

小型光谱编码显微成像系统的研制

廖九零, 高万荣

南京理工大学电光学院光学工程系, 江苏 南京 210094

摘要 光谱编码显微镜使用一个衍射光栅和光谱分析装置来获得显微图像。样品上不同的位置被不同的波长照明,通过对反射光光谱进行解码来得到空间信息。研制了一个基于扫频光源和平衡探测器的小型光谱编码显微镜(CSEM)。在没有放大器的情况下,一个固定增益的平衡探测器被用来探测较弱的样品光。通过对一个1951USAF分辨率测试靶成像来测量系统的横向分辨率。对离体猪小肠组织和在体手指皮肤成像来验证生物组织成像性能。结果表明,CSEM具有对生物组织深度分辨成像的能力。

关键词 显微; 生物光学; 成像系统; 显微成像

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0518001

Development of Compact Spectrally Encoded Microscopy Imaging System

Liao Jiuling, Gao Wanrong

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

Abstract Spectrally encoded microscopy uses a diffraction grating and a spectrum analysis setup to obtain microscopic images. The different positions on the sample are illuminated by different wavelengths. Then the spatial information is obtained by decoding the spectrum of reflection light. In this paper, a compact spectrally encoded microscopy (CSEM) is developed based on a swept source and a balanced detection. A fixed gain balanced detector is employed in the system to detect the weak sample light without amplifier. The lateral resolution of the system is measured by imaging a 1951USAF resolution test target. The imagings of excised swine small intestine and the finger skin in vivo are obtained to verify the imaging performance of biological tissue. The results show that the CSEM has the capability of generating depth-resolved imaging of biological tissue.

Key words microscopy; biotechnology; imaging system; micrography

OCIS codes 180.1655; 170.3880; 110.0180; 170.1790; 300.6170

1 引 言

在光谱编码显微镜(SEM)中,准直后的宽带激光照射到衍射光栅上,准直光中不同波长被光栅衍射后以不同角度聚焦到样品上形成一条条线,即不同波长对应着线照明的不同位置^[1]。从样品反射回来的光沿着照射光路原路返回,然后耦合进光谱分析仪。对于连续光源,光谱分析仪通常由衍射光栅,聚焦透镜和高速电荷耦合器件(CCD)组成。对于扫频光源,通常采用的是光电探测器^[2]。空间信息可以通过对反射光光谱解码获得,这样无需在探头远端进行扫描就可以得到线图像。通过对光谱编码线的慢速扫描,SEM可以很容易地获得二维平面图像。在SEM中,深度信息可以像共焦显微镜一样通过聚焦到不同深度来获得^[3]。由于光纤纤芯直径小,光纤可以将离焦位置的光滤除,类似于传统共焦显微镜小孔的作用。由于不需要全范围内的机械扫描,SEM相比于传统的共焦显微镜具有结构简单、速度快的优点,适合做成内窥探头应用^[4]。

收稿日期: 2016-12-01; **收到修改稿日期:** 2017-01-11

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,主要从事生物医学光学方面的研究。

E-mail: wgao@njust.edu.cn(通信联系人)

最近十多年来,已经有许多关于 SEM 应用于不同领域的报道, Elhanan 等^[5-7]在内窥镜设计和血流测量方面都取得了重要成果。Tearney 研究组证明了 SEM 对消化道组织^[8]和乳腺癌组织^[9]所成图像与组织病理学图像相似,预言 SEM 也许可以用于肿瘤切除手术术中指导。现在 SEM 探头直径可以小至 0.5 mm^[10],若改进为前向探测的内窥探头,直径也仅为 1.8 mm^[11]。但由于应用场景的不同,SEM 制成的内窥探头尺寸不一样。对于消化道成像应用,内窥探头可以以相对较大的直径进行制造。2007 年, Yelin 等^[12]制造了一台长为 2.5 cm,直径为 2.0 cm 的探头装置,证明了 SEM 的方法比传统共焦显微的方式成像范围大。2011 年, Kang 等^[3]提出了一个类似的探头结构,采用压电陶瓷控制物镜在深度处位置实现自适应聚焦,使之聚焦到特定深度以消除样品抖动导致聚焦深度变化的影响。2013 年, Kang 等^[13]设计了一套直径为 5.85 mm,长度为 30 mm 的探头,对比了测试臂采用单模光纤探测方式和多模光纤探测方式的成像性能差异。

