

doi: 10.3788/gzxb20174607.0722003

激光扫描光学断层成像系统的设计与应用

薛成志^{1,2,4}, 李亚敏^{1,2,5}, 李贵叶^{1,2,3}, 李颖超^{1,2,3}, 胡学娟^{1,2,3}, 陈玲玲^{1,2,3}

(1 深圳市激光工程重点实验室, 广东 深圳 518060)

(2 深圳大学 先进光学精密制造技术广东普通高校重点实验室, 广东 深圳 518060)

(3 深圳大学 光电工程学院, 广东 深圳 518060)

(4 深圳大学 电子科学与技术学院, 广东 深圳 518060)

(5 深圳大学 生命与海洋科学学院, 广东 深圳 518060)

摘 要: 设计了基于 LabVIEW 控制的激光扫描光学断层成像系统, 该系统以准直激光器为光源, 高精度四维平移台为样本定位单元, 光电倍增管为采集单元, 实现了针对小鼠肺等小尺寸样本的三维成像。该系统空间分辨率优于 20 μm , 成像视野大于 1 cm, 通过对离体小鼠肺器官的自发荧光成像, 展示了系统的操作流程、成像结果和初步生物应用, 并探索了它对整个生物器官组织的成像能力。与传统生物医学光学成像方法相比, 该方法具有光子收集效率高、成像样本尺寸大、系统操作简单等优点。

关键词: 激光扫描光学断层成像; 荧光成像; 介观尺寸; LabVIEW; 生物器官; 三维信息; 成像系统

中图分类号: O439

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2017)07-0722003-9

The Design of Scanning Laser Optical Tomography Imaging System and Its Applications

XUE Cheng-zhi^{1,2,4}, LI Ya-min^{1,2,5}, LI Gui-ye^{1,2,3}, LI Ying-chao^{1,2,3},
HU Xue-juan^{1,2,3}, CHEN Ling-ling^{1,2,3}

(1 Shenzhen Key Laboratory of Laser Engineering, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

(2 Key Laboratory of Advanced Optical Precision Manufacturing Technology of Guangdong Higher Education Institutes, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

(3 College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

(4 College of Electronic Science and Technology, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

(5 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: This paper presented a self-designed scanning laser optical tomography mesoscopic imaging system based on LabVIEW and explored its capabilities to image intact biological organs or tissues. The system is consisted of an aligned laser, a four dimension translation stage, a scanning mirror and a photomultiplier tube. The spatial resolution of the system is better than 20 μm with an imaging field of 1 cm. The system operation process and preliminary biomedical applications were demonstrated through the 3-D autofluorescence imaging of a mouse lung. Compared to the traditional biomedical optical imaging techniques, scanning laser optical tomography provides the advantages of high photon collection efficiency, large sample range and easy operation.

Key words: Scanning laser optical tomography; Fluorescence microscopy; Mesoscopic size; LabVIEW; Biological organs; Three-dimensional information; Imaging systems

OCIS Codes: 220.4830; 110.1758; 110.3010; 110.6955

基金项目: 国家自然科学基金(No. 61505112)、深圳市战略新兴产业发展专项资金(No. JCYJ20150525092941015)、深圳市高端人才启动和深圳大学项目(No. 201512)和深圳市科技计划基础研究项目(No. JCYJ20150625101401072)资助

第一作者: 薛成志(1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物医疗光子学. Email: xue_c_z@sina.cn

导师(通讯作者): 陈玲玲(1985-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为荧光多维度成像、三维介观光学成像. Email: l.chen10@szu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-23; **录用日期:** 2017-03-14

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

0 引言

在生物医疗技术的一系列重大突破中都缺少不了生物成像技术,它是研究生物、材料等领域的重要工具.在20世纪中后期,生物成像技术得到了飞跃的发展,利用生物样本与激光之间的相互作用,涌现出了各种各样的光学成像技术,而生物成像技术可分为宏观成像技术和微观成像技术.宏观成像技术有X射线计算层析成像(X-Ray Computed Tomography, CT)、核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance Imaging, MRI)成像、超声波成像等,它们的成像样本尺寸较大,并且具有较强的样本穿透能力,但在分辨细微结构时其空间分辨率不够,同时,它们也不能结合功能强大的荧光显微成像技术^[1-3].微观成像技术有共聚焦成像、双光子成像等,他们能够结合荧光成像技术,可在亚毫米生物样本尺寸下观察到样本细微的内部结构,具有高达微米甚至亚微米量级的空间分辨率,但受限光学特性,其成像深度有限,无法实现毫米至厘米级的直接成像^[4-5].

