

doi:10.3788/gzxb20174611.1130001

# 一种多波段光源的显微多光谱成像系统研究

廖乘胜, 曾立波, 吴琼水

(武汉大学 电子信息学院, 武汉 430079)

**摘 要:**复合染色方法可以解决传统宫颈癌联合筛查无法在同一张涂片上实现的问题。针对复合染色带来的 DNA 吸光度干扰和色彩还原失真等问题, 本文建立了一套多波段光源的显微光谱成像系统。组合光源的设计兼顾彩色图像的还原和吸光度模型的建立, 采用多元线性回归法建立多光谱剥离模型, 利用该模型从混叠的多光谱图像中剥离出福尔根染料真实吸光度用于 DNA 定量分析, 同时合成符合医生诊断习惯和要求的伪彩色图像。实验结果表明: 选用的四个波段的光源的带宽为 12 nm/12 nm/14 nm/19 nm, 是符合要求的窄带单色光; 以显微测微尺为标尺, 以原光源测量参数为标准, 测得组合光源的光斑偏移量最大不超过 3 个刻度, 其平行度和同轴度满足成像系统要求; 合成的伪彩色图像颜色明亮饱满、背景干净, 不会对阅片医生诊断造成干扰和障碍; 吸光度剥离模型可以成功将福尔根染料真实吸光度剥离出, 能够准确计算 DNA 含量。选用小鼠肝脏涂片作为测量标本, 测量计算的 DI 值符合肝细胞多倍体性的特点; 选择宫颈阳性样本进行对比实验, 两种方法测得的二倍体细胞和四倍体细胞 DI 值相吻合。本系统具有较高的准确性和可靠性。

**关键词:**多光谱成像; 复合染色; 多波段光源; DNA 定量分析; 多光谱图像剥离

中图分类号: TP391

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2017)11-1130001-10

## Research of a Microscopic Spectral Imaging System with Multi-band Illuminants

LIAO Cheng-sheng, ZENG Li-bo, WU Qiong-shui

(School of Electronic Information, Wuhan University, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** Compound staining method can solve the problem that traditional combination screening of cervical cancer can not be carried out on the same smear. In view of the problems of DNA absorbance interference and color restoration distortion caused by compound staining, a microscopic spectral imaging system with multi-band illuminants was established in this paper. The design of composite illuminants gave consideration to both the restoration of color image and the establishment of absorbance model, multi-spectral unmixing model were constructed by multiple linear regression method, and by using this model Feulgen's real absorbance were unmixed from the mixing multi-spectral images for DNA quantitative analysis, and pseudo color images were also composed to meet the doctors' requirements and habits at the same time. Experimental results show that: the Full Width at Half Maximum (FWHM) of the closed four-band illuminants were 12 nm/12 nm/14 nm/19 nm, and they were satisfactory narrowband monochromatic lights; The measured maximum offset of spot does not exceed 3 scale by using a microscope micrometer as a ruler and the original illuminant as a standard, so parallelism and coaxiality of the composite illuminants met the requirements of imaging system; The synthesis pseudo color images were bright and full, and have clean background, they will not cause interference and obstacles to doctor's diagnosis. The absorbance unmixing model can successfully unmixing the real absorbance of

**基金项目:** 国家科技支撑计划课题(No.2011BAF02B02)和中国石油科技创新基金(No.2012D-5006-0102)资助

**第一作者:** 廖乘胜(1984—), 男, 博士研究生, 主要研究方向为光谱成像, 光谱仪器. Email: 18627999389@163.com

**导 师:** 曾立波(1963—), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为显微光谱成像、图像分析等领域. Email: lbzeng@whu.edu.cn

**通讯作者:** 吴琼水(1977—), 男, 副教授, 博士, 主要研究方向为光谱学与光谱分析. Email: qswu@whu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-06-27; **录用日期:** 2017-07-31

<http://www.photon.ac.cn>

feulgen and accurately calculate the content of DNA; The liver smear of mice was used as the measuring specimen and the calculated DNA index (DI) values accorded with the polyploidy of liver cells; In contrast experiments using a cervical positive sample, the DI values of the diploid and tetraploid cells calculated by the two methods were almost equal, therefore, this method has higher accuracy and reliability.

**Key words:** Multi-spectral imaging; Compound staining; Multi-band illuminants; Quantitative analysis of DNA; Multi-spectral image unmixing model

**OCIS Codes:** 100.0100; 100.2000; 110.0110; 110.4234

## 0 引言

宫颈癌是妇科高发的恶性肿瘤之一,对宫颈癌及癌变的早期诊断是提高宫颈癌治愈率及生存率的关键<sup>[1]</sup>.目前我国最常用的宫颈癌筛查方法是贝塞斯达诊断系统(The Bethesda System, TBS)分类法,癌症早期诊断需要从上万个细胞中挑选少数几个癌变的细胞,这种方法需要医生进行长时间人工阅片筛查,极大的增加医生的工作强度和人为误差<sup>[2-3]</sup>.用细胞脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid, DNA)图像定量分析诊断法进行宫颈癌前病变的诊断已有大量报道,在北美及欧洲细胞 DNA 图像定量分析诊断方法已作为一种常规临床检测方法之一.在国内,许多大城市也开始用全自动 DNA 定量分析系统进行宫颈癌筛查<sup>[4]</sup>.研究表明, TBS 检查联合宫颈细胞 DNA 定量分析检查能明显提高检出率,具有筛查结果准确、高效、实用等优点,有较好的临床应用价值<sup>[5]</sup>.