本文设计了一个基于扫频光源的小型光谱编码成像系统(CSEM)。在没有放大器的情况下,用一个固定增益的平衡探测器来测量微弱的样品光^[14]。通过对 1951USAF 分辨率测试靶,对离体猪消化道组织和在体人类皮肤组织进行成像来测试系统性能。

2 系统结构及分辨率

2.1 实验装置

图 1 为 CSEM 装置示意图, CIR 是环形器, CL 是准直器, G 是光栅, OL 是物镜, TS 是位移台, BD 是平衡探测器, DAQ 是数据采集系统, PC 是计算机。一个高速扫频光源(中心波长 $\lambda_0 = 1302.5$ nm, 带宽 $\Delta\lambda = 106$ nm, Axsun Technologies) 作为宽带光源被应用于系统中。扫频速度为 50 kHz, 占空比为 43%。输出激光被耦合进光纤型环形器(CIR-1310-50-APC, Thorlabs)的输入端。从环形器端口 2 发出的光由一个准直器(CL, $f = 11$ mm, CFC-11X-C, Thorlabs)准直。准直后的小尺寸准直光以入射角 θ_i 照射到一个透射式光栅上($G = 1145$ line/mm, Wasatch Photonics), 以衍射角 θ_d 照射到一个非球面镜($f_o = 8$ mm, $NA = 0.5$, A240TM-C, Thorlabs)后聚焦到样品上形成线照明。为了获得另一维的样品信息, 采用一个线性位移台对样品进行扫描。

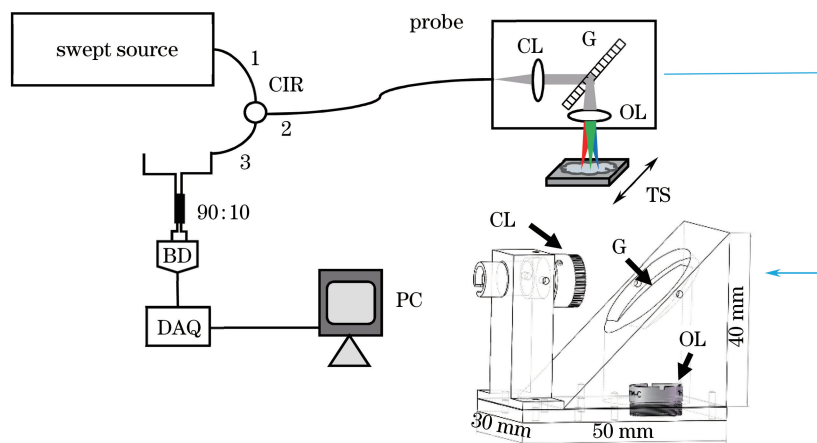


图 1 SEM 原理图

Fig. 1 Schematic diagram of SEM

样品的后向散射光被环形器收集,为了获得更高质量的图像,从环形器端口 3 出来的光耦合进 90:10 的光纤耦合器。90%的光耦合进平衡探测器(PDB410C, Thorlabs)的 input+ 端口,剩下的 10%耦合进该探测器的 input- 端口。平衡探测器含有两个相互匹配的平衡光电二极管,可以实现出色的共模抑制比从而降低噪声,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,从而提高信噪比。

2.2 探头结构

探头是将波长对横向位置进行编码的主要部件。所用探头主要由三个支架部分组成:准直器支架,光栅

支架和物镜支架(如图 1 右下角所示)。从光纤芯发出的离散光被准直成一个小直径光束(理论直径为 $D = 2.1 \text{ mm}$),然后准直光以入射角 θ_i 照射到衍射光栅上。为了达到最大衍射效率, θ_i 被设定为利特罗角。根据利特罗方程, $2\sin \theta_i = \lambda G$, $\theta_i = 48.2^\circ$ 。所以,光栅被放置在与光轴垂直方向约 48° 的镂空的三角铝块上。以 θ_d 衍射的光经过一个非球面透镜($f_o = 8 \text{ mm}$, $NA = 0.5$)聚焦到样品上。这个物镜装在一块具有透光孔的薄铝板上。准直器支架和光栅支架都通过螺丝固定在铝板上。由于本实验系统中所使用的光栅是购买的量产产品,直径为 2.54 cm ,所以整个探头的尺寸为 50 mm (长) $\times 30 \text{ mm}$ (宽) $\times 40 \text{ mm}$ (高)。未来将光栅切割成很小直径后,整个探头的尺寸可以大大降低。