目前,生物研究已由单个细胞或单层细胞研究发展到对生物体的完整器官、组织,甚至是整个动物模式的研究,如老鼠的心、肺、以及斑马鱼等,以期获得完整真实的生理特性.研究中要求生物样本尺寸在介观(mm~cm)量级,且成像具有较高的空间分辨率,因此促生了介观三维光学成像技术的出现.2002年,英国医学研究理事会人类遗传所的J. Sharpe等在研究胚胎发育过程中基因和蛋白质表达时提出了光学投影断层成像(Optical Projectin Tomography, OPT)^[6]技术,从不同角度获得样本的二维投影图像,然后通过算法重组得到样本的三维立体信息,可以实现三维立体荧光/吸收的光学成像,成像深度可达毫米,同时具有微米级别的空间分辨率.但由于该技术是广场成像,并要考虑成像光学的景深需覆盖整个样本,因此采用了较小的数值孔径NA,降低了荧光光子的收集效率,易引起光致漂白和光毒性问题.在图像采集时使用了CCD或sCMOS,由于两者的像素探测器存在非线性效应等问题,容易导致伪像的产生.为了解决这些问题,2011年,德国汉诺威大学在OPT的基础上提出了改进的介观成像技术-SLOT(Scanning Laser Optical Tomography, SLOT)^[7-8],并成功地对一些离体生物器官进行了成像,在2012年成为光学热点.此外,介观成像技术还有选择性平面照明显微镜(Selective Plane Illumination Microscopy, SPIM)^[9-10]成像,该技术利用柱透镜产生的光片激发样本,在垂直光片的方向用成像光学和CCD进行图像采集.这三种成像技术是当今对介观尺寸的生物样本提供高精度的三维结构信息的主要成像方式.

目前,国际上已经开始研究高成像效率的SLOT成像系统,而国内在此方向研究较少.针对这一现状,本文自主研发了基于LabVIEW^[11]操控的SLOT介观三维光学成像系统,介绍了其硬件组成、操控平台、软件重组和生物实验,并将成像结果与共聚焦成像及光片成像技术结果进行了比较,并总结了针对不同尺寸样本成像时的技术选择.

1 激光扫描光学断层成像系统

SLOT系统成像的基本原理类似X-Ray CT成像,都是利用在一系列角度下采集的二维投影图像重组得到样本三维内部信息.不同的是SLOT采用的光源为可见光,相比较X-Ray,大大降低了光源对样本的损伤,同时可以采用具有丰富参量的荧光对样本进行各式各样生物标记,实现对样本的吸收或荧光三维成像.

1.1 硬件模块

在系统设计中,为了达到理想的成像效果,系统的各个部分需精确设计和调试,尤其是扫描振镜和移动旋转定位平台,因为直接影响到成像的空间分辨率和伪像的产生,需要在成像前进行人工校准.实验中所搭建SLOT系统的结构如图1.

①一束激光(激光光源未画出)通过功率衰减片进入光学系统.②一个2~8×的可变扩束器用于调整激光光束的直径从而调整聚焦后激光光斑大小,同时起准直激光光束的作用.③一个小孔光阑用于去除杂散光,同时调整照明光学系统的数值孔径(Numerical Aperture, NA).扫描振镜④和场镜⑤结合在一起,允许激光扫描样本获得所需的投影图像.激光光束聚焦到样本正中间,而样本放于比色皿⑥中,里面填充着折射率匹配液.投影角度通过旋转台⑦控制.透射光由透镜聚集到光电二极管探测器(Photodiode Detector, PD)⑧,形成透射光成像.散射光和荧光由侧面的透镜系统聚集,由光电倍增管(Photomultiplier, PMT)⑨所探

测,形成荧光成像,其成像光谱范围由滤波片⑩来选择. SLOT 系统可以结合荧光成像技术,利用荧光分子的特异性来标记样本,进行激发式特异性成像. 该 SLOT 系统包括光路模块、样本放置模块、信号探测模块、信号采集模块四部分. 其中,光路模块提供照射样本的扫描激光;样本放置模块用来放置样本以及调整样本位置;信号探测模块主要是实现信号放大以及光电转换;而信号采集模块实现电信号的采集,最终能够在计算机中形成投影图像.

