 11 mm 的准直透镜和 30 mm 的聚焦透镜。由图 5(b)可以较为清楚地看到洋葱细胞的轮廓。洋葱细胞横向直径

约为 50~250 μm ^[23],测得实际大小为 200~250 μm 。由于洋葱样品放置在载玻片上,洋葱本身比较透明,从载玻片反射回的光与洋葱反射回的光发生了干涉,从而在洋葱细胞上出现了干涉条纹。该实验表明频谱编码作为一种成像技术,对于生物组织样品进行成像是可行的。

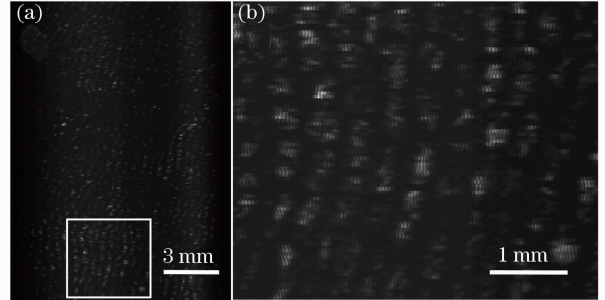


图 5 (a)洋葱细胞图像;(b)(a)中实线框内放大图像
Fig. 5 (a) Onion cells image; (b) magnified view of the square region in (a)

5 结 论

频谱编码成像技术具有进行快速内窥成像能力,在临床医疗诊断中具有重要的应用前景。对影响横向分辨率的各个因素进行理论分析和实验验证的结果表明,编码线方向的分辨率与入射光斑直径成反比,与焦距成正比,与系统参数理论相符。然后,利用实验系统,采用焦距 11 mm 的光纤准直器和 30 mm 的聚焦透镜,进行单次扫描即可获得一个平面的图像,横向分辨率可以达到 17.54 μm ,沿编码线视场可以达到 1.54 mm。该研究结果对于 SEE 的进一步应用以及内窥成像具有理论借鉴意义。给出了对洋葱样品所成的频谱编码图像,从而说明该系统具有对生物组织实现高分辨率成像的能力。

参 考 文 献

- 1 G J Tearney, R H Webb, B E Bouma. Spectrally encoded confocal microscopy [J]. *Opt Lett*, 1998, 23(15): 1152-1154.
- 2 G J Tearney, M Shishkov, B E Bouma. Spectrally encoded miniature endoscopy [J]. *Opt Lett*, 2002, 27(6): 412-414.
- 3 D K Kang, D Yelin, B E Bouma, *et al.*. Spectrally-encoded color imaging [J]. *Opt Express*, 2009, 17(17): 15239-15244.
- 4 S C Schlachter, D K Kang, M J Gora, *et al.*. Spectrally encoded confocal microscopy of esophageal tissues at 100 kHz line rate [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(9): 1636-1645.
- 5 D Yelin, I Rizvi, W M White, *et al.*. Three-dimensional miniature endoscopy [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 765-765.
- 6 J T C Liu, M J Mandella, H Ra, *et al.*. Miniature near-infrared dual-axes confocal microscope utilizing a two-dimensional microelectromechanical systems scanner [J]. *Opt Lett*, 2007, 32(3): 256-258.

- 7 N Deliolanis, T Lasser, D Hyde, *et al.*. Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360° geometry projections [J]. *Opt Lett*, 2007, 32(4): 382–384.
- 8 L Froehly, S N Martin, T Lasser, *et al.*. Multiplexed 3D imaging using wavelength encoded spectral interferometry: a proof of principle [J]. *Opt Commun*, 2003, 222(16): 127–136.
- 9 Wang Ling, Ding Zhihua, Wu Tong, *et al.*. Swept-source optical coherence tomography for endoscopic imaging with wavelength-encoding probe [J]. *Chinese J Lasers*, 2009, 36(10): 2493–2497.
王 玲, 丁志华, 吴 彤, 等. 基于波长编码的扫频光学相干内窥成像方法 [J]. *中国激光*, 2009, 36(10): 2493–2497.
- 10 D Yelin, B E Bouma, G J Tearney. Volumetric sub-surface imaging using spectrally encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2008, 16(3): 1748–1757.
- 11 D Yelin, B E Bouma, N Iftimia, *et al.*. Three-dimensional spectrally encoded imaging [J]. *Opt Lett*, 2003, 28(23): 2321–2323.
- 12 D Yelin, B E Bouma, J J Rosowsky, *et al.*. Doppler imaging using spectrally-encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2008, 16(19): 14836–14844.
- 13 D K Kang, R W Carruth, M Kim, *et al.*. Endoscopic probe optics for spectrally encoded confocal microscopy [J]. *Biomedical Opt Express*, 2013, 4(10): 1925–1936.
- 14 M Merman, A Abramov, D Yelin. Theoretical analysis of spectrally encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2009, 17(26): 24045–24059.
- 15 A Abramov, L Minai, D Yelin. Multiple-channel spectrally encoded imaging [J]. *Opt Express*, 2010, 18(14): 14745–14751.
- 16 D Yelin, W M White, J T Motz, *et al.*. Spectral-domain spectrally-encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2007, 15(5): 2432–2444.
- 17 Huang Bingjie, Bu Peng, Wang Xiangzhao, *et al.*. Optical coherence tomography based on depth resolved dispersion compensation [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(2): 0217002.
黄炳杰, 步 鹏, 王向朝, 等. 用于频域光学相干层析成像的深度分辨色散补偿方法 [J]. *光学学报*, 2012, 32(2): 0217002.
- 18 Chen Chaoliang, Gao Wanrong. Method of measuring dispersion and refractive index of transparent object based on spectral fiber low coherence interferometry [J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(10): 1008005.
陈朝良, 高万荣. 基于光谱光纤低相干的透射样品色散和折射率测量方法 [J]. *中国激光*, 2013, 40(10): 1008005.
- 19 Chong Bo, Zhu Yongkai. Method to improve axial resolution of spectral domain optical coherence tomography [J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(2): 0217001.
崇 博, 朱永凯. 谱域光学相干层析系统轴向分辨率提高方法 [J]. *光学学报*, 2013, 33(2): 0217001.
- 20 W Gao. Change of coherence of light produced by tissue turbulence [J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2013, 131: 52–58.
- 21 W Gao. Changes of polarization of light beams on propagation through tissue [J]. *Opt Commun*, 2006, 260(2): 749–754.
- 22 W Gao, O Korotkova. Changes in the state of polarization of a random electromagnetic beam propagating through tissue [J]. *Opt Commun*, 2007, 270(2): 474–478.
- 23 Wang Xinyu, Guo Fengjin, Nie Xiuwan, *et al.*. Morphology and structure of cytoplasmic actin microfilament skeleton in onion protoplasts of bulb parenchyma cells [J]. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1996, 29(2): 169–177.
王新宇, 郭凤劲, 聂秀苑, 等. 洋葱鳞茎薄壁细胞原生质体胞质肌动蛋白质微丝骨架的形态与结构 [J]. *实验生物学报*, 1996, 29(2): 169–177.

栏目编辑: 韩 峰