2.3 分辨率

在 SEM 中,每个波长的衍射角可以表示为

$$\sin \theta_i + \sin \theta_d = m\lambda G, \quad (1)$$

式中 m 表示衍射级次。通常光栅都被设计成只在一级衍射下达到很高的衍射效率,此外,作为一种透射式成像方式,采用利特罗结构也可以使得衍射效率最大化。如 2.2 节所述,本实验系统采用的利特罗角为 48.2° 。

沿光谱线方向的视场可以表示为:

$$F_{OV} = 2f_o \tan\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right), \quad (2)$$

式中 $\Delta\theta$ 是准直光被光栅衍射后的角度发散范围。通过对(1)式求导,发散角范围可以表示为^[2]

$$\Delta\theta = \frac{G}{\cos \theta_d} \Delta\lambda. \quad (3)$$

由光栅决定的光谱分辨率为

$$\delta\lambda_G = \frac{\lambda_0 \cos \theta_i}{DG}. \quad (4)$$

因此,可分辨的光谱点数可以表示为

$$n = \frac{\Delta\lambda}{\delta\lambda_G} = \frac{\Delta\lambda}{\lambda_0 \cos \theta_i} DG. \quad (5)$$

在通光孔径全部被填充的情况下,非球面物镜的数值孔径(NA)设定为 0.5。准直光被光栅衍射后发散,虽然衍射光充满了物镜后焦面的大部分,但是对于每个波长来说等效 NA 还是很小,因为每个波长衍射后直径并未扩大。此系统的等效 NA 为 0.131 [$NA = D/(2f_o)$]。在传统共焦显微镜中,横向分辨率 δx 可以按照 $0.51\lambda/NA$ 计算。一般情况下,在 SEM 中横向分辨率由有效的光谱分辨率决定,因为由共焦决定的分辨率会更好。在 SEM 中,不同波长的光被聚焦到横向不同位置,因此横向分辨率等于相邻波长焦点之间的间隔,可分辨光谱点数和横向可分辨点数是相等的。因此横向分辨率可以表示为

$$\delta x = \frac{F_{OV}}{n}. \quad (6)$$

将实验装置的参数代入(6)式可以得到,理论 F_{OV} 为 1.45 mm ,由共焦决定的横向分辨率为 $5.32 \mu\text{m}$,由光谱分辨率决定的横向分辨率为 $4.9 \mu\text{m}$ 。

根据参考文献[15],轴向分辨率可以表示为

$$\Delta z = \frac{\lambda}{n(1 - \cos \alpha)}, \quad (7)$$

式中 n 表示浸润介质的折射率, $\alpha = \arcsin(NA/n)$ 表示物镜孔径角。代入等效 NA 后,理论轴向分辨率的半峰全宽为 $150 \mu\text{m}$ 。

3 实验结果

3.1 横向分辨率和视场

为了测量 CSEM 的成像性能,一块 1951USAF 分辨率测试靶首先被用来成像。如图 2 所示,第 7 组第 1 个元素(线宽为 $3.9 \mu\text{m}$)被清楚地分辨开来。横向分辨率由线扩展函数(LSF)的半峰全宽测得。线扩展函数的半峰全宽由第 4 组第 1 个元素的强度分布的一阶微分来计算得到。测得沿编码线方向和运动方向的横向

