

一种提高频谱编码成像技术信噪比的方法

廖九零 高万荣

南京理工大学电子工程与光电技术学院, 江苏 南京 210094

摘要 频谱编码成像技术是一种采用衍射光栅把不同波长照明到样品的不同位置处的新型反射式显微成像技术。搭建了一个基于50 kHz扫频光源的频谱编码显微系统,为解决无后置放大器情况下探测微弱样品光的问题,采用平衡探测的方法进行了成像测试。通过对USAF-1951分辨率板成像测得横向分辨率由13.93 μm 提高到5.52 μm ,采用平衡探测的方法使得洋葱样品图像信噪比(SNR)由15.07 dB提高到22.6 dB。研究结果表明,采用平衡探测的方法能够提高图像分辨率和信噪比。对离体猪胃小凹样品进行成像,验证了频谱编码成像技术在生物消化道内成像的可行性,为下一步该方法实现临床应用奠定了理论基础。

关键词 生物光学;成像系统;频谱编码;显微成像;信噪比

中图分类号 R318.51

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201535.0317001

A Method of Improving Signal-to-Noise Ratio in Spectrally Encoded Microscopy

Liao Jiuling Gao Wanrong

*School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology,
Nanjing, Jiangsu 210094, China*

Abstract Spectrally encoded microscopy is a new reflecting microscopic imaging technique in which a diffraction grating is used to illuminate different positions on the sample with different wavelengths. A spectrally encoded microscopic imaging system is built, and it is based on a swept source at a sweeping rate of 50 kHz. In order to detect the weak light backscattered from the sample without a post-amplifier used, balanced detection is employed. The lateral resolution of the device is improved from 13.93 μm to 5.52 μm by imaging a USAF-1951 resolution target. The images of onion cells show that the signal-to-noise ratio (SNR) increases from 15.07 dB to 22.6 dB by balanced detection, demonstrating the capability of the method to improve both of the lateral resolution and SNR of the system. Images of *in vitro* swine gastric pits are presented to demonstrate tissue imaging capability of the technique. The work is useful for developing corresponding devices for potential clinical applications.

Key words biotechnology; imaging system; spectrally encoded; microscopic imaging; signal-to-noise ratio

OCIS codes 170.0180; 170.6510; 110.0180; 110.4280

1 引 言

频谱编码显微成像是近年发展起来的新型反射式显微成像技术^[1],该技术利用光栅的分光特性,无需横向扫描就可以获得一条编码线的信息,便于快速成像^[2]。与光学相干层析术获取深度信息类似^[3-5],频谱编码也能够通过干涉的方法获取深度信息,实现实时三维成像^[6]。采用光栅分光进行探测的频谱编码方法可以应用于不同的成像方式中,如亚表面成像^[7],流式细胞计数^[8-9],多普勒成像^[10],荧光成像^[11],彩色成像^[12]等。

频谱编码技术以空间光谱编码代替快速扫描,以慢速的机械扫描获得第二维的图像,显著减小内窥探头的尺寸^[13]。频谱编码方式具有非侵入式和结构紧凑的特点,常用于内窥成像^[14-15],其中一种可行的应用领

收稿日期: 2014-09-28; 收到修改稿日期: 2014-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(61275198, 60978069)、国防基础科研资助项目

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,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: wgao@njjust.edu.cn

域是消化道成像^[16]。现行的共焦显微内窥镜能获得较高的分辨率,但无法实现较大的视场^[17]。虽然频谱编码方式采用的高数值孔径(NA)显微物镜视场也不大,但是其直接得到一条线的图像具有快速成像的特性,可以通过快速螺旋状移动探头以实现大视场^[18],这样有利于整个器官的成像。扫频光源作为一种波长随时间快速变化的光源^[19],不同波长照射到一条线上的不同位置时可以替代机械扫描,只需高速探测器即可获取不同波长的光谱信息,符合快速频谱编码的要求。

本文搭建了基于 50 kHz 扫频光源的频谱编码成像系统。由于从生物样品反射的光很微弱,为了在没有放大器的情况下进行生物样品探测,采用将反射得到的信号光进行分光再同时接入探测器的平衡探测法,取代放大器发挥放大作用,对分辨率板和洋葱样品进行成像,获得了整个系统的分辨率和成像信噪比,得到离体猪胃小凹的显微图像。