目前, TBS 检查与细胞 DNA 定量分析联合筛查分别在不同的涂片上进行的<sup>[6]</sup>.通常情况下是一次取材,同时制备两张涂片,一张进行巴氏染色并用 TBS 分类法诊断,一张进行福尔根染色以细胞 DNA 定量分析技术检测.然而医生对结果的判定只能依据两张玻片的整体诊断结果,而不是对同一个细胞用两种诊断方法进行一一对应地判定,其结果是造成判定失误和效率低下.两张涂片取材于同一病人,理论上诊断结果具有一致性,实际应用也对此进行了验证,联合筛查的敏感性和特异性较单一筛查方法均有提升.但若对同一细胞进行两种分析方法同时判定,诊断结果则会更具参考和准确性,也会带来效率的提升,因此本文采用在同一张细胞涂片上同时使用以上两种筛查方法的解决方案.这种方法仅需一次取材,制备一张涂片,然后对细胞核进行福尔根染色,对细胞质进行巴氏染色,两种染色方法作用于同一细胞,这样既可以进行 DNA 定量分析诊断,也可以进行细胞形态分析做 TBS 分类诊断,且两种诊断方法对同一细胞具有一一对应的关系,方便医生做出准确判断,提高效率.

医生依据细胞的颜色和纹理等特征对细胞进行 TBS 检查,颜色和轮廓的失真会对医生的判读带来障碍,而对于 DNA 诊断方法,复合染色则会干扰 DNA 吸光度,为解决这些问题,本文建立了一套多波段光源的显微光谱成像系统,光源的设计兼顾了彩色图像的还原和吸光度模型的建立,以多元线性回归的方法建立多光谱剥离模型,通过剥离 DNA 物质对单色光的响应,用于细胞 DNA 定量分析,同时合成符合医生诊断习惯和要求的伪彩色图像.

## 1 原理

### 1.1 DNA 定量分析原理

通过测定细胞内 DNA 含量实现细胞 DNA 定量分析,根据 Lambert-Beer 定律,吸光度正比与物质的含量,物质的含量越多,吸收光越多,光的透射越低,其表达式为

$$A = -\lg \frac{I}{I_0} = \epsilon b C \quad (1)$$

式中,  $I_0$  为波长为  $\lambda$  的平行、均匀入射光束强度;  $I$  是透过目标后的透射光束强度;  $A$  为吸光度;  $\epsilon$  为待测组分的摩尔吸光系数;  $b$  为光程;  $C$  为待测组分的物质的量浓度.细胞 DNA 定量分析方法一般采用相对测量的策略.假设正常细胞的组织涂片的透射光束强度为  $I_n$ ,正常细胞的 DNA 的量浓度为  $C_n$ ,正常细胞的 DNA 的吸光度为  $A_n$ ,待测细胞涂片的透射光束强度为  $I_d$ ,待测细胞的 DNA 的量浓度为  $C_d$ ,待测细胞的 DNA 的吸光度为  $A_d$ ,对于相同的测试系统有相同的入射光束强度  $I_0$  和相同的光程  $b$ ,而相同的检测物质有相同的摩尔吸光系数  $\epsilon$ ,那么根据 Lambert-Beer 定律有

$$\begin{cases} A_n = -\lg \frac{I_n}{I_0} = \epsilon b C_n \\ A_d = -\lg \frac{I_d}{I_0} = \epsilon b C_d \end{cases} \quad (2)$$

将式(2)中的两个等式进行变换有

$$DI = \frac{C_d}{C_n} = \frac{A_d}{A_n} = \frac{\lg(I_d/I_0)}{\lg(I_n/I_0)} \quad (3)$$

式(3)中DI是DNA指数,也是表征癌变程度的医学参数,其表达式为 $DI=C_d/C_n$ ,正常细胞DI约为1,当细胞处于分裂期时其DI大约等于2,异常的癌变细胞的DI远大于2.5<sup>[7]</sup>.

### 1.2 DNA吸光度剥离模型

使用巴氏染色和福尔根染色的宫颈细胞涂片中 含有3种物质:伊红物质、亮绿物质和福尔根物质. 染料的吸收光谱曲线如附图1所示<sup>[8]</sup>.伊红、亮绿的 吸收光谱和福尔根染料的吸收光谱存在着重叠.传统 的DNA定量分析使用一个特定波段的单色光 (一般为570 nm),在此光谱段,复染时伊红、亮绿的 吸收同时叠加在福尔根的吸收光密度测量值上面, 因此无法正确测量细胞DNA含量.

根据光谱理论,细胞上任意一点的吸收光谱  $y(\lambda)$ 可以用线性加合数学模型表示

$$y = c_1 x_1 + c_2 x_2 + \dots + c_n x_n \quad (4)$$

式中: $y$ 表示复染染料的光谱矢量, $x_i (i=1, 2 \dots n)$

为单种纯染料的光谱,注意到不同的物质应具有不同的光谱矢量,所以 $x_i (i=1, 2 \dots n)$ 是相互线性无关的矢 量; $n$ 为染料种数, $c = (c_1, c_2, c_3 \dots c_n)$ 为未知待测参数,为染料的相对浓度.如果采用矩阵表示,式(4)可以改 写为

$$y = X \times c \quad (5)$$

式中: $X = [x_1, x_2, \dots x_n]$ ,可称为敏感度矩阵, $c = [c_1, c_2, \dots c_n]^T$ 为未知待估参数矢量,或称为待测浓度矢 量.根据多元线性回归方法求得式(5)中向量 $c$ 的最小二乘解为<sup>[9]</sup>

$$c = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (6)$$

令 $M = (X^T X)^{-1} X^T$ ( $X$ 代表矩阵, $X^T$ 代表将该矩阵转置, $X^{-1}$ 代表将该矩阵求逆)

式(6)表明:通过纯染料的光谱曲线图(1)可得到式(5)中的矩阵 $X$ ,然后计算出模型 $M$ .此后,用所有染 料复染待分析细胞,用多光谱成像系统测出它的吸光度图像 $y(\lambda)$ ,然后依据式(6)计算出各种染料的相对浓 度 $c$ ,代入式(4)计算每个分量 $c_n x_n$ 即为剥离的每种染料的吸光度,选取波长570 nm下计算福尔根染料的 吸光度则可以计算出细胞的DNA含量.

