

doi: 10.3788/gzxb20174604.0411004

频谱编码深度成像实验研究

廖九零, 高万荣

(南京理工大学 电子工程与光电技术学院, 南京 210094)

摘 要: 频谱编码显微镜是用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. 搭建了一个基于超连续光源和自制光谱仪的频谱编码显微成像系统. 其横向分辨率为 $1.72 \pm 0.13 \mu\text{m}$ (编码线方向) 和 $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (垂直于编码线方向), 测得不同横向位置处的轴向分辨率有差异. 对离体猪肝组织不同部位进行了成像 (可见血管、肝窦内皮细胞和肝细胞); 对鸡心组织以 $10 \mu\text{m}$ 深度间隔进行成像, 测得不同深度处结构信息不一样. 结果表明, 采用该频谱编码成像的方法能够进行高分辨的深度成像.

关键词: 成像系统; 显微镜; 频谱编码; 深度成像; 分辨率; 衍射; 红外成像

中图分类号: R318.51

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2017)04-0411004-6

Experimental Research on Depth-resolved Spectrally Encoded Imaging

LIAO Jiu-ling, GAO Wan-rong

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

Abstract: Spectrally encoded imaging uses a diffraction grating and a spectrum analyzer setup to obtain microscopic images. The different position on the sample is illuminated by different wavelength. Then the reflection light is decoded to obtain spatial information. In this letter, a spectrally encoded microscopy is described which is based on a super luminescent diode source and a home-built spectrometer. By imaging a 1951 USAF resolution target, the measured lateral resolutions were found to be $1.72 \pm 0.13 \mu\text{m}$ and $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$ in the spectral and its vertical directions, respectively. The axial resolutions along the different lateral positions were measured to be unequal. The images of excised swine liver tissue were obtained at different locations. The veins, liver sinusoidal endothelial cells and hepatocytes can be visualized. The Chicken heart tissue was imaged at $10 \mu\text{m}$ per step along the depth direction beneath the surface, the images indicated the difference in the structure features at different depths. The results demonstrate high resolution, depth-resolved imaging capability by this method.

Key words: Imaging system; Microscopy; Spectrally encoded; Depth-resolved; Resolution; Diffractive optics; Infrared imaging

OCIS Codes: 110.0180; 170.1790; 300.6170

0 引言

在频谱编码成像系统中 (Spectrally Encoded Imaging, SEI), 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线. 这就是频谱编码基本原理, 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 CCD 组成^[2]. 对于扫频光源, 通常采用的是光电探测器^[3]. 空间信息可以通过对反射光光谱解码获得, 使得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, SEI 可以很容易地获得二维平面图像. 由于不需要快速的横向扫描, SEI 可以获得很高的成像速度, 并显著减小探头的尺寸^[4].

类似于光学相干层析术 (Optical Coherence Tomography, OCT), SEI 也可以通过干涉的方法获得深度信息^[5]. 通过添加参考臂, 参考光与样品光在相干长度内发生干涉, 对干涉信号进行解调获得深度信息. OCT 的轴向分辨率由光源的相干长度决定, 而相干长度与光源的光谱带宽成反比. 在光源带宽相等的条件

基金项目: 国家自然科学基金 (Nos. 61275198, 60978069) 和国防基础科研项目资助

第一作者: 廖九零 (1990-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为生物组织成像. Email: liaojiulin304@163.com

导师 (通讯作者): 高万荣 (1961-), 男, 教授, 博导, 主要研究方向为生物医学光学. Email: wgao@njust.edu.cn

收稿日期: 2016-10-17; 录用日期: 2017-01-06

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

下, 频谱编码成像方式会将宽带光按波长照射到样品上不同位置形成数个可分辨的点. 因此, 入射到每个横向位置的照明光的带宽等于光谱总带宽除以横向可分辨点数, 从而轴向分辨率降低. 但是, 与 OCT 还需 B 扫才能获得截面图像相比, SEI 能够以很快的速度获取宽场三维信息.