2 实验原理及装置

2.1 频谱编码分光原理

根据光栅方程^[20]

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

式中 θ, θ_0 分别为入射角和衍射角, m 为衍射级数, G 为光栅线密度, λ 为波长。入射角相同时,宽带光源的每一个波长都以不同的角度衍射到样品上,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。从样品反射回来的光耦合进探测器,由探测器快速获取反射光的光谱,这些光谱对应着照明时频谱编码线的图像。

2.2 实验装置

如图 1 所示,宽带扫频光源(扫频速度为 50 kHz,中心波长 $\lambda_0 = 1302.5$ nm,最佳使用带宽 $\sigma_\lambda = 94$ nm)发出的光通过分光比为 50:50 的单模光纤耦合器进入样品臂。在样品臂处,扫频激光由透镜 L1(焦距 $f_1 = 10$ mm)准直成细光束(理论直径 $D = 1.81$ mm),然后照射至衍射光栅(线密度 $G = 1145$ lines/mm)。衍射光束经过望远系统(焦距 $f_2 = 30$ mm, $f_3 = 75$ mm,放大倍率为 2.5)中继后进入显微物镜($NA = 0.4$),然后照射至样品。由样品反射回的光进入分光比为 90:10 的耦合器,分光后两端分别接入平衡探测器(带宽为 100 MHz)的两端,平衡探测器输出信号经由采集卡传入计算机中储存显示。步进电机垂直于编码线方向移动以获得不同位置处的编码线信号,得到二维平面图像。

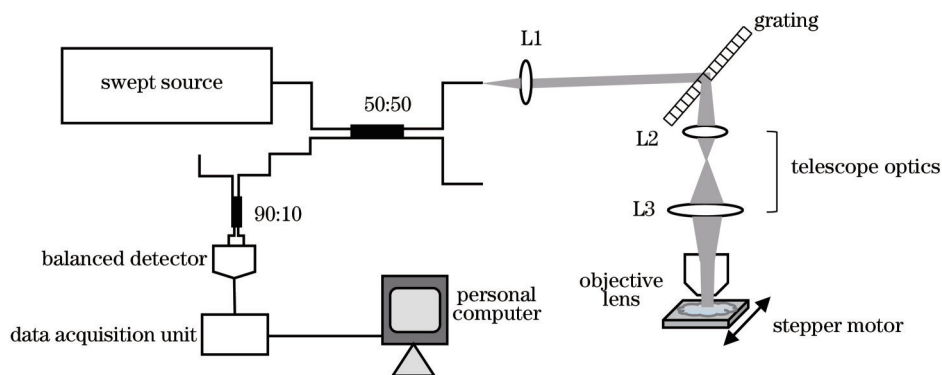


图 1 频谱编码成像系统

Fig.1 Schematic of the spectrally encoded imaging system

2.3 系统参数

频谱编码基本原理是光栅分光后不同波长照射位置不同,光栅可分辨的波长数量决定了可分辨点的数量。沿编码线方向可分辨点的数量为

$$N_x = \frac{\sigma_\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{\sigma_\lambda DG}{\lambda_0 \cos \theta}, \quad (2)$$

式中 $\Delta\lambda$ 为光栅光谱分辨率。采用利特罗结构, $\theta = \theta_0 = 48.2^\circ$, 将该系统参数代入(2)式,得到理论可分辨点数

为224个,单次照射无需扫描即可获得较多的可分辨点,在内窥应用中具有很大的价值。

横向分辨率为^[21]

$$S_x \approx \lambda_0 \frac{f}{d} \approx \frac{\lambda_0}{NA}, \quad (3)$$

式中 f 为显微物镜焦距, d 为入射至显微物镜的光斑大小, NA 为显微物镜数值孔径。将该系统参数代入(3)式,得到理论分辨率为 $3.26 \mu\text{m}$, 与普通显微镜分辨率值接近。