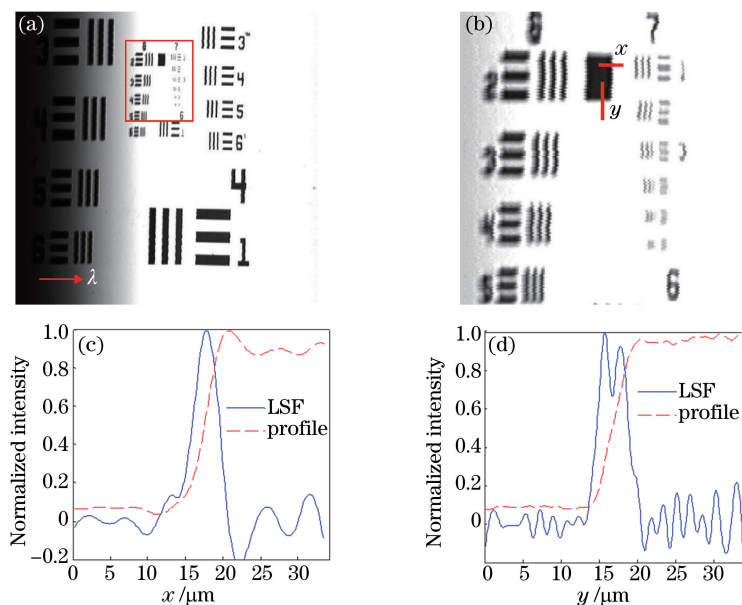


图 2 (a) 由 CSEM 探测得到的 USAF1951 分辨率板图像; (b) 图 2(a)中红色方框处的放大图像;
(c)、(d) 分别是图 2(b)中红线处强度分布和 LSF 图

Fig. 2 (a) Image of a USAF1951 resolution target detected by CSEM; (b) magnification image of red box in Fig. 2 (a);
(c) and (d) are profile intensity distributions and their LSFs along red lines in Fig. 2(b)

分辨率分别为 $3.63 \mu\text{m}$ 和 $4.24 \mu\text{m}$ 。

对 100 line/mm 的反射式光栅进行成像,测得视场为 1.46 mm 。图 3 所示的是轴向响应曲线,此曲线通过在焦平面附近轴向移动一个反射镜,测量反射光强获得。测得的轴向响应曲线的半峰全宽为 $130 \mu\text{m}$,即为轴向分辨率。

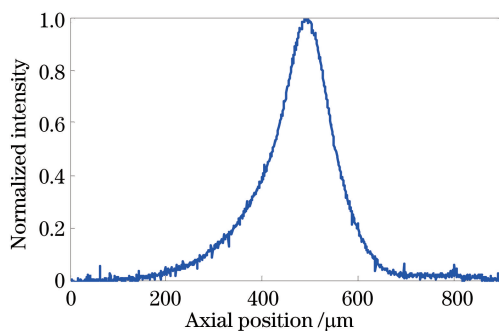


图 3 轴向响应曲线

Fig. 3 Axial response curve

3.2 组织成像

为了测试组织成像性能,一小块离体猪小肠组织被用于成像。该新鲜的小肠组织没有进行醋酸处理直接成像,其结果如图 4 所示,图 4 中的比例尺为 $100 \mu\text{m}$ 。在图 4 (a)中,具有不同尺寸的小肠腺体清晰可见。图 4 (b)是图 4(a)中红色方框区域的放大图,箭头表示小肠腺,可见在这个小区域内,腺体尺寸接近,分布比较随机。图 5 所示的是在表面以下、以 $100 \mu\text{m}$ 为间隔的不同深度区域的图像,图 5 中的比例尺为 $200 \mu\text{m}$ 。对比图中白色方框区域可以发现,随着深度的增加,小肠腺的腔体在膨胀。图 5 中的箭头也表示小肠腺,这些小肠腺从特定深度才开始出现并随着深度增加腔体发生膨胀,符合小肠腺是随机分布在一定深度范围内的规律。

为了测试在活体组织下的成像性能,对人的手指进行了成像,如图 6 所示,图 6(b)的比例尺为 $100 \mu\text{m}$ 。该实验结果是在没有任何手指固定装置下获得的,由图 6 (b)可以看到,手指背部表面的纹理清晰可见。