### 1.3 多波段光谱成像系统

针对本应用,可选择的光谱成像实现方法主要有三种:1)采用基于电声光原理的声光可调谐滤光器 (Acousto-optic Tunable Filter, AOTF)或基于偏振光干涉原理的液晶可调谐滤光器(Liquid Crystal Tunable Filter, LCTF)滤光,用电荷耦合器件(Charge Coupled Device, CCD)采集滤光后的图像.这类方法的 短板是电控滤光器件的不均匀性、杂散光以及低透过率对滤光影响较大,实现成本较高<sup>[10]</sup>.2)采用薄膜干涉 滤光片制成的电控滤光轮滤光,转动到不同的滤光片,用CCD采集滤光后不同波长的图像.该方法的缺点是 受滤光轮切换速度制约,成像速度较慢<sup>[11]</sup>.彩色图像传感器能利用多通道滤光片和Bayer彩色滤波阵列在一 帧图像中获得R、G和B三个波段的光谱图像<sup>[12]</sup>,该方法成本低,速度快,但对图像传感器的精度要求高,相 机的噪声容易引起测量误差.3)沿用推帚式成像光谱仪的原理,采用棱镜或光栅组合元件在后光学系统进行 光谱分光,利用高精度载物台自动装置驱动进行推扫成像<sup>[13]</sup>.优点是光谱分辨率较高,缺点是成像速度很 慢,成本很高,难以投入实际应用.

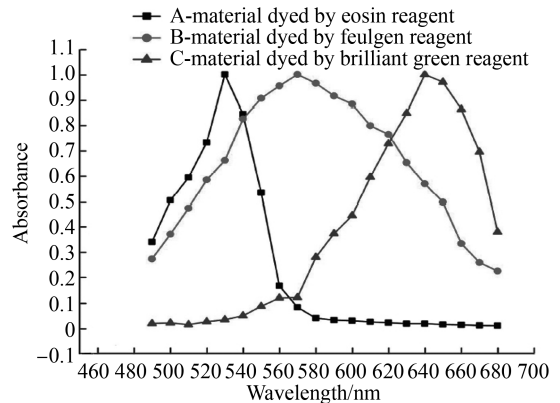


图1 三种染料的吸收光谱曲线

Fig.1 The absorbance curves of three kinds of materials

本文提出了一种多波段的光谱成像光源及成像方法,设计几组能发出离散单色光的组合光源,使用黑白图像传感器获取光谱图像,获取中心波长为 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、 $\dots$ 、 $\lambda_n$ 的 $n$ 个波段的多光谱图像的流程是:

1) 控制入射光发出 $\lambda_1$ 的窄带单色光,单色光经过显微成像光学系统后照射到图像传感器的感光阵列上,此时图像传感器得到中心波长为 $\lambda_1$ 的灰度图像。

2) 改变入射光的中心波长为 $\lambda_2$ ,图像传感器输出的图像就是 $\lambda_2$ 波段的灰度图像。

3) 重复步骤2)的过程,不同的是入射光中心波长依次从 $\lambda_3$ 改变为 $\lambda_n$ ,这样就依次获得了 $\lambda_3$ 波段到 $\lambda_n$ 波段的灰度图像。

这样, $n$ 个波段的灰度图像就组成了一组多光谱图像.这种多光谱成像方式具有光谱分辨率高、结构简单、具有低成本,快速成像,测量精度高的效果,非常适合在此应用。

## 2 系统设计

### 2.1 光源设计和成像方法

光源设计如图2所示,组合光源1能够发出一组离散单色光,经准直镜1准直后以 $45^\circ$ 角射向半透半反(50%透过50%反射)镜片,透射的光为有效光而反射的光被丢弃;在 $90^\circ$ 位置设置另一组合光源2,同样发出的第二组离散光经准直后射向半透半反镜,此时反射的光是有效的,透射的光则被丢弃.两组光源的有效光组合后经反射镜改变角度进入显微光谱成像系统,显微光谱成像系统的波段数由两组组合光源的波段数相加而来.组合光源采用阵列的方式设置多个波长不同的LED发光芯片,并且多个LED发光芯片之间采用并联的方式,可独立控制.采用半透半反镜尽管损失了50%的光能量,但因为LED发光强度很大,仍然能满足实际应用需要。

单色光的波长选取至关重要,不恰当的波段选取将导致极大的误差<sup>[14]</sup>,在这里组合光源1采用了蓝(460 nm)、绿(520 nm)、红(620 nm)三色集成的LED,波长准确度为5 nm.此三色和人眼视锥细胞感光对应,便于实现彩色成像,同时是窄带离散单色光,满足Lambert-Beer定律,有利于定量分析,此LED市场也有现成产品,易于购买.组合光源2则采用了570 nm的单色LED,因为福尔根染料在此波长上吸收很强,可提高计算精度。

多光谱成像的过程如下:根据待曝光的单色光数量,按照曝光的时序设定检测相机曝光周期,每个曝光周期中,针对每一种单色光设计对应曝光时段,一个曝光时段对应一种单色光,相邻两个曝光时段之间保留一时间间隔;单色光在曝光时段的起始点之前被点亮,并持续到曝光时段结束后被熄灭,相邻两种单色光的曝光时间不重叠.图3第一行表示相机曝光的时序,高电平表示相机在曝光.第二到四行表示各个LED(或半导体激光)点亮的时序,高电平表示LED被点亮发光.LED在相机曝光前被点亮,并持续点亮到相机曝光完成后才熄灭,此时相机曝光采集的图像是单色LED波长的一个光谱图像,随后立即被存储,循环进行四次点亮和曝光,存储的四个光谱图像共同形成了被观察样品的四波段光谱图像。