2.4 平衡探测

平衡探测器采用两个相互匹配的平衡光电二极管,可以得到很好的共模抑制比,加上一个超低噪声的高速互阻放大器,可以实现微小信号的放大。忽略 90:10 光纤耦合器分光时引入的噪声,平衡探测器 Monitor+ 端口信号光强度 I_+ 为

$$I_+ = 0.9I, \quad (4)$$

式中 I 为信号光强度。红外光电探测器主要存在散粒噪声和热噪声^[22],该端口引入的噪声 N_{D+} 为

$$N_{D+} = k_1 I_+ + k_2 T, \quad (5)$$

式中第一项为散粒噪声,与响应电流成正比,第二项为热噪声,与热力学温度 T 成正比, k_1 、 k_2 分别为比例系数。同理,平衡探测器 Monitor- 端口信号光强度 I_- 为

$$I_- = 0.1I. \quad (6)$$

由于两端口的光电二极管完全相同, Monitor- 端口噪声 N_{D-} 为

$$N_{D-} = k_1 I_- + k_2 T. \quad (7)$$

平衡探测器实际为一个减法器,平衡探测输出端 RF 端口输出信号 I_{RF} 为

$$I_{RF} = a[(I_+ + N_{D+}) - (I_- + N_{D-})] + N_D = 0.8aI + 0.8k_1aI + N_D, \quad (8)$$

式中 a 为放大系数,数值较大, N_D 为平衡放大探测时引入的噪声,非常微弱。因而采用平衡探测方法得到的信噪比 R_{RF} 为

$$R_{RF} = \frac{0.8aI}{0.8k_1aI + N_D} = \frac{1}{k_1 + N_D/0.8aI}. \quad (9)$$

对于传统的直接探测方式,引入的噪声 N 为

$$N = k_1 I + k_2 T, \quad (10)$$

信噪比 R_{con} 为

$$R_{con} = \frac{I}{k_1 I + k_2 T} = \frac{1}{k_1 + k_2 T/I}. \quad (11)$$

对比(9)式与(11)式可以看出,采用平衡探测的方式可以放大探测信号。虽然散粒噪声没有消除掉,但对于生物样品探测得到的微弱信号光,平衡探测方式能消除一部分与光强无关的热噪声,使信噪比获得明显的改善。

3 实验结果及分析

3.1 光谱

图2为扫频光源随时间变化的波形图,扫频光源波长随时间变化,随时间变化的波形图可认为是该扫频光源的光谱图。图2(a)为光源输出波形,扫频速度为 50 kHz,测量功率半峰全宽所占的时间,得到该扫频光源占空比约为 51%。图2(b)为将反射镜放置在样品处得到的反射光谱,光谱形状与输出光谱相比变化较大,主要原因有:1)显微物镜的最佳工作波段不是近红外波段;2)不同波长衍射效率不同,而且照明和收集都要经过光栅,经过了两次衍射;3)光路调节略有误差,样品不同位置对应不同波长,沿原路返回时,未能以照明时的衍射角入射至光栅上,因而返回时光栅衍射角不同于照明时的入射角,导致非平行光通过准直器耦合进直径有限的光纤芯,使得不同波长的强度分布与光源输出光谱不同。图2(c)为平衡探测反射光谱图,根据(8)式,平衡探测可放大信号,当输入信号较大时,平衡放大响应已饱和。与图2(b)的光谱对比可以发现,不同