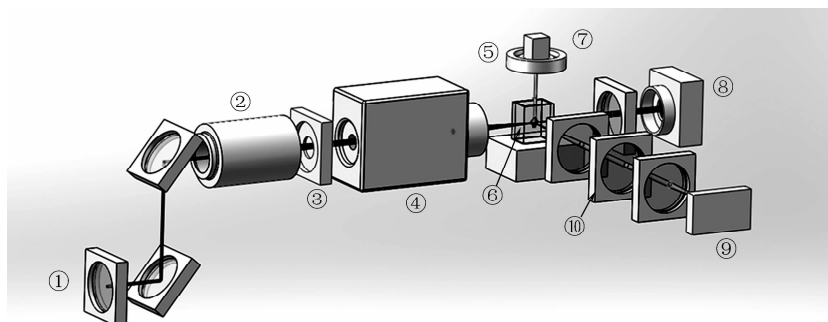


图 1 SLOT 系统结构

Fig. 1 Schematic drawing of SLOT setup

1.1.1 光路模块组成及功能

光路模块主要由半导体激光光源、可变扩束器、小孔光阑、扫描振镜及场镜等组成,目的是产生样本扫描激光.

激光光源波长的选择根据开展研究的对象特性而定,如 GFP 特性或 YFP 特性等. 扩束器用来调整激光光束的直径,放置在扩束器后的小孔光阑用于调整光学系统聚焦后激光光斑大小和系统的数值孔径(NA). 扫描振镜和场镜(激光扫描聚焦镜)结合,控制产生扫描样本所需的激光,同时也聚焦高斯光束和校正像差弥补系统场曲以及畸变的作用.

实验中,研究对象为自发荧光下的小鼠肺,选择的半导体激光器(MLD 488, Cobolt 06 Series, Sweden)波长为 488 nm,具有连续准直输出,输出最大功率为 200 mW,在孔径处的光束直径为 $700 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$. 采用的扩束器为 $2 \sim 8 \times$ (Broadband VIS $2 \sim 8 \times$ Variable Beam Expander, Edmund)可调扩束器,以方便不同场合使用. 场镜的焦距为 100 mm,工作距离为 126.8 mm. 扩束器扩束的倍数根据样本尺寸以及成像分辨率来选择,扩束之后的激光通过扫描振镜扫描样本,在系统中,扫描激光光束的方向与旋转轴方向垂直,即垂直照射扫描样本.

1.1.2 样本放置模块及功能

样本放置模块主要由四维平移台、旋转电机、比色皿等组成. 用于 SLOT 系统中调整样本位置、带动样本旋转以及对样本进行折射率匹配.

在成像时,为了固定样本,将样本包埋在琼脂中,然后将包埋有样本的琼脂固定到旋转台上. 对于实验中不同的成像样本,根据需求,也可以采用其他的样本放置方式,如可将样本封装在毛细玻璃管中,利用自制样本夹持器自动锁定毛细玻璃管并使其处在旋转台旋转轴处. 样本须浸泡在匹配液中进行折射率匹配,减少光的散射. 匹配液的选择根据实验而定,如水、甘油、苯甲醇(BABB)等.

四维平移台装置包括上下、左右、前后和旋转四个维度,由三维平移台、高精度旋转台以及连接装置组成,主要作用是移动样本,调节其空间位置,使其处在系统装置的焦平面附近,这样探测器才能够捕捉到清晰的样本图像. 在投影时,为了防止伪像^[12]的产生,必须通过平移台调整旋转轴中心,使之与投影图像的像素中心相重合. 该系统使用的旋转电机精度为 $490.866 \mu\text{rad}$ (NM08AS-T4, ZABER),最大速度可达 2433.4 rpm,平移台行程为 25 mm,分辨率可达 0.001 mm,平移台可手动或电动调节.

1.1.3 信号探测模块组成及功能

信号探测模块由光电二极管、光电倍增管、透镜系统以及滤波片组成,主要进行光信号放大以及光电转换.

探测器是该模块的核心,用于收集光信号.由于激发产生的荧光信号比较微弱,因此必须选择灵敏度高、增益可调的光电探测器.该系统可进行双通道同时投影成像,在透射光通道,穿透过样本的激光通过透镜汇聚到PD,产生透射光投影,在荧光成像通道,荧光由位于比色皿侧面的透镜系统(两个平凸透镜和一个荧光滤波片)聚集,最后被PMT所探测.PMT探测到的光频谱范围可通过荧光滤波片来选择.该系统中使用的光电二极管探测光功率可达10 mW(PDA36A, THORLABS, USA),可探测波长范围350~1100 nm,带宽10 MHz,最大响应电压可达10 V,增益可调,而光电倍增管的探测灵敏度为1 V/nW(H9301, HAMAMATSU, Japan),可探测波长范围185~900 nm,带宽为200 kHz,最大响应电压可达1 V,其增益连续可调,实验中,可根据具体荧光强度调节增益电压,本实验增益电压调为0.289 V.

1.1.4 信号采集模块组成及功能

信号采集模块主要由数据采集卡组成,其主要功能是采集探测器产生的电压信号,输入计算机,生成投影的数字图像.

