

基于全场光学相干层析术的猪肝组织亚细胞成像

朱越,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 建立全场光学相干层析系统(OCT),可对生物细胞进行高分辨率层析成像。该系统基于Linnik干涉结构,采用低相干白光光源卤钨灯照明和大数值孔径的显微物镜,理论分辨率可达 $0.7\ \mu\text{m} \times 0.7\ \mu\text{m}$ (横向 \times 轴向)。系统采用电荷耦合元件(CCD)采集数张样品和参考镜的干涉图,通过三步移相算法获取层析图,最后合成三维图像。与荧光标记细胞等其他生物组织成像的方法相比,全场OCT成本低廉、对细胞无损伤、分辨率高。该系统能够完成对洋葱表皮细胞和猪肝组织切片细胞等生物组织实现层析成像,且分辨率高、成本低、结构简单便于调节,为实现高分辨率光学相干层析成像提供了简单易行的方法。

关键词 医用光学;全场光学相干层析术;移相干涉术;生物组织

中图分类号 TN247

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.34.003

Imaging of Liver Biopsy Cells with Full-field Optical Coherence Tomography

ZHU Yue, GAO Wanrong

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

Abstract An interference microscope for ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography (FFOCT) system was developed for imaging of biological media. The experimental setup is based on a Linnik-type interferometer illuminated by a low coherence tungsten halogen lamp and equipped with high numerical aperture microscope objectives. The theoretical resolution of the system is $0.7\ \mu\text{m} \times 0.7\ \mu\text{m}$ (lateral \times axial). En-face tomographic images were obtained by a combination of interferometric images recorded by a smart CCD camera and 3-step phase-shifting algorithm. Previous studies usually used 4-step phase-shifting algorithm with less speed of shifting the phase. Three-dimensional images can then be generated from these tomographic images. Compared with fluorescence labeling image, FFOCT has advantages of low cost, no damage, and ultrahigh resolution. En-face images of onion surface cells and liver biopsy tissue cells showed the excellent performance of the system for generating en-face images of biological tissues. Our system is characterized by its high resolution, low cost and simple arrangement for adjustment, providing a practical method for FFOCT imaging.

Keywords medical optics; FFOCT; phase-shifting interferometry; biological tissue

全场光学相干层析术(full-field optical coherence tomography, FFOCT)于1998年由美国麻省理工大学(MIT) Fujimoto工作组提出^[1],是一种可以对生物组织的横断面进行非接触和非破坏性成像的技术,此后相继有关于该系统的报告^[2-4]。FFOCT使用白光光源且基于并行检测技术,无需横向

扫描即可获得样品的二维图像,与逐点扫描成像相比,不但具有很高的三维分辨率,还具有很快的成像速度。同时,由于白光的价格较低^[5],在很大程度上降低了成本,对医学成像及临床应用有着重大意义。近年来,在国际上被极多运用于活体生物组织和细胞的三维成像,如法国Boccara小组对洋

收稿日期:2014-09-26;修回日期:2014-11-03

基金项目:国家自然科学基金项目(61275198,60978069);教育部博士点基金项目(200802880013);国防基础科研资助项目

作者简介:朱越,博士研究生,研究方向为全场光学相干层析系统,电子信箱:daoxiaomi1991@163.com;高万荣(通信作者),教授,研究方向为生物医学光学,电子信箱:wgao@njjust.edu.cn

引用格式:朱越,高万荣.基于全场光学相干层析术的猪肝组织亚细胞成像[J].科技导报,2014,32(34):33-36.