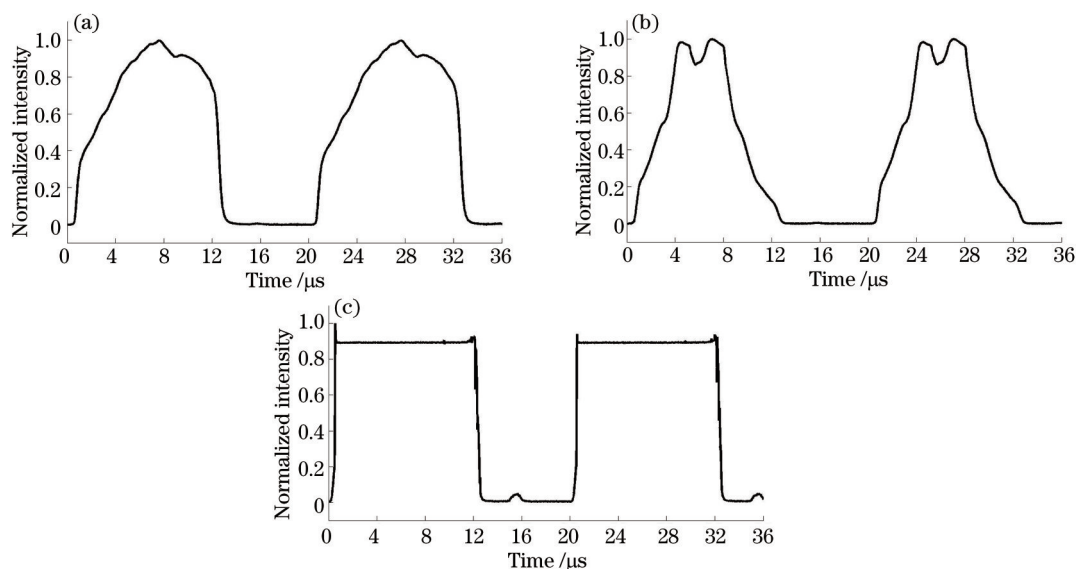


图2 波形图。(a)光源波形;(b)反射波形;(c)平衡探测波形

Fig.2 Waveforms. (a) Source; (b) reflection; (c) balanced detection

波长的响应不一样,但是没有丢失波长。实际探测生物样品时,信号较为微弱,一般不会出现饱和情况。

3.2 分辨率

图3为USAF-1951分辨率测试靶图像(由美国空军于1951年创建,符合MIL-STD-150A标准的分辨率测试图像),可以看出平衡探测的分辨能力比直接探测的分辨能力强。根据(3)式,理论分辨率为 $3.26\ \mu\text{m}$ 。从图3(a)可以看出在频谱编码线(水平方向)上只能看到第6组第2个图样,对应可分辨线宽为 $13.93\ \mu\text{m}$,而步进电机移动方向(纵向)上可以分辨第7组图样,表明移动方向分辨率优于编码线方向。图3(b)可以看清第7组第4个图样,对应可分辨线宽为 $5.52\ \mu\text{m}$ 。当直接探测第7组的图样时,由于线宽很小,明暗条纹反射回的光强相差不大而无法分开。当采用平衡探测时,明暗条纹的强度差值被放大而被分辨开来。

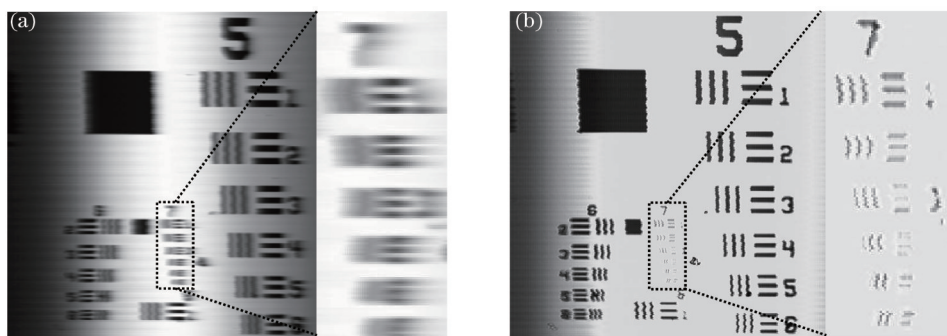


图3 USAF-1951分辨率测试靶图像。(a)直接探测;(b)平衡探测

Fig.3 Images of USAF-1951 resolution target by (a) direct detection and (b) balanced detection

3.3 生物样品

图4为洋葱样品实验图像,图4(a)为直接探测得到的图像,图4(c)为平衡探测得到的图像。比较图4(b)与图4(d)可以发现平衡探测得到的洋葱图像轮廓更加分明,而细胞核也更能分辨开来。扫频光源占空比约为51%,该光源探测得到的图像具有没有样品信息的黑暗背景区。图4(a)与图4(c)中右侧方框为感兴趣样品区,左侧方框分别对应着背景区图像。对感兴趣样品区取平均强度 S ,选取和样品区相同大小的背景区计算标准差 D ,该图像的信噪比即为 $10\log(S/D)$ 。测得图4(a)左侧背景方框图内的标准差 $D_1=0.0083$,右侧感兴趣区域的平均强度 $S_1=0.2670$,信噪比 $R_{SN}=15.07\ \text{dB}$ 。同理,图4(c)标准差 $D_2=0.0069$,平均强度 $S_2=1.2667$,信噪比 $R_{SN}=22.6\ \text{dB}$ 。结果表明,与直接测量相比,采用平衡探测的方法在提高信号强度的同时,噪声并没有成比例增加,反而减小,证明热噪声等与光强无关的噪声得到了抑制。