该系统中,有两个通道成像,因此需要两个模拟信号输入口.本系统采用拥有16AI,24DIO,2AO的数据采集卡(NI 6361, NATIONAL INSTRUMENTS, USA),采集速度最大可达2 MS/s,ADC分辨率为16位,最大输入电压10 V.

在采集图像时,采集速度应结合扫描振镜的扫描速度综合考虑,一般情况下两者应当实现同时同步.但由于技术的发展,采集速度可远超过扫描速度,因此,可以利用两者异步的方式,充分利用采集卡的性能.

1.2 软件模块

在SLOT系统中,为了让系统各个模块协调运转、数据自动采集并存储,我们开发了相应的SLOT系统控制程序,可通过软件获得样本在不同角度下的二维投影图像,并可通过滤波反投影算法^[12](Filtered Back Projection, FBP)重建,得到样本的虚拟切片,最后可由成像软件如Amira、Imaris等重建出样本的三维图像,并进行数据分析.

1.2.1 系统控制采集模块

在该系统中,为了实现自动化,同时提高采集效率,我们开发了配套的控制采集软件,实现系统各个模块集中控制、数据自动采集并存储.

控制采集模块基于LabVIEW软件编写,在SLOT系统中,控制采集系统主要由扫描振镜模块、旋转电机模块、数据采集模块三部分构成,整个系统的软件流程图如图2所示.

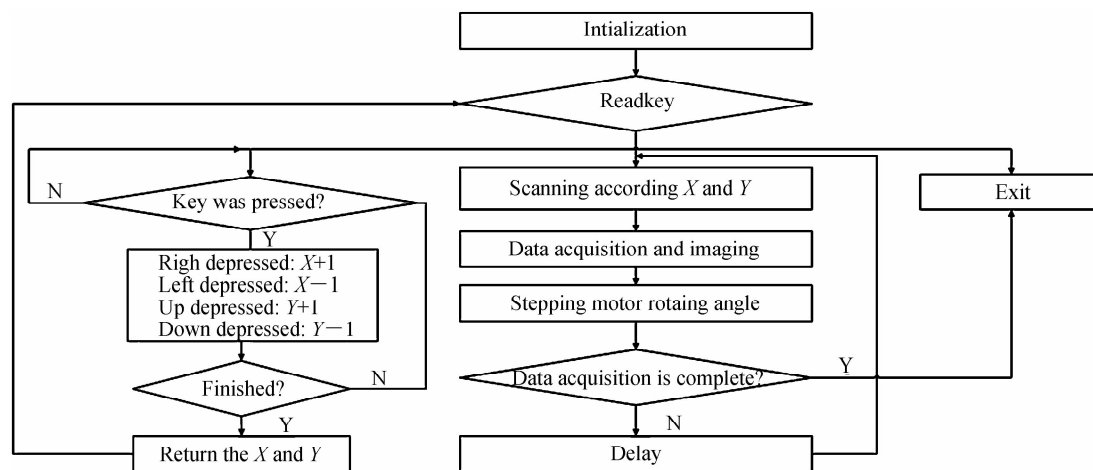


图2 软件程序流程

Fig. 2 Flow chart of software program

扫描振镜模块控制着扫描初始点的选择,初始点也就是投影图像像素的中心点,采集的图像以初始点为中心,上下左右对称,主要是为了减小投影图像的畸变误差.同时,该模块产生X方向、Y方向的扫描电压,扫描电压范围由所成像的样本尺寸决定,在每一个投影角度下,激光光束将通过扫描振镜在垂直于光轴方向上依照一个方形网格进行扫描.旋转电机模块控制着投影角度的选择.在该实验中,采用的步进角度为 0.9° ,可满足一般成像要求.数据采集模块控制着光电二极管和光电倍增管的数据采集以及图像处理、存储.系统

控制软件中最为重要的是实现振镜扫描和通道采集的同时同步,只有这样才能得到精确的投影数据,整个控制系统的采集模块界面如图 3.

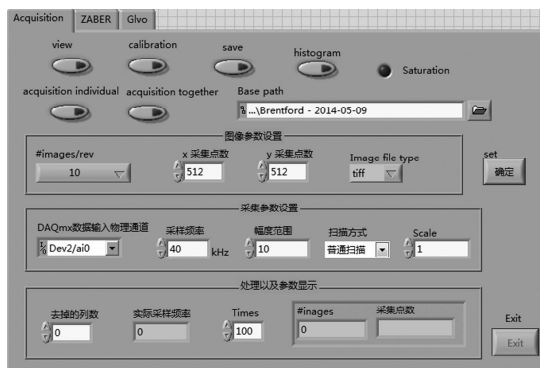


图 3 系统控制采集模块界面

Fig. 3 Interface of system control and data acquisition module

在系统控制采集模块界面,可通过选项卡在扫描振镜模块、旋转电机模块、数据采集模块之间切换,并且,为了操作方便、快捷,通过多次测试,软件把一些常用设置固定为默认值,缩短了参数设置过程.通过该软件,系统实现了自动采集并存储,提高了实验效率和稳定性.