葱、虾尾、蝌蚪、非洲蛙等生物组织的层析实验^[6-8],日本山形大学使用双电荷耦合元件(CCD)对植物叶片进行的快速层析成像^[9],中国清华大学薛平小组对老鼠胚胎初期的观察实验^[10],这些生物实验的目的都是为临床医学做准备。

本研究搭建的光学系统是基于 Linnik 结构干涉显微系统^[11],相比 Mirau 结构^[12]系统的优势有 3 点。

1) 因为 Mirau 结构的干涉仪在样品和显微物镜间需放置分束器等光学器件,从而要求显微物镜需要很大的工作距,不能使用高倍显微物镜,限制了系统的分辨率,而 Linnik 结构要求使用两个显微物镜,在它们与样品和参考镜之间无需放置其他光学器件,故可以使用大数值孔径显微物镜。

2) Linnik 可以增加偏振干涉部分^[13-15],消除 PZT 移相引起的色差或利用偏振实现快速采集干涉信号。

3) Linnik 结构的两臂可以独立调节。

除了结构的优势外,许多 OCT 系统的光源都是近红外波段的激光^[16],因为激光相干性好,容易得到条纹对比度很高的干涉图,而相干长度是与光谱带宽相关,故轴向分辨率就会被光源的相干长度所限制。本文运用中心波长 550 nm 光谱带宽 200 nm 的白光光源,它具有极低的相干长度,对分辨率的提高有着极大贡献。另外,研究采用科勒照明系统获取均匀的照明光,这样既不会对被测生物组织造成热损伤而且照明范围随时可调。最后,相比于对荧光标记生物组织的成像来说,本研究是无标记成像。众所周知,一般染色剂无法进行生物活体成像或者体内成像,而活体的荧光染色也会对生物组织造成一定伤害,这也是本研究的优势之一。

目前,运用 FFOCT 系统得到猪肝切片细胞的层析图,在国内还没有相关研究。本文呈现基于 Linnik 干涉显微术的 FFOCT 系统,得到洋葱表皮细胞的横断面,以证实系统的层析能力;得到了猪肝组织切片细胞,以证实系统对生物组织高分辨的能力。

1 实验装置及原理

图 1 是搭建的光学系统,包含科勒照明系统和 Linnik 干涉仪。主要器件参数为:采用 Linnik 干涉结构,光源为白光(卤钨灯,12 V/20 W),使用了有均匀照明的科勒照明系统。光谱范围约为 200 nm,中心波长 550 nm,由纵向分辨率公式 $\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \left(\frac{\lambda_0}{\Delta \lambda} \right)$,得到纵向分辨率为 0.7 μm 。一对完全相同的显微物镜(Olympus,放大倍率 20 \times ,数值孔径(NA)=0.5)放置干涉系统的两臂,横向分辨率由公式 $\Delta x = \frac{0.61 \lambda_0}{NA}$ 可得系统横向分辨率的理论值为 0.7 μm 。YAG 晶体放置于参考臂作为参考镜,且附着于锆钛酸铅(PZT)前,通过 PZT 调制光程差,使干涉信号从背景信号中分离出来。用 CCD (Matrox Iris GT300,640 像素 \times 480 像素,像元大小 7.4 $\mu\text{m} \times$ 7.4 μm)记录信号。

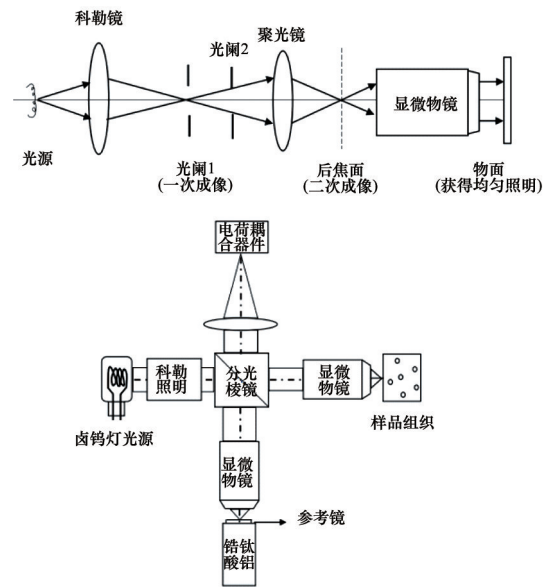


图 1 FFOCT 系统

Fig. 1 FFOCT system

科勒照明系统的目的是为了灯丝的二次成像以得到较均匀的照明光,保证对生物组织没有灼伤。主系统中,光源发出的光束经过完全一致的两臂,分别投射在样品和参考镜上,沿原路返回的参考光与记录样品信息的样品光经过会聚透镜,两个像面会聚到 CCD 叠加发生干涉,利用计算机对获得的图像进行处理,通过移相算法恢复出高分辨的 FFOCT 层析图。其中,PZT 与微位移平台和 CCD 采集均有电脑控制同步信号,使得系统精准移相,严格控制每步长为 $2\pi/3$ 。