胃黏膜表面遍布着不规则的点状或线状的细小凹陷称为胃小凹,是胃腺开口的地方^[23]。图5为测得的离体猪胃小凹图像,平均强度为0.2807,噪声标准差为0.0055,信噪比为17.08 dB。与上述洋葱样品探测结果对比可以发现,采用平衡探测时,信号光强度减小,噪声相应地减小,表明经过平衡探测后,噪声中主要存在与光强相关的散粒噪声和放大引入的噪声。由图可见圆点状和线状胃小凹。胃小凹不同的形态与病理组织学改变存在密切联系,有助于对萎缩,肠化生以及异型增生等常见胃黏膜病变的诊断^[24]。

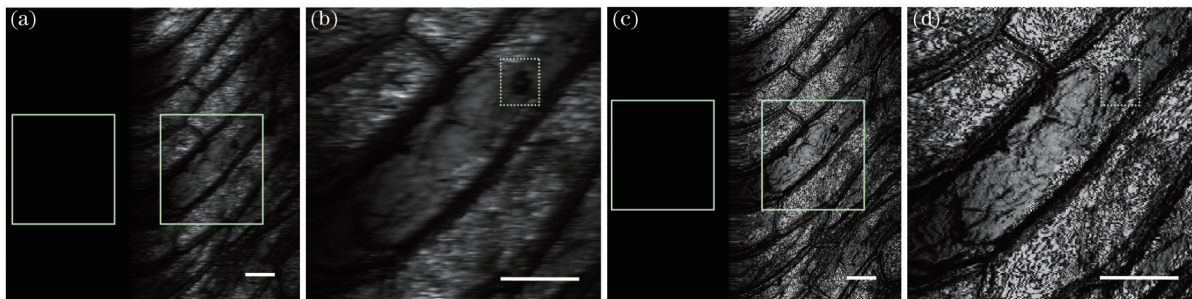


图4 洋葱细胞图像。(a)直接探测;(b)图4(a)中右侧方框放大图;(c)平衡探测;(d)图4(c)中右侧方框放大图。虚线框内为洋葱细胞核,比例尺为200 μm

Fig.4 Onion cell images. (a) Direct detection; (b) magnified image of the right solid box in Fig.4(a); (c) balanced detection; (d) magnified image of the right solid box in Fig. 4(c). The dotted box shows the nuclei of an onion cell, scale bar is 200 μm

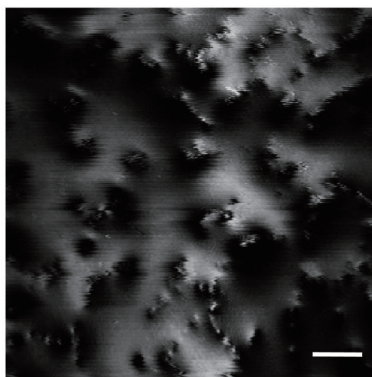


图5 离体猪胃小凹图像。比例尺为100 μm

Fig.5 Image of swine gastric pits *in vitro*. Scale bar is 100 μm

4 结 论

频谱编码成像技术具有快速内窥成像能力,在临床医疗诊断中具有重要的应用前景。搭建了基于50 kHz扫频光源的快速频谱编码显微结构,采用平衡探测的方法获得生物组织信息。结果表明,采用平衡探测的方法可以有效滤除部分噪声,提高实际成像分辨率和信噪比。对猪胃的离体切片进行显微成像,可以看到胃小凹组织,证明了该技术在生物消化道成像的可行性。下一步工作是将频谱编码制成内窥探头应用于临床实验。

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 Zhang Xianling, Gao Wanrong, Chen Chaoliang, *et al.*. Extraction and compensation for depth-resolved phase error in spectral domain optical coherence tomography [J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(2): 0204002.
张仙玲, 高万荣, 陈朝良, 等. 谱域光学相干层析成像中深度分辨相位误差提取及补偿[J]. 中国激光, 2014, 41(2): 0204002.
- 4 Bian Haiyi, Gao Wanrong, Zhang Xianling, *et al.*. Reconstruction method based on the detected matrix for spectral-domain optical coherence tomography [J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(2): 0211003.
卜海溢, 高万荣, 张仙玲, 等. 基于观察矩阵的频域光学相干层析成像图像重构算法[J]. 光学学报, 2014, 34(2): 0211003.
- 5 Zhu Yue, Gao Wanrong. High-resolution full-field optical coherence tomography for biological tissue [J]. Chinese J Lasers, 2014,