1. 2. 2 图像重建模块

图像重建模块是利用滤波反投影算法对已经采集的投影图像进行断层重建,获取样本的二维切片,最后可通过图像处理软件获得样本的三维结构图.断层重建的关键理论是傅里叶切片定理,也就是中心切片定理.即一个物体在任何角度下投影的傅里叶变换等于同一物体二维傅里叶变换在同一方向上得到的直线^[13].傅里叶切片定理如图 4.

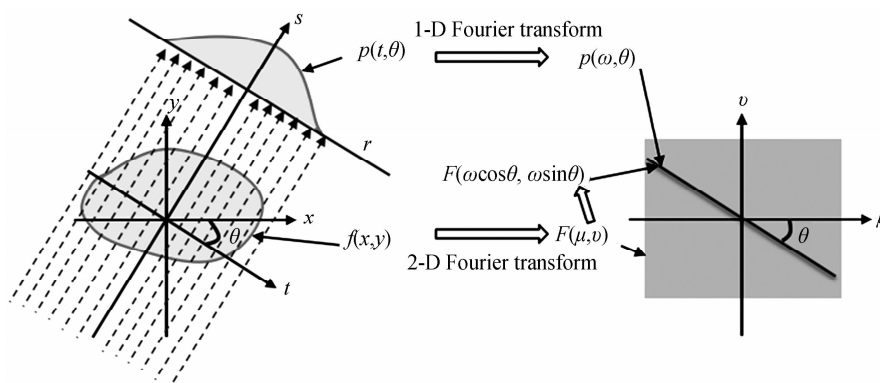


图 4 傅里叶切片定理图解

Fig. 4 Illustratin of fourier slice theorem

该系统中,滤波反投影算法基于 Matlab 编写,其中在重建前的重要一步是计算出旋转中心与图像中心线偏差,虽然在采集投影图像之前进行了校准,但由于是手动人工校准,存在一定误差,如果直接进行重建,将会产生伪像,使得重建图像模糊,严重时会使重建结果失去意义.在本成像软件中,通过计算图像相似系数的方法来确定中心偏差数值,从而确定旋转轴中心位置,之后,成像软件自动进行校准,然后继续三维重建.

通过傅里叶切片定理,结合投影的特性,可以得出滤波反投影公式为

$$f(x, y) = \int_0^\pi d\theta \int_{-\infty}^{\infty} P(\omega, \theta) e^{i2\pi\omega r} |\omega| d\omega = \int_0^\pi \left[\int_{-\infty}^{+\infty} |\omega| P(\omega, \theta) e^{i2\pi\omega r} d\omega \right] d\theta \quad (1)$$

式(1)表明,变换到频域的二维图像通过斜坡函数滤波后,再反变换到时域进行 360°的反投影.整个投影图像重建模块界面如图 5.



图5 图像重建模块界面

Fig. 5 Interface of image reconstruction module

在图像重建模块中,既可以对以图片格式保存的投影图像进行重建,也可以对以 Matlab 格式保存的投影图像进行重建.同时,如果成像有多个通道,在软件中可自由选择,并可观看投影动画.模块中也对投影图像进行了一些简单处理,如图像翻转、剪切等,以适应不同成像要求.最后,在重建过程中,为了提高重建速度,使用了并行图像处理器(GPU)^[14]进行重建计算,通过与 CPU 重建对比,重建速度可提高 2 倍以上.

通过实验,本成像软件对 400 幅 512×512 大小的二维图像重建成 $512 \times 512 \times 512$ 大小的三维图像,重建出三维体数据后,可通过图像处理软件 Amira 或 ImageJ 等进行图像分析,得到图像的三维结构图.

2 生物样本制备

大部分的生物样本本身并不透明,光在穿透样本时,导致大部分的光不是以弹道光的形式通过样本,产生了大量散射光,降低了样本穿透深度.因此该类生物样本在成像前,须经过光学清洗使其透明化.

在实验中,所使用的实验样本材料为:WT(野生型)SPF 级 4 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠(购自广东省医学实验动物中心),并且光照 12h 黑暗 12h 处理,提供充足的 SPF 级食物和水,动物实验程则按照深圳大学生命海洋与科学学院实验动物管理细则进行.样本的处理过程如图 6 所示,包含有样本准备过程和清洗过程.