### 2.2 系统构成

图4为多波段光源的显微光谱成像系统结构示意图.该系统主要由显微镜及自动平台、组合光源和成像相机构成。

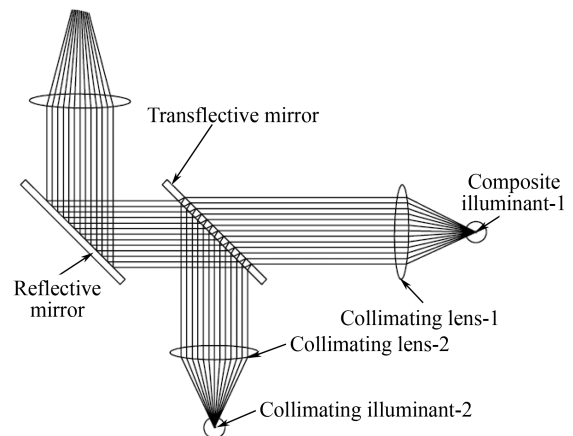


图2 多波段光源设计原理图

Fig.2 Schematic of multi-band illuminants' design

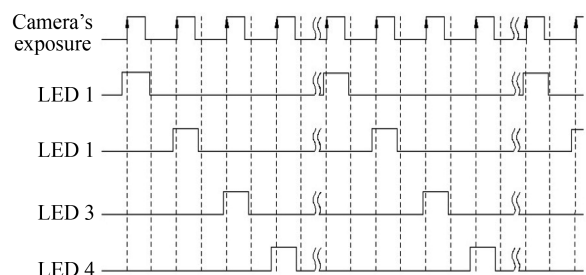


图3 多波段光源和相机曝光时序图

Fig.3 Timing diagram of multi-band illuminants and camera exposure

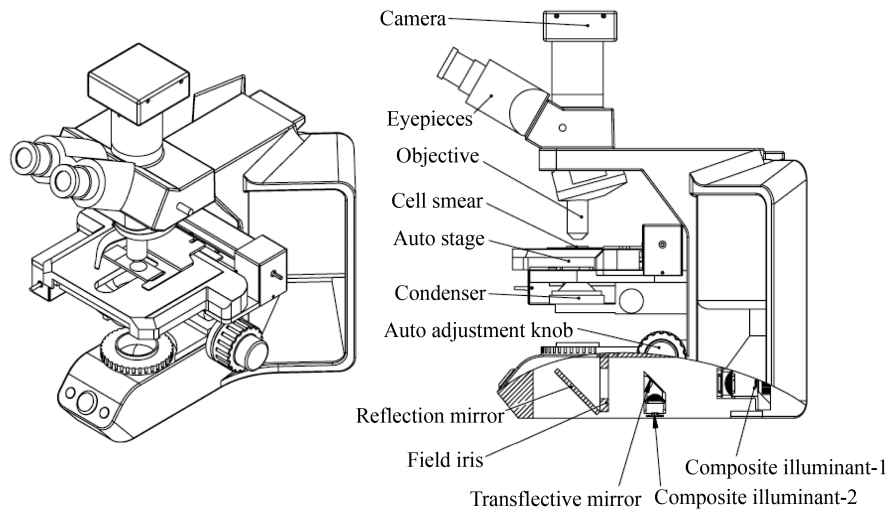


图4 多波段光源显微光谱成像系统构成

Fig.4 Multi-band illuminants microscopic spectral imaging system

其中显微镜选用日本奥林巴斯 BX43 显微镜,该显微镜使用万能无限远光学成像系统和透射科勒照明光源,能够在整个视野获得平坦、均匀的图像,而且可以轻松连接数字成像相机.在这里对其进行了改造,首先将显微镜的载物平台进行自动化改造,采用了丝杆传动和步进电机驱动方式,聚焦方式也改制成步进电机驱动,可实现细胞涂片的自动聚焦和扫描.其次去掉其原装的照明光源,保留了视场光阑、聚光镜、目镜和物镜等光学成像系统.

组合光源按模块化进行设计,方便光源模块的装调和换修.根据 2.1 的方案设计了两组组合光源,组合光源 1 及准直透镜 1 设计在同一个模块中,组合光源 2 将准直透镜 2 和半透半反镜整合到一个模块.所有模块都安装到显微镜机架底部,同时将原光源驱动板替换为新的组合光源控制板.

图像传感器选用美国安森美半导体公司 (ON Semiconductor) 的 COMS 黑白图像传感器 NOIV1SN5000A,感光阵列尺寸为 1 英寸,分辨率  $2592\text{ H} \times 2048\text{ V}$ ,像素大小  $4.8\ \mu\text{m} \times 4.8\ \mu\text{m}$ ,最大输出帧率 75 fps(frames per second),信噪比为 40 dB.相机板卡上还设置一个 FPGA 模块,主要完成图像数据获取与存储、同步矩阵剥离运算及快速数据传输等功能,通过硬件的方式实时解混叠处理多光谱图像,将处理完成的图像传送到主机进行后续 DNA 含量计算和伪彩色图像合成.

### 3 实验结果与讨论

#### 3.1 实验条件和方法

1) 带宽测试实验:利用 LCTF 测定本文中选用的四个波段离散光源的实际中心波长和半高宽,以及在四个波段上图像传感器的特征向量.LCTF 选用美国 CRI 公司的 VariSpec™(VIS-07-35-STD),工作光谱范围为  $400\sim 720\text{ nm}$ ,半峰全宽为  $10\text{ nm}$ ,工作孔径为  $20\text{ mm}$ .

首先,测试中心波长为  $460\text{ nm}$  的波段时,光源切换为蓝色 LED 发光,调谐 LCTF 的中心波长以  $1\text{ nm}$  的波长从  $450\text{ nm}$  到  $470\text{ nm}$ ,在每一个波长获取原始的未剥离的图像数据,此时计算整帧图像的响应值的平均值作为测量数据.同样地,测量中心波长为  $520\text{ nm}$ 、 $570\text{ nm}$ 、 $620\text{ nm}$  的波段时,切换相应的 LED 发光,LCTF 的调谐范围分别为  $510\sim 530\text{ nm}$ 、 $550\sim 580\text{ nm}$  以及  $600\sim 640\text{ nm}$ ,使用同样的方法计算这三个波段响应的平均值作为测量数据.在测量完毕一个光谱波段后,各波段的测量数据组成测量向量,其中每个参数除以参数中最大的那个,进行归一化处理,而参数最大的那个就是实际的中心波长,通过曲线得到该光源的实际半高宽.