SEI 中深度信息也可以像共焦显微镜一样通过聚焦到不同深度来获得^[7]. 传统的反射式共焦显微镜采用点照明, 在探测器前面放置一个光学上共轲的小孔来抑制离焦信号^[8]. 虽然采用点对点的照明方式可以获得高分辨、高对比度的图像, 但是图像采集速度严格受限于光束或者样品的机械扫描速度. 在 SEI 中, 由于光纤纤芯直径小, 光纤可以将离焦位置光滤除, 类似于传统共焦显微镜的小孔的作用. 由于不需要全范围内的机械扫描, SEI 相比于传统的共焦显微镜具有结构简单、速度快的优点.

最近十多年来, 已经有许多关于 SEI 应用于不同领域的报道. Tearney 小组, Yelin 小组对于这项技术的发展做出了重大贡献, 在显微成像、内窥镜设计和血流测量方面都取得了重要成果^[9-15]. 对于消化道和乳腺组织, 已经可以做到成像结果与组织病理学图像媲美, 对于癌症临床诊断具有重要意义^[8]. 微型探头制造工艺日臻成熟^[4,9-10], 对于实际应用中存在人体抖动问题提出了一些解决方法, 如 PZT 法^[9]. 快速线照明有利于血流测量, Yelin 小组设计了基于频谱编码原理的血细胞计数仪^[11], 对血管中不同位置处倾斜的血细胞模型进行了验证^[12], 提出了相关编码法测量血液流速^[13]. 2015 年, 韩国 Chulmin Joo 小组提出了无需扫描就可以进行二维成像的 SEI 新方法. 其中一种是采用扫频光源, 在按波长产生编码线照明的同时, 沿垂直于编码线方向采用柱面镜进行线照明然后成像到线阵 CCD, 不同时刻测得的信号是不同波长的线照明图像^[14]; 另一种方法也是采用扫频光源, 垂直于编码线方向也采用线照明, 但是在柱面镜与样品之间放置掩模板圆盘, 该圆盘沿半径方向空间频率分布不同, 当该圆盘旋转时, 样品被随时间变化的空间频率进行调制照明. 当整个调制周期结束后, 对点探测器得到同一波长处的信号进行傅里叶变换即可得到该波长线照明区域的图像信号^[15]. 这些无需扫描即可二维成像的方法对于提高成像速度和进一步减小装置尺寸很有帮助.

本文搭建了一个基于连续光源和自制光谱仪频谱编码显微成像系统. 通过对 1951USAF 分辨率测试靶来测试系统成像性能, 对离体猪肝组织表面成像和鸡心组织深度成像来验证对生物组织的成像能力.

1 系统结构及分辨率

1.1 系统结构

图 1 为 SEI 装置示意图. 本装置光源采用的是超发光二极管光源 (BLM-S-840-B-I-20, superlum), 中心波长 $\lambda_0 = 840 \text{ nm}$, 光谱带宽 $\Delta\lambda = 50 \text{ nm}$, 输出光功率达到了 15 mW . 该光源的光纤出射端连入 $50:50$ 光纤耦合器的一端, 此耦合器光纤的数值孔径为 0.13 , 耦合器另一端出射光经由一个消色差透镜 ($f = 11 \text{ mm}$) 准直成理论直径为 $D = 4.94 \text{ mm} (2 \times 0.13 \times 19 \text{ mm})$ 的光束. 准直光以入射角 θ_i 照射到一个反射式衍射光栅上 ($G = 600 \text{ lines/mm}$), 衍射角为 θ_d . 由于衍射光是发散的, 显微物镜的通光孔径较小, 为了使所有的光都能