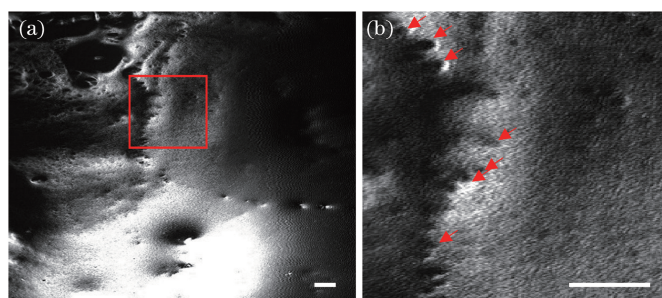


图 4 (a) 离体猪小肠组织图像; (b) 图 4(a)中方框放大图

Fig. 4 (a) Image of an excised swine small intestine tissue; (b) magnification image of box region in Fig. 4 (a)

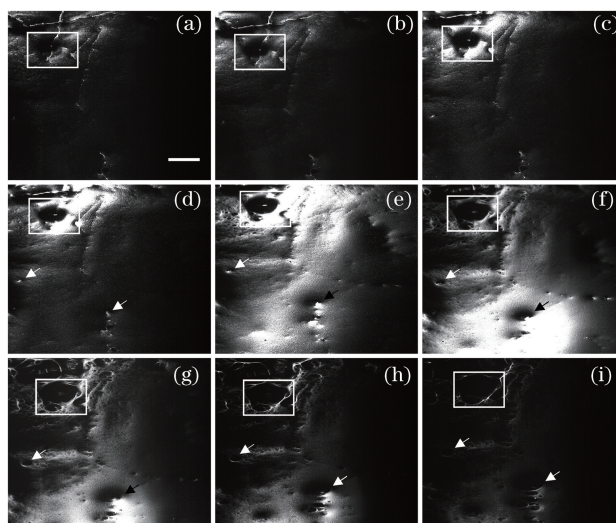


图 5 深度间隔为 $100\ \mu\text{m}$ 连续获得的猪小肠组织图像

Fig. 5 Images of a swine small intestine tissue obtained at successive depths with interval of $100\ \mu\text{m}$

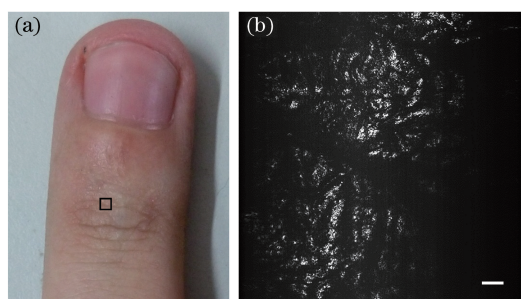


图 6 (a) 志愿者手指照片; (b) 由 CSEM 获得的图 6(a)中方框区域的放大图像

Fig. 6 (a) Photograph of a volunteer's finger; (b) magnification image of box region in Fig. 6(a) obtained by CSEM

4 讨 论

设计了一个具有高分辨率,可对生物组织深度成像的紧凑型光谱编码内窥显微镜。实验测得沿光谱编码线方向视场为 $1.46\ \text{mm}$,由光谱编码所确定的横向分辨率和纵向分辨率分别为 $3.63\ \mu\text{m}$ 和 $130\ \mu\text{m}$ 。该系统提供了一种无需醋酸处理即可获得高对比度小肠组织图像的方法。这些生物组织的成像结果证明了采用这个装置获得不同深度信息的可行性。

对比理论值和实际测得值,可以发现实际分辨率结果比理论值更好,而视场与理论值吻合。根据(2), (3)式可知,视场与光斑直径无关,根据分辨率公式(4), (5), (7)式可知,横向分辨率和纵向分辨率都与准直光斑直径有关。随着直径的增加,横向分辨率和纵向分辨率都变小。例如,当光斑直径为 $3\ \text{mm}$ 时,横向分

分辨率和纵向分辨率分别为 $3.42\ \mu\text{m}$ 和 $73\ \mu\text{m}$, 所以可以合理推测从可调聚焦直器出射的准直光直径不止 $2.1\ \text{mm}$ 。