2) 光源同轴性测试实验:以显微测微尺为标尺,以原光源测量参数为标准,检测组合光源平行度和同轴度是否符合成像系统要求.根据显微镜光学原理,聚光镜可将视场光阑多边形成像在物面上,可用此特性作为检测手段:若入射光为同轴平行的光线,调整聚光镜使视场光阑成像从模糊到清晰,光斑应是均匀扩散,若入射光存在偏差则光阑成像过程中光斑会有偏移.使用一块显微测微尺上刻度为  $0.1\ \mu\text{m}$  精度的十字坐标作

为标尺,检测光斑在测微尺上的偏移情况.首先测量原标准光源的偏移情况,再依次测定两种组合光源,与标准光源进行对比判定是否合格.

3) 图像剥离与合成实验:在复染情况下测试多光谱图像剥离效果和伪彩色图像合成效果.图像剥离和图像合成需要设定一个固定的光源亮度作为标准.在本文中设定的标准为:空场时,视场中央固定区域(100 pix \* 100 pix)各波段平均灰度值均为  $220 \pm 5$ .在此标准下调节好各波段光源的亮度,采集四个波段下的图像,根据模型计算剥离出 570 nm 波长下福尔根染料吸光度,观察剥离效果;选取 460 nm, 520 nm, 620 nm 作为彩色图像的 B、G 和 R 分量合成伪彩色图像,观察图像效果.

4) DNA 定量计算准确度验证实验:使用两种方法验证:首先选用小鼠肝脏涂片作为测量标本,测量计算的 DI 值是否符合肝细胞多倍体性的特点;其次选择宫颈阳性样本,同时进行制作两张涂片,一张进行福尔根染色用单波段 DNA 设备扫描,一张进行复合染色用多光谱成像设备扫描,比较两次测量方法之间的差异.

## 3.2 实验结果与讨论

### 3.2.1 带宽测试实验的结果与讨论

如图 5,根据测定的数据可知四个离散光源中心波长分别为 462 nm、525 nm、570 和 625 nm,符合其给定的误差范围,而半高宽的波段范围分别为 456~468 nm、518~530 nm、563~577 nm、和 615~634 nm,即半高宽为 12 nm/12 nm/14 nm/19 nm,在误差范围之内,该实验证明了使用四种 LED 离散光源来进行多光谱成像,其发射光是符合要求的窄带单色光.

### 3.2.2 光源同轴性测试实验的结果与讨论

调整视场光阑和聚光镜使十字刻度居于光斑中间,光斑最清晰的位置记为 0 位,调整聚光镜上下移动各 2 个位置,记为  $\pm 1$  位,  $\pm 2$  位,观察光斑的偏移量.原标准光源测试结果如图 6(a) 所示,从 -2 位到 +2 位调整过程中,光斑都居于刻度中心,各方向偏差不超过 2 个刻度,以此作为标准;图 6(b) 为组合光源 1 的测试结果,由于该组合光源是在原位替换掉标准光源,且半透半反镜不会改变透射光的角度,此光源测量结果与标准光源基本一致,满足要求;组合光源 2 的光线是经半透半反镜反射后与组合光源 1 合轴,半透半反镜的俯仰角及倾斜角会影响合轴效果,因此设置了角度调节机构.图 6(c) 是组合光源 2 在调节前的测量结果,可观察到光斑偏移比较严重,多次调整角度后测量结果如图 6(d) 所示,偏移情况明显改善,各方向最大偏差不超过 3 个刻度,可认为合格.

### 3.2.3 图像剥离与合成实验的结果与讨论

实验结果如图 7,图 7(a)~(d) 分别是 620 nm、520 nm、460 nm 和 570 nm 四个波段光源下采集的图像.可以看出复染情况下多种染料作用导致吸光度互相干扰的问题比较严重,尤其是图(d),570 nm 波段是传统福尔根单染下定量分析使用的波段,福尔根染料在此波段吸收峰最强,亮绿和伊红吸收峰较弱,所以图 d 中细胞核与胞浆的对比度明显高于其他三个波段,但还是可以清楚看到胞浆轮廓.若直接用此波段在复染情况下进行 DNA 定量完全不具可行性,这也佐证了吸光度剥离的必要性.图(e)是在 570 nm 波段下将福尔根染料吸光度剥离出来后还原的图像,从图像中我们可以观察到剥离还原后的图像几乎仅剩福尔根着色的细胞核,亮绿和伊红着色的胞浆等则被去除,此图像反映的即是 570 nm 波长下 DNA 物质的真实吸光度.图(f)是选取 620 nm、520 nm、460 nm 作为彩色图像的 R、G 和 B 分量合成的伪彩色图像,可以看到图像颜色明亮饱满、背景干净、细胞核和胞浆的轮廓纹理清晰可见,不同成熟度的细胞显示不同的红绿颜色.将合成的图像发送给合作医院的病理医生阅片,反馈的意见是该细胞图像背景、胞浆颜色与巴氏染色无明显差别,而细胞核颜色偏深(原因是复合染色用福尔根染料染细胞核,而巴氏染色用苏木素染料染色),但不会对其 TBS 诊断造成干扰和障碍.

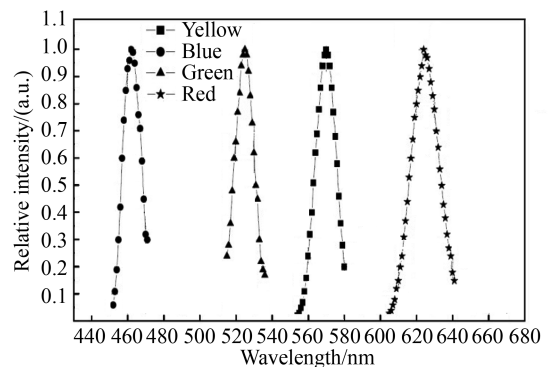


图 5 四种离散光源的相对强度曲线  
Fig.5 The relative intensity curves of four kinds of discrete light