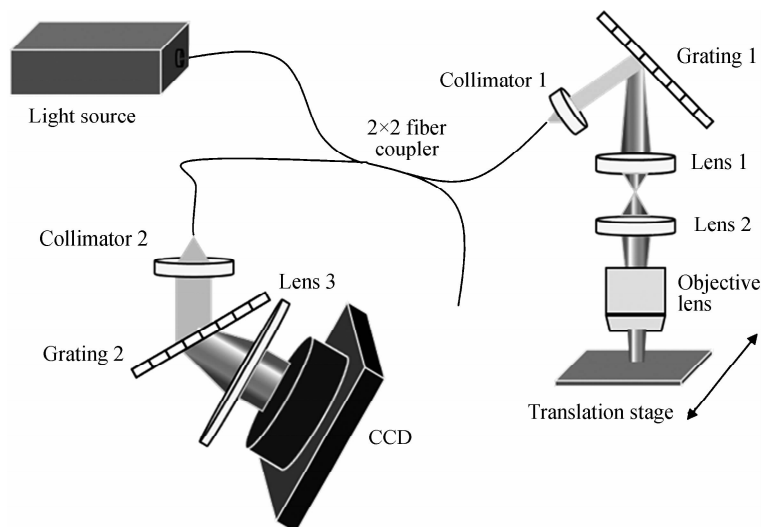


图 1 频谱编码显微成像原理图

Fig. 1 Schematic of spectrally encoded imaging

进入显微物镜,本文采用了一个放大倍率为 1.16($f_1=30\text{ mm}$, $f_2=35\text{ mm}$)的望远系统将衍射光照射到显微物镜上($\text{NA}=0.4$, $f_0=10\text{ mm}$).不同波长聚焦到样品横向上的不同位置形成线照明,从而实现了波长对位置的编码.从样品回来的后向散射光沿着照明光路回到光纤耦合器中,然后接入探测器,对探测到的信号进行解码.探测器采用的是自制光谱仪,耦合器出射光经过焦距为 35 mm 的消色差透镜进行准直,照射到线对数为 1200 l/mm 的透射式光栅(Wasatch Photonics)上,衍射光经过焦距为 300 mm 的消色差透镜汇聚到具有 2048 个像素的高灵敏度的线阵 CCD(AViVA EM4 2014, e2v)上,该 CCD 线扫频率可达 70 kHz.通过在垂直于编码线方向进行扫描可以得到两维显微图像.

1.2 系统参数理论分析

在 SEI 中,每个波长的衍射角可表示为

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

G 为光栅线密度, m 表示衍射级次.由于本实验采用的是反射式光栅,为了合理安排各个元件的位置,同时保持较高的衍射效率,本实验中采用的衍射级次是 -1 级,其入射角 θ_i 约为 11° ,衍射角 θ_d 约为 -45° ,衍射光与入射光分布在光栅法线两侧.

通过对式(1)中 θ_d 关于 λ 求导,准直光被光栅衍射后的角度发散范围 $\Delta\theta$ 可表示为

$$\Delta\theta = \frac{G}{\cos\theta_d} \Delta\lambda \quad (2)$$

因此沿光谱线方向的视场可表示为

$$\text{FOV} = 2f_0 \tan\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right) \quad (3)$$

由样品臂光栅决定的光谱分辨率为

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

D 为照射到光栅上准直光束直径.因此,可分辨的光谱点数 n_r 可表示为

$$n_r = \frac{\Delta\lambda}{\delta\lambda_G} = \frac{\Delta\lambda}{\lambda_0 \cos\theta_d} DG \quad (5)$$

在传统共焦显微镜中,横向分辨率 δx 可以按照 $0.51\lambda/\text{NA}$ 计算^[16].在 SEI 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可分辨开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^[3].因此横向分辨率可表示为

$$\Delta x = \frac{\text{FOV}}{n} \quad (6)$$

将实验装置的参数代入式(6)可以得到,理论上 FOV 为 $419\ \mu\text{m}$,由共焦决定的横向分辨率为 $1.07\ \mu\text{m}$,由光谱分辨率决定的横向分辨率为 $1.68\ \mu\text{m}$.

根据参考文献[17],轴向分辨率可表示为

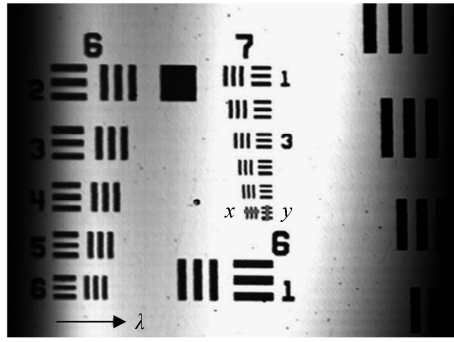
$$\Delta z = \frac{\lambda}{n(1 - \cos\alpha)} \quad (7)$$

式中, n 表示折射率浸润介质的折射率, $\alpha = \arcsin \text{NA}/n$ 表示物镜孔径角.计算得到理论轴向分辨率的半高全宽为 $10.06\ \mu\text{m}$.