光源的扫频速度可以实现 $50000\ \text{line/s}$ 的采集速度, 此速度能够在很短时间内获得面积较大的组织图像。但是, 结果表明实际采集速度比光源的最大重复率慢。CSEM 的采集程序是基于 LabVIEW 平台进行编码的, 采用扫描光源的扫频触发信号作为采集程序的外部触发信号。每条光谱编码线内的每个点可以被高达 $100\ \text{MHz}$ 的采集速度进行采集, 但是每秒钟获得的光谱编码线的数量达不到 50000 。这种触发速度和采集速度不匹配的原因可能是相邻两个触发信号在采集卡上响应时间间隔太长。当一次采集结束的时候, 采集软件初始化时间太长导致中间触发信号丢失。光谱方向和运动方向的分辨率的差别也表明了沿着运动方向的数据采集存在欠采样现象。为了得到更好的图像, 必须提高成像速度, 成像速度可以通过替换更高速度的采集卡或者优化采集程序来提高。

CSEM 所用的光电探测器是一个由两个超低噪声互阻抗的光电二极管组成的平衡探测器, 该探测器采集速度达到 $100\ \text{MHz}$, 能够满足高速采样的要求。相比于传统的采用单点探测的 SEM 探测方式, 平衡探测器主要有两个优点: 一个是能够抑制共模噪声和热噪声, 获得更好的分辨率; 另一个是能够放大信号强度, 对于生物组织反射式成像特别有帮助。通过利用高转换增益的平衡探测器, 在没有后置放大器的情况下, 微弱的样品反射光也能被探测到。

5 结 论

设计了一套基于 $50\ \text{kHz}$ 扫频光源的小型光谱编码显微成像系统, 该系统结构简单紧凑, 通过对离体猪小肠组织和在体手指皮肤成像来验证生物组织成像性能。结果表明, 采用 CSEM 具有对生物组织实现深度分辨成像的能力。由于小型光谱编码结构中采用的是现成的光栅, 尺寸较大, 而微小的内窥探头有助于减小病人的痛苦, 接下来可以将该装置的尺寸进一步缩小以适应消化道的内窥应用。

参 考 文 献

- [1] Tearney G J, Webb R H, Bouma B E. Spectrally encoded confocal microscopy[J]. Optics Letters, 1998, 23(15): 1152-1154.
- [2] Boudoux C, Yun S, Oh W, *et al.* Rapid wavelength-swept spectrally encoded confocal microscopy[J]. Optics Express, 2005, 13(20): 8214-8221.
- [3] Kang D, Yoo H, Jillella P, *et al.* Comprehensive volumetric confocal microscopy with adaptive focusing [J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(6): 1412-1422.
- [4] 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.
- [5] Elhanan T, Yelin D. Measuring blood velocity using correlative spectrally encoded flow cytometry[J]. Optics Letters, 2014, 39(15): 4424-4426.
- [6] Zeidan A, Yelin D. Reflectance confocal microscopy of red blood cells: simulation and experiment [J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(11): 4335-4343.
- [7] Tabatabaei N, Kang D, Wu T, *et al.* Tethered confocal endomicroscopy capsule for diagnosis and monitoring of eosinophilic esophagitis[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(1): 197-207.
- [8] Kang D, Suter M J, Boudoux C, *et al.* Comprehensive imaging of gastroesophageal biopsy samples by spectrally encoded confocal microscopy[J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2010, 71(1): 35-43.
- [9] Brachtel E F, Johnson N B, Huck A E, *et al.* Spectrally encoded confocal microscopy for diagnosing breast cancer in excision and margin specimens[J]. Laboratory Investigation, 2016, 96(4): 459-467.
- [10] Kang D, Martinez R V, Whitesides G M, *et al.* Miniature grating for spectrally-encoded endoscopy[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(9): 1810-1816.
- [11] Zeidan A, Yelin D. Spectral imaging using forward-viewing spectrally encoded endoscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(2): 392-398.
- [12] Yelin D, Boudoux C, Bouma B E, *et al.* Large area confocal microscopy[J]. Optics Letters. 2007, 32(9): 1102-1104.

- [13] Kang D, Carruth R W, Kim M, *et al.* Endoscopic probe optics for spectrally encoded confocal microscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2013, 4(10): 1925-1935.
- [14] Liao Jiuling, Gao Wanrong. A method of improving signal-to-noise ratio in spectrally encoded microscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(3): 0317001.
廖九零, 高万荣. 一种提高频谱编码成像技术信噪比的方法 [J]. 光学学报, 2015, 35(3): 0317001.
- [15] Pawley J B. Handbook of biological confocal microscopy [M]. New York: Springer Science+Media Business, 2006: 985.