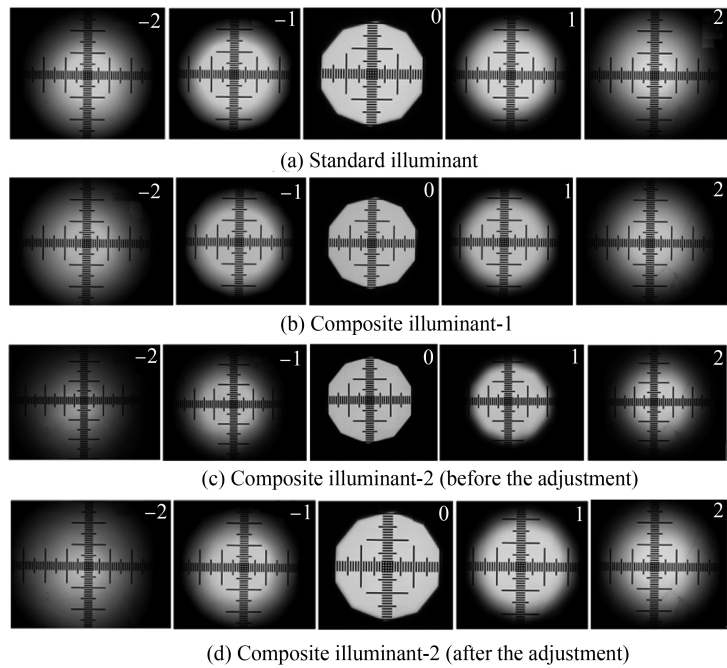


图6 组合光源的平行度和同轴度验证实验

Fig.6 Confirmatory experiment of composite illuminants' parallelism and coaxiality

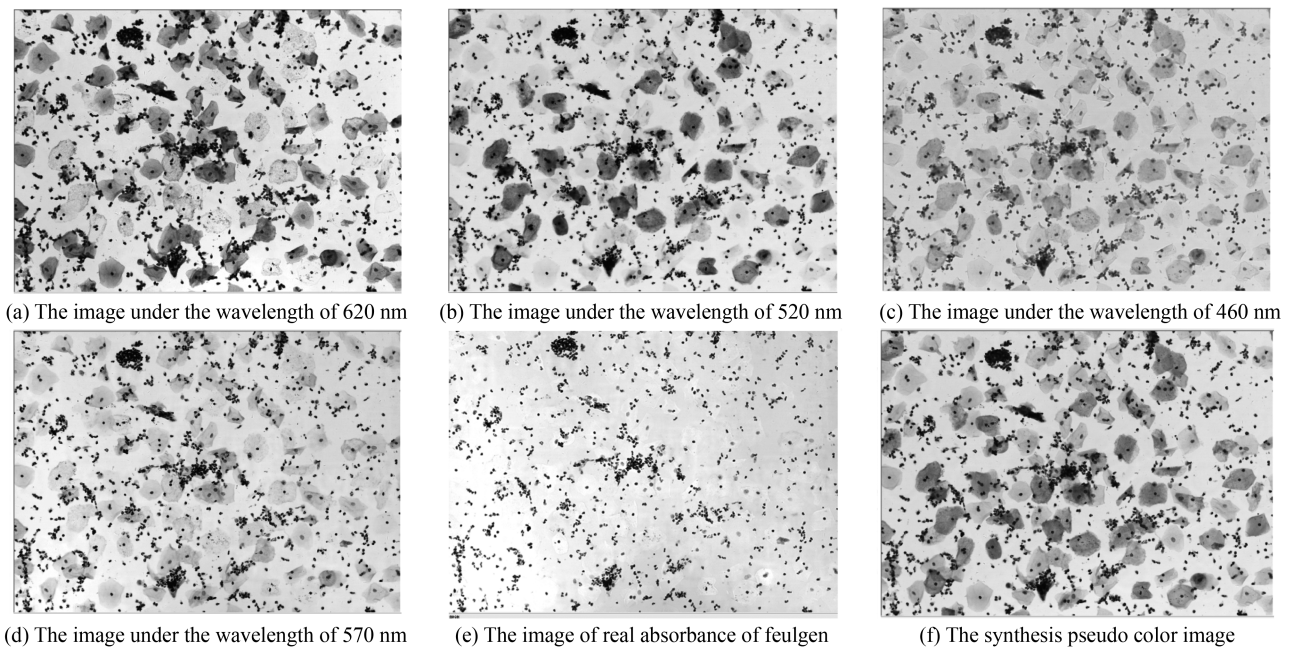


图7 细胞图像

Fig.7 Cell images

### 3.2.4 DNA 定量计算准确度验证实验的结果与讨论

小鼠肝脏具有实质细胞单一、间质细胞少、肝细胞容易分离等特点,特别是具有多倍体性的特点,即肝脏内 2c、4c、8c 等不同倍体的肝细胞共存的现象<sup>[15]</sup>.因此肝细胞涂片是评估 DNA 定量分析仪性能的很好生物学样本.正常情况下,三种不同倍体肝细胞 DI 值应该分别为 1、2 和 4,以测量结果中 DI 值是否接近 1、2、4 来评估其测量结果的准确性<sup>[16]</sup>.本测试中鼠肝标本用福尔根染色,设定扫描鼠肝片标本细胞数量为 8 000 个,使用本系统多光谱剥离模型计算的 DNA 指数如图 8 所示.图 8(a)是 DNA 指数的统计直方图,Y 轴为细胞的数量,X 轴为 DNA 含量(DNA 指数),可见大多数细胞分布在 DI=1,2,4 处,出现明显的 2c、4c、8c 细胞峰.图 8(b)是 DNA 指数与细胞核面积构成的散点图,每个点代表一个细胞,散点图中也可见待测细胞基本