在样本准备过程,4 周龄小鼠用 4%水合氯醛 0.2 ml/20g 腹腔注射深度麻醉,接着进行心脏灌注,先灌注磷酸缓冲盐溶液 PBS(PH7.4)包含 10 U/ml 肝素钠^[15]去除血液,接着灌注 4%多聚甲醛固定组织(PH7.4, 1×PBS 配置),用手术器械取出组织器官继续在 4%多聚甲醛中 4℃固定过夜.在样本清洗过程,从固定液中取出组织器官,室温下用 PBS 洗 3-4 次,每次半小时去除多聚甲醛,接着将器官包埋在 1.5%琼脂(超纯水配置)中,然后把包埋好的样本转入到 30%、60%、90%、96%、100%甲醇溶液中梯度脱水,30%、60%、90%甲醇每个溶液脱水至少 4h,96%甲醇脱水 12h,100%甲醇脱水至少 2 次每次 12h,最后将样本放入 BABB^[16-20](苯甲醇:苯甲酸苄酯,体积比 1:2 混合,折射率 $RI=1.55$)溶液中清洗至透明(至少 24h).图 7(a)为处理之前的小鼠肺,图 7(b)为处理后的小鼠肺.

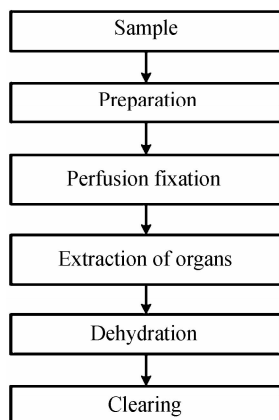


图6 样本处理流程图

Fig. 6 Flow chart of sample preparation

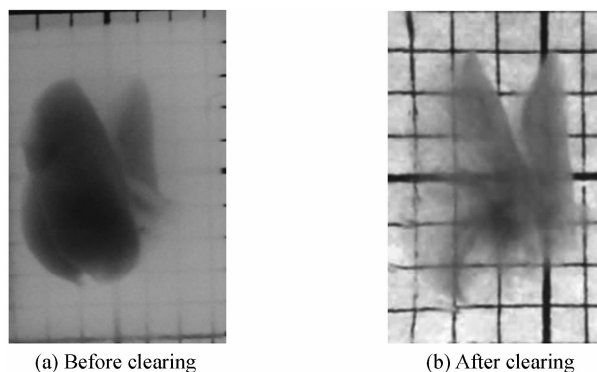


图7 小鼠肺处理前和处理后图

Fig. 7 Mouse lung before clearing and after clearing

3 实验结果

实验中,成像对象为小鼠肺的自发荧光,因此采用波长为 488 nm 的激光器作为激发光源,而在荧光成像通道中,选用中心波长为 525~539 nm 的窄带滤光片。

在实验进行之前,首先,检查所有设备的连接及整个系统的运行状态,其次,调节样本位置,使其处在系统的景深之中,同时在正式采集之前,还必须进行图像像素中心与旋转轴中心相重合的人工校准.选择探测器的增益电压为 0.289 V,采集投影图像数为 400,所以旋转台步进角为 $0.9^\circ/\text{步}$,旋转角度为 360° ,采集像素点为 512×512 ,扫描范围为 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,采集频率为 40 kHz,整个投影采集时间为 40 min(包括电机旋转,数据处理、存储)。

利用成像软件自动计算采集得到的 400 幅二维荧光图像的旋转中心,然后进行三维重建,最后利用 Amira、Imaris 进行三维结构显示及数据分析.图 8(a)、(b)为小鼠重建切片,其中①代表 XY 方向,②代表 XZ 方向,③代表 YZ 方向,图 8(c)为小鼠肺的三维结构图,最终重建后得到的小鼠肺的三维图像空间分辨率为 $20 \mu\text{m}$,景深为 4mm。