FFOCT 之所以能得到高分辨率的组织细胞的原因是,使用的光源为非相干光,样品与参考镜的像只有对应点之间才能发生干涉从而被恢复出来,随着参考镜的轴向移动,可选择样品中与之光程相等的层来进行成像,而其他层的信息将被滤掉,从而实现了层析成像。最后把 CCD 采集到的干涉图进行分析处理,就能得到样品的横断面结构图^[17,18]。其中,宽带光源能提高系统纵向分辨率,大数值孔径能提高横向分辨率。

面阵 CCD 探测器上 (x, y) 点接收到的干涉光强信号可表示为

$$I_d(x, y) = I_0(x, y) + A_i(x, y) \cos[\phi(x, y)] \quad (1)$$

式中, $I_0(x, y)$ 为表示由非相干光形成的背景光强; $\cos[\phi(x, y)]$ 为干涉光强,它随样品和参考镜上对应点 (x, y) 的相位差 $\phi(x, y)$ 而变化; $A_i(x, y)$ 为第 i 层组织的层析图像。为了提取样品的图像信息 $A_i(x, y)$, 必须移除背景光强 $I_0(x, y)$ 和干涉项 $\cos[\phi(x, y)]$ 。

本文采用 3 步移相法。移相法是通过在参考光束和样品光束间引入移相量,采集几幅干涉图像之后,通过对它们的

加减然后相除来获得样品信息。式(1)中存在3个未知量,至少需要采集3幅图像才能求出样品图像信息。为了提高采集速度,本文使用3步移相法,通过PZT驱动器带着参考镜做步长为 $\varphi=2\pi/3$ 的线性移动,引入3 φ 相位,并分别由CCD记录对应所需移相量时的干涉图像 I_1, I_2, I_3 ,3幅干涉图分别为

$$I_1(x,y)=I_0+A_i(x,y)\cos[\phi(x,y)-\varphi] \quad (2)$$

$$I_2(x,y)=I_0+A_i(x,y)\cos[\phi(x,y)] \quad (3)$$

$$I_3(x,y)=I_0+A_i(x,y)\cos[\phi(x,y)+\varphi] \quad (4)$$

每步引入的移相量为 φ ,样品OCT图像由式(5)^[19,20]给出:

$$A_i(x,y)=\frac{[(2I_2(x,y)-I_1(x,y)-I_3(x,y))^2+3(I_1(x,y)-I_3(x,y))^2]^{1/2}}{3} \quad (5)$$

经过实验发现,3步法简便快捷,通过多次测量减小信噪比的方法可以降低噪声。

2 结果与讨论

本文采用压电陶瓷移相。首先对PZT进行标定,然后通

过标定曲线结合PZT驱动器(ThorlabsMDT693A)配套PC端控制软件,输入电压即可获得相应的移相量。三步移相相位为每步 $2\pi/3$,对应步长应为 $\lambda_0/3$ (λ_0 为中心波长550 nm),实际参考镜移动的步长为 $\lambda_0/6$,每一步得到的干涉图都被记录,3幅图可以恢复出一幅横断面。

首先对洋葱细胞进行成像。样品放置于垂直方向可调的微位移平台。手动调节至不同的纵向深度得到该深度的横断面,如将改成高速电动步进电机,可自动扫描纵向深度,即可合成三维图像。生物组织的最大障碍在于细胞水分大,吸收光强且组织透明度高,一旦反射光稍强,干涉信号就被淹没,因此选择匹配的参考镜的材质很重要,本文使用YAG晶体。