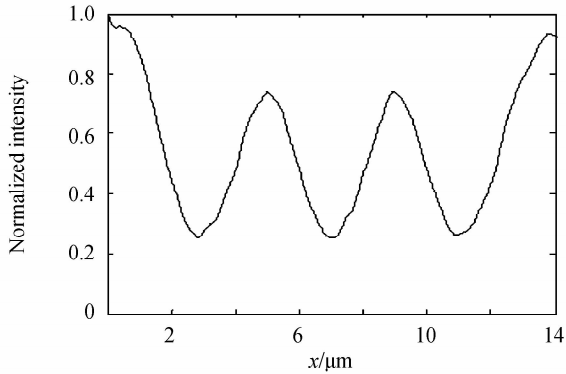
2 实验结果与讨论

2.1 横向分辨率和视场

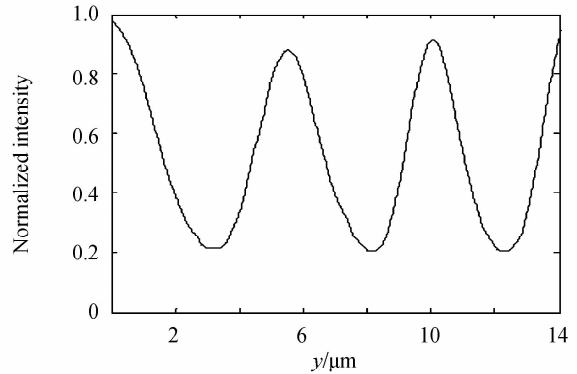
为了测量 SEI 的成像性能,一块 1951USAF 分辨率测试靶被用来成像.如图 2 所示,第 7 组第 6 个元素(线宽为 $2.19\ \mu\text{m}$)被清楚地分辨开来.横向分辨率由线扩展函数(LSF)的半高宽度测得.线扩展函数的半高宽由第 6 组第 2 个元素的强度分布的一阶微分来计算得到.通过计算,沿编码线方向和移动方向的横向分辨率分别为 $1.72 \pm 0.13\ \mu\text{m}$ 和 $1.26 \pm 0.08\ \mu\text{m}$.



(a) Image of a USAF1951 resolution target



(b) The intensity profile of x indicated in (a)

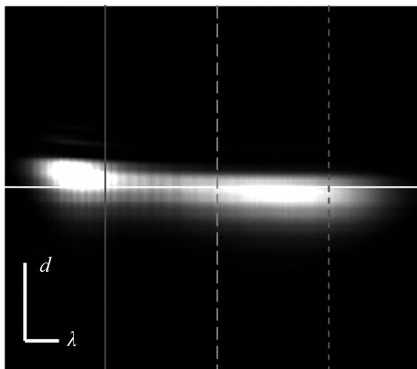


(c) The intensity profile of y indicated in (a)

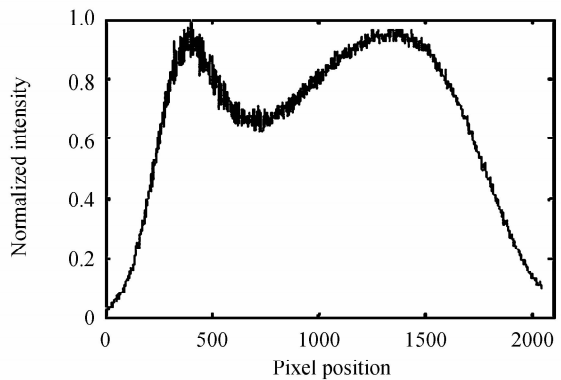
图 2 横向分辨率测试结果
Fig. 2 Measurement results of lateral resolution

沿频谱编码轴的横向分辨率主要由以下两者决定的分辨率中较差的值决定:共焦结构决定,有效光谱分辨率决定.有效光谱分辨率又主要由照明光栅光谱分辨率和光谱仪光谱分辨率中较差的值决定,一般情况下光谱仪的分辨率都是比照明光栅决定的分辨率好.照明光栅的光谱分辨率主要由照射到光栅上的光斑大小和光栅线密度共同决定.所以,合理选取照明光栅处的光谱分辨率很重要.