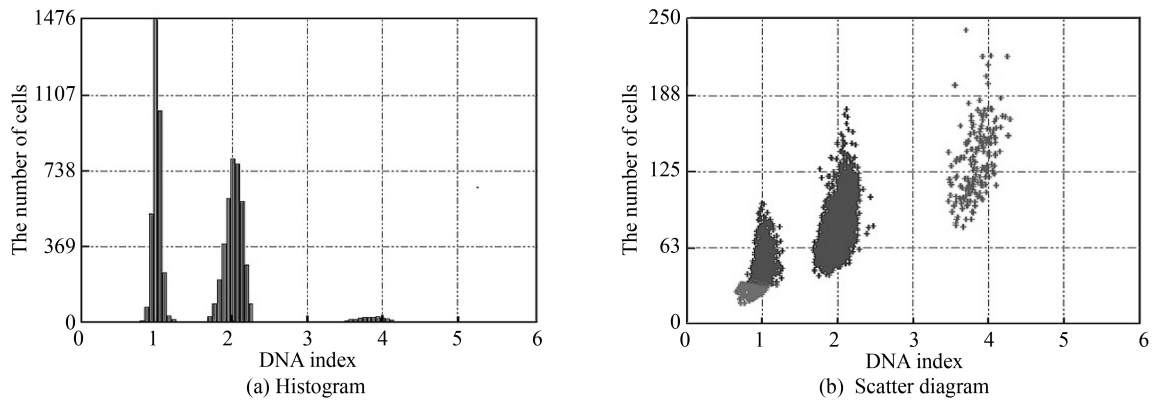


图8 鼠肝片评价结果

Fig.8 The evaluation results using mice liver specimens

分布在  $DI=1, 2, 4$  处,证明计算的 DNA 指数符合鼠肝细胞多倍体性特征,其测量结果是准确的。

宫颈阳性标本扫描计算结果如图 9,图 9(a)为普通单波段设备扫描结果,图 9(b)为本系统多波段成像方法扫描结果.由图可见,该标本大多细胞分布在  $DI=1, 2$  位置,有少量  $DI>2.5$  的阳性细胞(红色点标记),是典型细胞增生及 DNA 倍体异常的阳性标本.两种方法均可见阳性细胞,图 b 的散点图和直方图不如图 a 单波段设备的饱满,原因是制片时获取的细胞数量较前者少,但图形分布形态相似,检出结果也基本吻合.表 1 是 DNA 指数统计的详细结果:虽然分析细胞总数有差别,但本系统计算的二倍体标准差和变异系数与单波段的相比差别不大(7.95 和 7.16),而高倍体的计算则出现了更大的离散性,变异系数从 7.1 到 35.2,而单波段仅从 8.1 到 10.6.原因是单波段设备只使用了一个光谱波段的原因,误差源更少,精度更高,尤其是对核面积和灰度值更高的高倍体细胞的计算会更准确.但总体来看,两种方法计算的二倍体和四倍体  $DI$  均值基本都是吻合的,区别仅在于非整倍体和高倍体细胞的计算精度略有差别,而这些细胞均为  $DI>2.5$  的阳

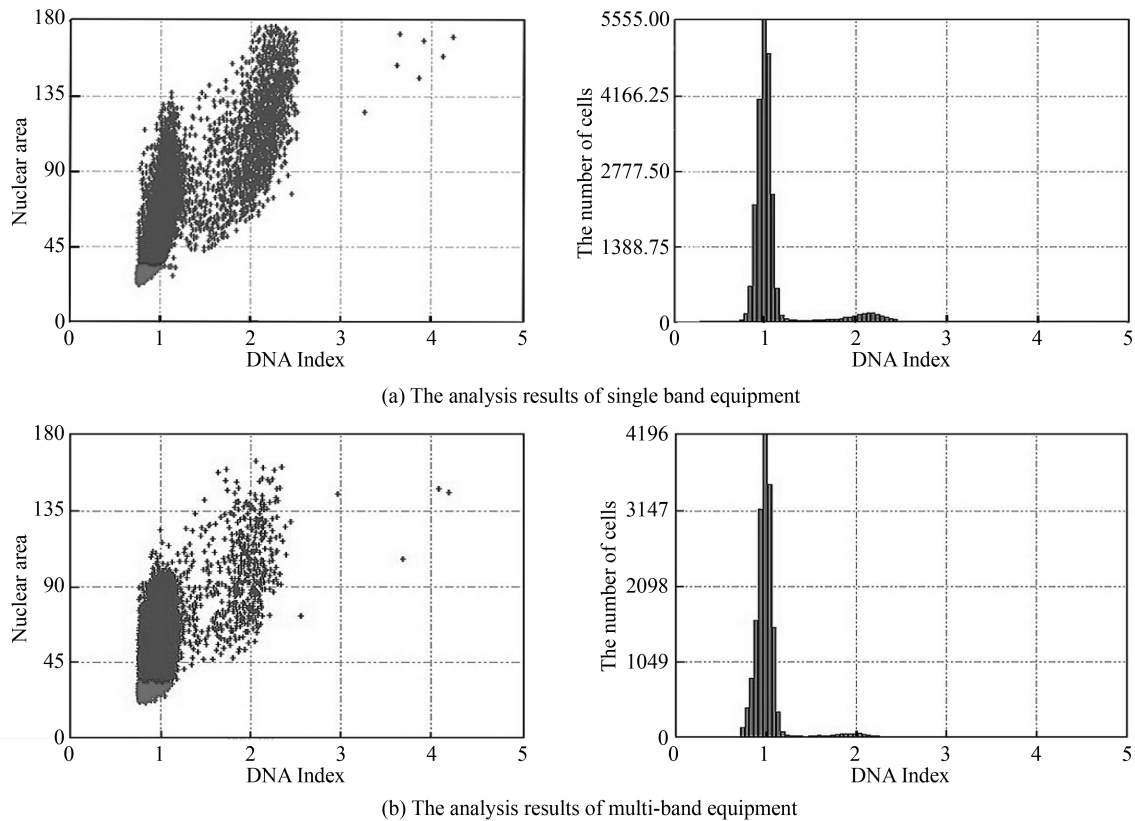


图9 两种系统对阳性标本的分析结果对比

Fig.9 The analysis results of positive samples of two kinds of system



性细胞,两种方法均可正常检出.因此本方法在筛选癌细胞方面仍然具有较高的准确性和可靠性.