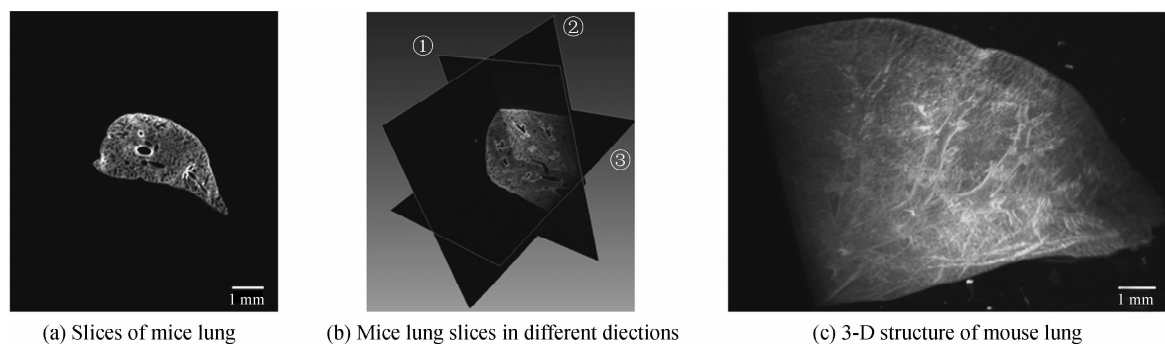


图 8 小鼠肺切片和三维结构图

Fig. 8 Slices and Three-dimensional structure of mouse lung

重建三维图中可以清晰地看到小鼠肺管结构,这是由于支气管壁具有较强烈的自发荧光,因此产生了较高的对比度,在图中,通过放大、缩小和任意切割可以更清楚地看到肺管的尺寸和位置.图 9(a)为利用共聚焦成像系统(LSM 710, Zeiss)对同一小鼠肺进行扫描成像,扫描范围为 $1.42 \text{ mm} \times 1.42 \text{ mm}$,图像尺寸为 512×512 ,像素尺寸大小为 $2.77 \mu\text{m} \times 2.77 \mu\text{m} \times 9.77 \mu\text{m}$.由于整个小鼠肺的厚度有 $3 \text{ mm} \sim 4 \text{ mm}$,共聚焦无法完全扫描穿透小鼠肺,根据实际情况,扫描深度为 $508 \mu\text{m}$.相比较,共聚焦成像技术在针对较小的生物样本有更高精度的成像,但 SLOT 的成像范围更大,成像深度更深.共聚焦技术在针对较大样本时需要对本进行物理切片,但切片技术不仅费时费力而且因其切片过程破坏器官的完整性,以及某些细胞亚细胞结构的连续性,易造成部分信息丢失.同时,在共聚焦中,除焦平面激发的荧光被采集之外,焦平面以外的光子大部分都被针孔挡住,光子利用率低,而在 SLOT 成像系统中,可对所有样本激发的荧光进行采集,具有较高的光子收集效率。

图 9(b)是介观成像技术-SPIM 对相同小鼠肺的三维成像图,该成像系统也由实验室自主搭建.利用该系统对小鼠肺进行三维成像时,受限于光片尺寸大小,不能够一次完成整个小鼠肺的成像,图 9(b)是两部分数据拼接合成的,每一部分数据的成像范围为 $1.22 \text{ mm} \times 0.9988 \text{ mm}$,成像深度为 3.2 mm ,像素尺寸大小为 $0.908 \mu\text{m} \times 0.908 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$.从图中可以看出,SPIM 系统能够不进行物理切片地对整个小鼠肺进行清晰成像,但成像范围较小,当对大尺寸样本成像时,必须先对样本的每一小块进行成像,然后进行图像拼接形成整体三维图,这有可能造成图像细节水平无法分辨.相比较,SLOT 成像技术的成像范围大,数据占用空间小,系统操作简洁等优点。

通过对比,共聚焦技术更适合用于微观样本(\sim 百微米),针对介观范围的生物样本,则需要相应的介观成像技术.在成像小于等于毫米的介观生物医学样本时,光片成像技术有着更高的分辨率,但当样本大于等于毫米,甚至到厘米量级,SLOT 技术对整体样本具有更好的成像效果。

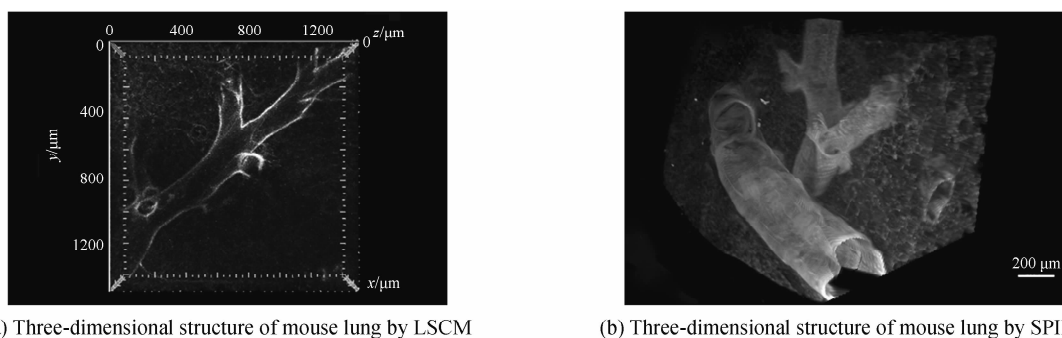


图9 小鼠肺的LSCM和SPIM三维结构
Fig. 9 Three-dimensional structure of mouse lung by LSCM and SPIM

4 结论

本文根据SLOT成像理论,完成了整套成像系统的设计,包括硬件模块、软件模块以及图像重建模块,系统具有良好的人机交互界面,自由度大.同时,也完成了生物样本的初步成像,实验结果验证了系统的成像能力,并与其它类型的成像技术做了简单对比.本文通过实验总结出:采集区域过大时会产生严重图像畸变,这是因为扫描电压与扫描距离的线性关系随着扫描区域的扩大而极速下降,这可通过场镜的校准来解决.本课题组下一步研究的方向有:1)伪像校准;2)降低采样时间;3)进行多维度成像;4)活体成像等.