通过对 100 lines/mm 的反射式光栅进行成像,测得视场为 430 μm .采用反射镜代替样品,通过在焦平面附近轴向移动反射镜测得反射光强分布,沿着轴向的光强分布即为该系统的轴向响应曲线,通过计算轴向响应曲线的半高宽度获得深度分辨率.本实验中单次曝光即得到某个深度的编码线光强分布,因此沿轴向进行扫描即可获得如图 3(a)所示的深度响应分布图.取中间位置(如图 3(a)横线所示)画出沿 CCD 感光面的光强分布曲线,如图 3(b)所示,即通过本实验光谱编码系统后光谱分布曲线.图三(d)为该光源说明书附图中的理论光谱分布,通过对比可以发现该光谱分布并没改变.图 3(c)为图 3(a)中三个不同横向位置处的轴向响应曲线,从左至右三个位置处的轴向响应曲线半高全宽分别为 28.2 μm ,24.8 μm 和 25.0 μm .



(a) Axial response image



(b) Spectral distribution of horizontal line in (a)
Linear plot

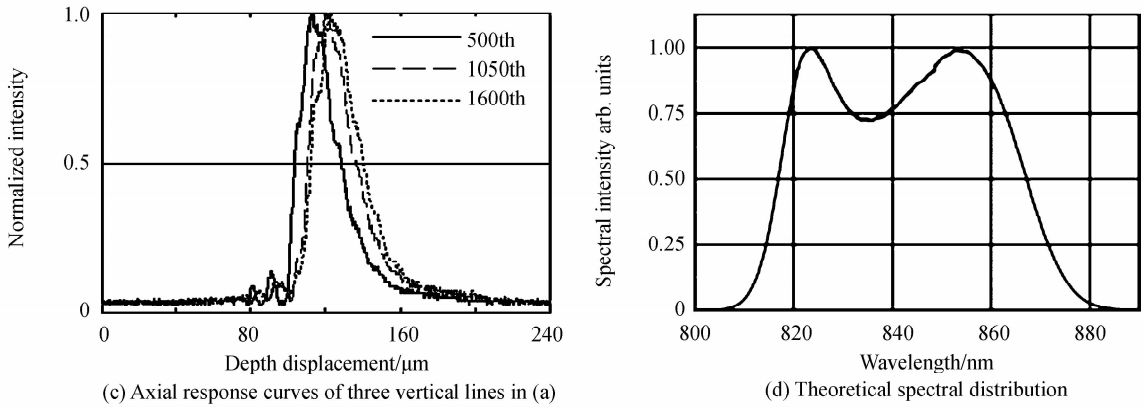


图3 深度分辨率及光谱分布测试结果(比例尺为 50 μm)

Fig. 3 Measurement results of axial resolution and spectrum distribution (the scale bar represents 50 μm)

光学系统不可避免都存在像差,本文的实验系统也不例外^[18].观察图 3(c)可以发现,轴向响应曲线有显著的旁瓣,该旁瓣并不是对称分布,该现象属于彗差.短波长的旁瓣明显于长波长的旁瓣,也表明短波长入射方向相对于显微物镜的光轴更加倾斜,装配误差也可能加剧旁瓣的产生^[10].由图 3(a)和(c)也可以看出,随着波长的增加,焦点位置位于更深处,这表明系统存在色差,原因在于物镜主要用于可见光波段,对于 840 nm附近的波长没有优化,整个系统的倾斜也可能导致这种现象的发生.