表 1 两种定量方法数据对比  
Table 1 Contrast data of two kinds of quantitative methods

Methods	Cell types	Quantity	Mean of DI	Standard deviation	CV
Single band imaging DNA quantitative analysis	Diploid cells	20 696	1.003	0.072	7.162
	Tetraploid cells	1 464	2.123	0.173	8.136
	Aneuploid cells	303	1.511	0.156	10.328
	High ploidy cells	17	3.702	0.394	10.638
Multi-spectral imaging DNA quantitative analysis	Diploid cells	15 767	0.079	0.079	7.950
	Tetraploid cells	786	1.993	0.142	7.109
	Aneuploid cells	157	1.501	0.150	10.006
	High ploidy cells	8	4.508	1.430	35.248

### 3 结论

将组合光源融入到显微镜光学系统中,使用吸光度剥离模型从多光谱图像中剥离出真实的吸光度并合成伪彩色图像.实验结果表明,选用多波段光源组成多光谱显微成像系统是可行的,只要选择合适波段的 LED,无论在光学结构还是成像方法上都可以轻松实现.该方案成本低、实现简单、可扩展性好,能使用高信噪比的黑白 COMS 相机提高采集图像的质量和精度.本系统选用四个波段的光源进行三种物质的吸光度剥离,在其他应用中待检测物质更多且光谱特征差异较大的情况下,适当更换光谱波段和增减波段数量,针对不同的待检物质建立各自的剥离模型,只需进行少量的更改和更新即可在新的环境下应用,因此在医疗、农业等领域具有巨大的市场应用潜力.

LED 存在结电容,从点亮到发光稳定需耗费一定时间,因此光源的频繁切换必然导致整个多光谱成像过程速度减慢.进一步研究中还需在如何提高速度方面入手,一方面测试多种不同规格不同工艺的 LED 灯,选用发光稳定时间更短的 LED 灯,另一方面精确优化相机曝光和 LED 点亮的时序,提高图像采集和处理的效率,使空闲时间更短,提高整体速度.

### 参考文献

- [1] ZHU Fang-pei, REN Qing-ling. The new progress of cervical cancer and precancerous lesions in early screening[J]. *Modern Oncology*, 2016, **24**(1): 149-152.  
朱方培,任青玲. 宫颈癌及癌前病变早期筛查的新进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, **24**(1): 149-152.
- [2] REMMERBACH T W, WEIDENBACH H, POMJANSKI N, *et al.* Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer[J]. *Anal Cell Pathol*, 2001, **22**(4): 211-221.
- [3] KANG Yi-qing, OUYANG Xin-hua, HE Dan, *et al.* Super early screening of cervical lesions clinical analysis of cervical cell DNA[J]. *Medical Innovation of China*, 2013, **10**(9): 134-135.  
康一青,欧阳新华,何丹,等. 宫颈细胞 DNA 超早期筛查宫颈病变的临床分析[J]. 中国医学创新, 2013, **10**(9): 134-135.
- [4] ZHOU Hong, LUO Xin. Advantages of cells DNA ploidy analysis of cervical lesions in large population countries prior screening[J]. *Chinese Journal of Family Planning & Gynecotokology*, 2016, **8**(9): 11-15.  
周宏,罗新. 细胞 DNA 倍体分析技术在人口大国宫颈病变先行筛查中的优势[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, **8**(9): 11-15.
- [5] TAN Jing-lang, CHEN Qiong, QIAO Sha-sha, *et al.* Clinical application of DNA quantitative analysis combined with liquid based cytology in cervical cancer screening[J]. *Hebei Medicine*, 2016, **22**(2): 261-264.  
谭景浪,陈琼,乔莎莎,等. 细胞 DNA 定量分析联合液基细胞学在宫颈癌筛查中的临床应用研究[J]. 河北医学, 2016, **22**(2): 261-264.
- [6] 王睿. DNA 定量细胞学联合液基细胞学在宫颈病变中的应用价值[D]. 西宁:青海大学研究生院, 2015.
- [7] 孙小蓉,汪键. DNA 定量细胞学[M]. 第 2 版. 武汉:湖北科学技术出版社, 2011.
- [8] WU Zheng, ZENG Li-bo, WU Qiong-shui. Study of cervical exfoliated cell's DNA quantitative analysis based on multi-spectral imaging technology[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2016, **36**(2): 496-501.
- [9] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 第 2 版. 北京:中国石化出版社, 2007.
- [10] WANG Xin-quan, HUANG Min, GAO Xiao-hui, *et al.* Potable multispectral imager based on LCTF[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(1): 71-75.  
王新全,黄旻,高晓惠,等. 基于液晶可调谐滤光片的便携式多光谱成像仪[J]. 光子学报, 2010, **39**(1): 71-75.
- [11] WANG Yi-zhe, ZHANG Feng-shan. A new kind of optical thin-film component-multi-channel band-pass filter[J].

- Infrared*, 2003(1): 15-20.
- [12] LIAO Cheng-sheng, WU Zheng, ZENG Li-bo, *et al.* Real-time multi-spectral imaging system based on multi-channel narrow-band filter and color image sensor[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2017, **46**(4): 0411001.  
廖乘胜,吴正,曾立波,等. 基于多通道窄带滤光片和彩色图像传感器的实时多光谱成像系统[J]. 光子学报,2017,**46**(4):0411001.
- [13] ZUO Fen, CHEN Lei, XU Chun-sheng. Simultaneous phase-shifting interferometry based on two-dimension grating[J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(4): 663-667.  
左芬,陈磊,徐春生. 基于二维光栅分光的同步移相干涉测量技术[J]. 光学学报,2007,**27**(4): 663-667.
- [14] WANG Jia-hua, WU Zheng, WU Qiong-shui, *et al.* The study on combined screening method for TBS and cervical cancer cell's DNA quantitative analysis based on multi-spectral imaging technology[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, **37**(2): 545-550.
- [15] ZHANG Hao, YAO Xu-guo, MAO Xue-qin, *et al.* Measurement of rice neck blast severity by using multi-spectral imagine[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009(1): 65-68.
- [16] WEI Qing-zhu, XIA Chao-yong, HUANG Zhong-xin, *et al.* The application of liver cell smear in evaluating the precise and accuracy of image analyzer[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2004, **33**(6): 580-581.  
魏清柱,夏潮涌,黄中新,等. 肝细胞涂片在评估图像分析仪的精确性和准确性中的应用[J]. 中华病理学杂志,2004,**33**(6):580-581.