- 41(8): 0804002.
朱 越, 高万荣. 全场高分辨生物组织光学层析成像[J]. 中国激光, 2014, 41(8): 0804002.
- 6 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: 127-136.
- 7 D Yelin, B E Bouma, G J Tearney. Volumetric sub-surface imaging using spectrally encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2008, 16(3): 1748-1757.
- 8 L Golan, D Yeheskely-Hayon, L Minai, *et al.*. Noninvasive imaging of flowing blood cells using label-free spectrally encoded flow cytometry [J]. *Biomed Opt Express*, 2012, 3(6): 1455-1464.
- 9 L Golan, D Yeheskely-Hayon, L Minai, *et al.*. High-speed interferometric spectrally encoded flow cytometry [J]. *Opt Lett*, 2012, 37(24): 5154-5156.
- 10 D Yelin, B E Bouma, J J Rosowsky, *et al.*. Doppler imaging using spectrally-encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2008, 16(19): 14836-14844.
- 11 M Strupler, E D Montigny, D Morneau, *et al.*. Rapid spectrally encoded fluorescence imaging using a wavelength-swept source [J]. *Opt Lett*, 2010, 35(11): 1737-1739.
- 12 D K Kang, D Yelin, B E Bouma, *et al.*. Spectrally-encoded color imaging [J]. *Opt Express*, 2009, 17(17): 15239-15247.
- 13 D Yelin, I Rizvi, W M White, *et al.*. Three-dimensional miniature endoscopy [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 765-765.
- 14 G J Tearney, M Shishkov, B E Bouma. Spectrally encoded miniature endoscopy [J]. *Opt Lett*, 2002, 27(6): 412-414.
- 15 G Engel, H Genish, M Rosenbluh, *et al.*. Dual-channel spectrally encoded endoscopic probe [J]. *Biomed Opt Express*, 2012, 3(8): 1855-1864.
- 16 S C Schlachter, D K Kang, M J Gora, *et al.*. Spectrally encoded confocal microscopy of esophageal tissues at 100 kHz line rate [J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4(9): 1636-1645.
- 17 V Becker, T Vercauteren, C H von Weyhern, *et al.*. High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video) [J]. *Gastrointest Endosc*, 2007, 66(5): 1001-1007.
- 18 D Yelin, C Boudoux, B E Bouma, *et al.*. Large area confocal microscopy [J]. *Opt Lett*, 2007, 32(9): 1102-1104.
- 19 Chen Minghui, Ding Zhihua, Tao Yuanhao, *et al.*. Development of broad-band high-speed linearized swept laser source [J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(2): 0204001.
陈明惠, 丁志华, 陶渊浩, 等. 宽带快速线性扫频激光光源的研制[J]. 中国激光, 2011, 38(2): 0204001.
- 20 M Merman, A Abramov, D Yelin. Theoretical analysis of spectrally encoded endoscopy [J]. *Opt Express*, 2009, 17(26): 24045-24059.
- 21 Liao Jiuling, Gao Wanrong, Fang Qiaoran. Spectrally encoded endoscopic imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(6): 0611004.
廖九零, 高万荣, 方俏然. 频谱编码内窥成像技术[J]. 光学学报, 2014, 34(6): 0611004.
- 22 Wang Chunhui, Gao Long, Pang Yajun, *et al.*. Experiment investigation for relation between beam splitter coefficient and signal-to-noise ratio of 2 μm balanced coherent system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(11): 1104002.
王春晖, 高 龙, 庞亚军, 等. 光束分束比对 2 μm 平衡式相干探测系统信噪比影响的实验研究[J]. 光学学报, 2011, 31(11): 1104002.
- 23 K Tanaka, H Toyoda, S Kadowaki, *et al.*. Surface pattern classification by enhanced-magnification endoscopy for identifying early gastric cancers [J]. *Gastrointest Endosc*, 2008, 67(3): 430-437.
- 24 Huang Yonghui, Zhou Liya, Lin Sanren, *et al.*. Magnifying endoscopic classification of gastric pits and their clinicopathological significance [J]. *China Journal of Endoscopy*, 2004, 10(3): 14-16.
黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 等. 放大内镜下胃小凹形态学分类及其临床病理意义[J]. 中国内镜杂志, 2004, 10(3): 14-16.

栏目编辑: 吴秀娟