2.2 组织成像

为了测试组织成像性能,一小块离体猪肝组织被用于成像.该新鲜的猪肝组织没有进行醋酸处理直接成像,其结果如图 4 所示,插图为虚线方框处的放大图,不同位置处的结构信息不同.在图 4(a)中,三角形指向处为肝脏中各类尺寸的血管,这些血管为肝脏供给氧气和营养物质.图 4(b)表示的区域主要包含了肝窦内

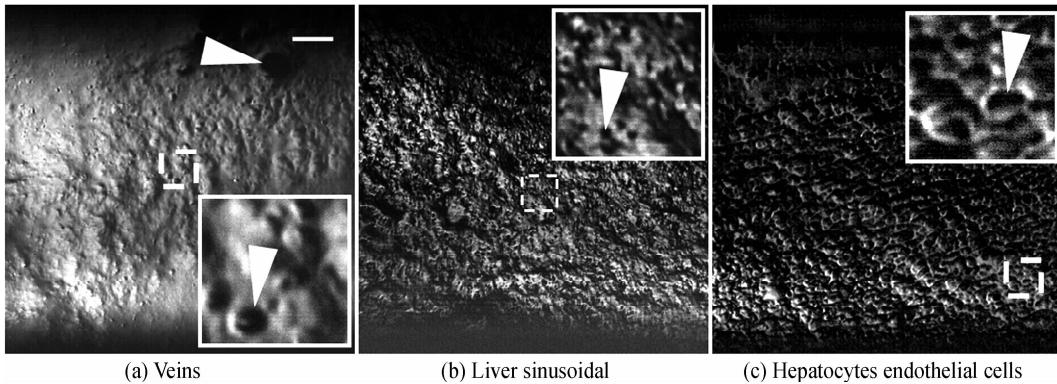


图4 不同位置处的离体猪肝组织图像(比例尺为 50 μm)

Fig. 4 Images of swine liver tissue at different positions (the scale bar denotes 50 μm)

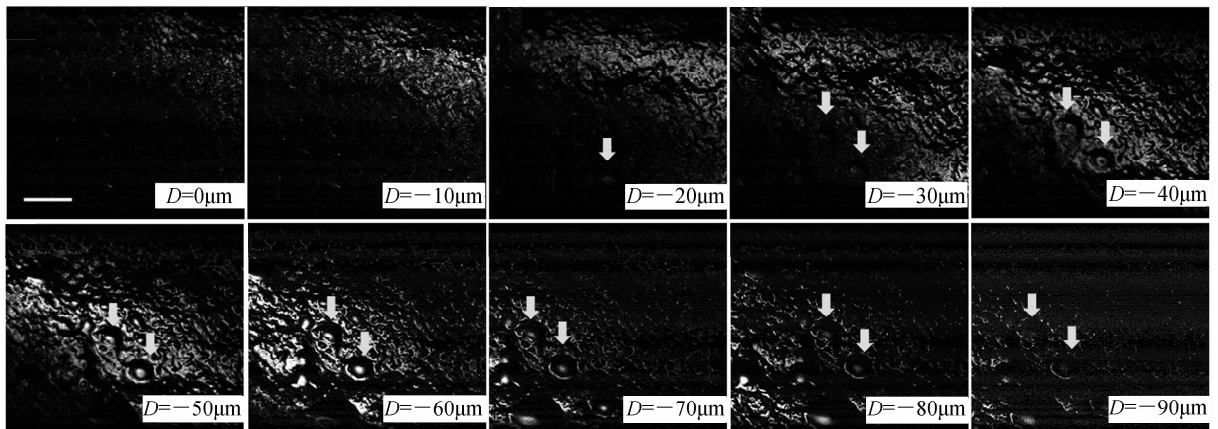


图5 不同深度处的鸡心组织图像(比例尺为 100 μm)

Fig. 5 Images of a swine small intestine tissue obtained at different imaging depths (the scale bar represents 100 μm)

皮细胞,该类细胞是肝脏非实质细胞中数目最多的细胞,细胞下基底膜物质很少,通透性较高有利于调节物质交换.图4(c)表示的是肝细胞,呈多边形状.