参考文献

- [1] SKELLNER M, HEIDRICH M, BEIGEL R, *et al.* Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (SLOT)[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2012, **113**(6): 957-983.
- [2] BROWN R H, IRVIN C G, ALLEN III G B, *et al.* An official ATS conference proceedings: advances in small-animal imaging application to lung pathophysiology[J]. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, **5**(5): 591-600.
- [3] NTZIACHRISTOS V, BREMER C, WEISSLEDER R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging[J]. *European Radiology*, 2003, **13**(1): 195-208.
- [4] NAVA R G, LI W, GELMAN A E, *et al.* Two-photon microscopy in pulmonary research [C]. *Seminars in Immunopathology*. Springer-Verlag, 2010, **32**(3): 297-304.
- [5] KAMIOKA H, HONJO T, TAKANO-YAMAMOTO T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy[J]. *Bone*, 2001, **28**(2): 145-149.
- [6] SHARPE J, AHLGREN U, PERRY P, *et al.* Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies[J]. *Science*, 2002, **296**(5567): 541-545.
- [7] LORBEER R A, HEIDRICH M, LORBEER C, *et al.* Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph[J]. *Optics Express*, 2011, **19**(6): 5419-5430.
- [8] TINNE N, NOLTE L, ANTONOPOULOS G C, *et al.* Three-dimensional imaging of intracochlear tissue by scanning laser optical tomography (SLOT)[C]. SPIE BIOS. International Society for Optics and Photonics, 2016: 96892H-96892H-6. 0.
- [9] HUISKEN J, SWOGER J, DEL BENE F, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, **305**(5686): 1007-1009.
- [10] DODT H U, LEISCHNER U, SCHIERLOH A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2007, **4**(4): 331-336.
- [11] CHEN Shu-xue, LIU Xuan. LabVIEW Codex [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2011. 陈树学, 刘萱. LabVIEW 宝典[M]. 北京: 电子工业出版社, 2011.
- [12] ANTONOPOULOS G C, PSCHENIZA D, LORBEER R A, *et al.* Correction of image artifacts caused by refractive cylindrical surfaces in scanning laser optical tomography[J]. *Biomedical Engineering Biomedizinische Technik*, 2014, **59**: S514-S517.
- [13] HSIEH J. Computed tomography principle, design, artifacts and recent advances[M]. ZHANG Chao-zong, GUO Zhi-pin, WANG Xian-gang, transl, *et al.* Beijing: Science Press, 2006. HSIEH J. 计算机断层成像技术: 原理, 设计, 伪像和进展[M]. 张朝宗, 郭志平, 王贤刚, 等译. 北京: 科学出版社, 2006.
- [14] VINEGONI C, FEXON L, FERUGLIO P F, *et al.* High throughput transmission optical projection tomography using low cost graphics processing unit[J]. *Optics Express*, 2009, **17**(25): 22320-22332.

- [15] SUSAKI E A, TAINAKA K, PERRIN D, *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis[J]. *Cell*, 2014, **157**(3): 726-739.
- [16] DODT H U, LEISCHNER U, SCHIERLOH A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2007, **4**(4): 331-336.
- [17] ERIKSSON A U, SVENSSON C, HORNBLAD A, *et al.* Near infrared optical projection tomography for assessments of β -cell mass distribution in diabetes research[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013,(71): e50238-e50238.
- [18] BECKER K, JÄHRLING N, SAGHAFI S, *et al.* Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains [J]. *PloS One*, 2012, **7**(3): e33916.
- [19] RICHARDSON D S, LICHTMAN J W. Clarifying tissue clearing[J]. *Cell*, 2015, **162**(2): 246-257.
- [20] SCHWARZ M K, SCHERBARTH A, SPRENGEL R, *et al.* Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains[J]. *PloS One*, 2015, **10**(5): e0124650.

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China(No. 61505112), Shenzhen Special Funding for the Development of Strategic Emerging Industries (No. JCYJ20150525092941015), Shenzhen High-end Talent and Shenzhen University Program (No. 201512), Shenzhen Science and Technology Plan Projects of Basic Research(No. JCYJ20150625101401072)