为了测试对生物组织深度成像的能力,一块鸡心组织用于成像.在深度方向每次移动 $10\ \mu\text{m}$ 进行成像,整个成像深度范围为 $100\ \mu\text{m}$,图中箭头所示为血管.当对表面成像时,主要看到的结构是结缔组织,随着深度加深,血管开始出现.在不同深度处,血管和其他组织的结构不尽相同,证明具有深度层析的能力.

3 结论

搭建了一个具有高分辨率,可对生物组织深度成像的频谱编码显微镜.该系统提供了一种无需醋酸处理即可获得高对比度生物组织图像的方法.本文对猪肝不同位置处,鸡心不同深度处进行了成像,证明了细胞级别的成像能力和获得不同深度信息的可行性.但实验中的生物样品都是动物组织样品,且缺乏病变组织对比.接下来可以采用人体组织样品,并与之病理样本进行对比.

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] YELIN D, BOUMA B E, IFTIMIA N, *et al.* Three-dimensional spectrally encoded imaging[J]. *Optics Letters*, 2003, **28**(23): 2321-2323.
- [3] BOUDOUCX C, YUN S, OH W, *et al.* Rapid wavelength-swept spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, **13**(20): 8214-8221.
- [4] YELIN D, RIZVI I, WHITE W M, *et al.* Three-dimensional miniature endoscopy[J]. *Nature*, 2006, **443**(7113): 765-765.
- [5] LIAO Jiu-ling, GAO Wan-rong, FANG Qiao-ran. Spectrally encoded endoscopic imaging[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, **34**(6): 611004.
廖九零,高万荣,方悄然. 频谱编码内窥成像技术[J]. *光学学报*, 2014, **34**(6): 611004.
- [6] YELIN D, BOUDOUCX C, BOUMA B E, *et al.* Large area confocal microscopy[J]. *Optics Letters*, 2007, **32**(9): 1102-1104.
- [7] WILSON T, CARLINI A R. Size of the detector in confocal imaging systems[J]. *Optics Letters*, 1987, **12**(4): 227-229.
- [8] KANG D K, SUTER M J, BOUDOUCX C, *et al.* Comprehensive imaging of gastroesophageal biopsy samples by spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2010, **71**(1): 35-43.
- [9] KANG D K, YOO H, JILLELLA P, *et al.* Comprehensive volumetric confocal microscopy with adaptive focusing[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, **2**(6): 1412-1422.
- [10] KANG D K, CARRUTH R W, KIM M, *et al.* Endoscopic probe optics for spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, **4**(10): 1925-1936.
- [11] GOLAN L, YELIN D. Flow cytometry using spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Optics Letters*, 2010, **35**(13): 2218-2220.
- [12] ZEIDAN A, YELIN D. Reflectance confocal microscopy of red blood cells: simulation and experiment[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, **6**(11): 4335-4343.
- [13] ELHANAN T, YELIN D. Measuring blood velocity using correlative spectrally encoded flow cytometry[J]. *Optics Letters*, 2014, **39**(15): 4424-4426.
- [14] KIM S, HWANG J, HEO J, *et al.* Spectrally encoded slit confocal microscopy using a wavelength-swept laser[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, **20**(3): 036016-036016.
- [15] HWANG J, KIM S, HEO J, *et al.* Frequency-and spectrally-encoded confocal microscopy[J]. *Optics Express*, 2015, **23**(5): 5809-5821.
- [16] CORLE T R, CHOU C H, KINO G S. Depth response of confocal optical microscopes[J]. *Optics Letters*, 1986, **11**(12): 770-772.
- [17] PAWLEY J. Handbook of biological confocal microscopy[M]. New York: Springer, 2006: 209.
- [18] LI Hong-fu, JIE Hui-ming, ZHANG Chen, *et al.* Studying the combined effects of primary aberrations on gaussian beam in high NA focusing system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2015, **44**(9):66-72.
李红福,解慧明,张琛,等. 高数值孔径系统多重初级像差对高斯光束的影响[J]. *光子学报*, 2015, **44**(9):66-72.