图2(a)、(b)为同一洋葱表皮细胞在不同纵深方向的横断面,其中图2(a)恢复出洋葱细胞的细胞壁,而图2(b)恢复出细胞质,其中图2(b)中白色箭头指向的是恢复出的细胞核的轮廓。一般洋葱细胞的宽为15~30 μm ,而细胞核约1~5 μm 。该项实验证实了本文的系统具有很好的层析能力,而不仅仅是恢复细胞的起伏。

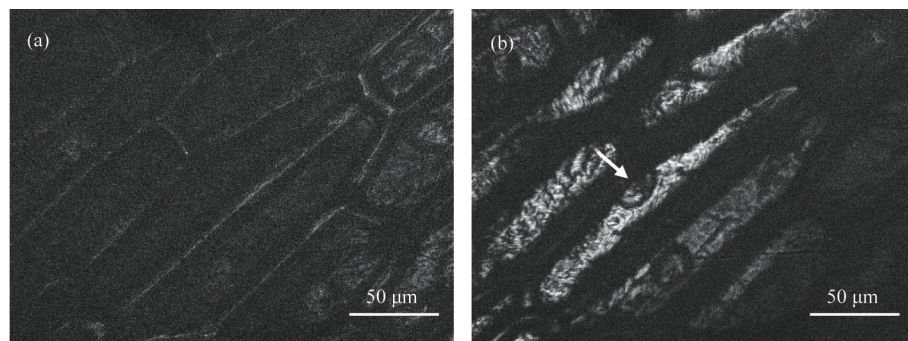
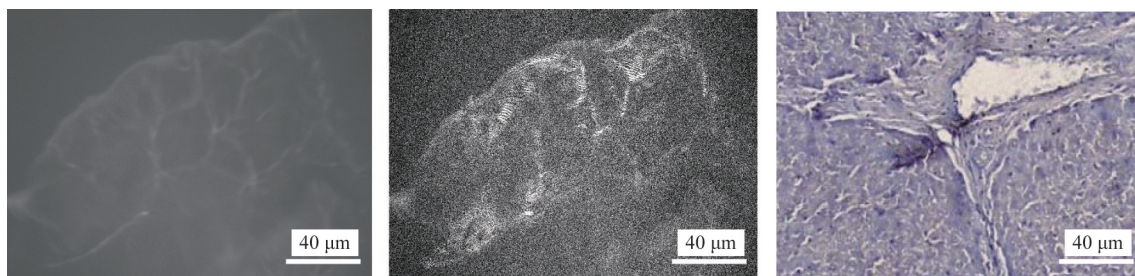


图2 洋葱表皮细胞不同纵深方向的横断面图像

Fig. 2 x,y en-face images of the onion by FFOCT at different depths of onion cells

其次,研究对猪肝组织成像,如图3所示。图3(a)为猪肝组织的显微图像,图3(b)为由本文系统获得的FFOCT图像,图3(c)为化学染色猪肝生物组织标本图像^[21],可以看清猪肝

组织切片的脉络走向及脉络周边的细纹。该项实验仅仅对猪肝组织进行了清洗与切块,没有任何荧光染色标记,图像计算时间只需几 μs 。



(a) 显微图像

(b) FFOCT 图像

(c) 化学染色图像

图3 猪肝组织切片

Fig. 3 Liver biopsy tissue

搭建并利用FFOCT系统对洋葱表皮细胞成像,验证了本系统的层析能力;对猪肝组织的成像,验证了系统对离体组

织可以高分辨的成像。在搭建系统初期的验证实验中,主要对集成电路和洋葱细胞进行层析成像。对集成电路的芯片

成像时反射光很强,所以能看清长度约 180 nm 的细节;当样品变为透明的洋葱表皮,则针对后向散射光的微弱做出了更换参考镜的措施,以匹配两臂的光强;本文运用未经特别处理的猪肝组织,需要保证切面起伏平缓并且擦干血水,否则杂散光会影响成像质量。肝癌在中国乃至亚洲,都是死亡率最高的癌症,如果该系统可以对离体的人体肝脏组织进行成像,找出病变之处,该系统将会很有价值。

3 结论

研究搭建的基于 Linnik 干涉结构的全场光学相干层析系统已经能够获取高分辨的洋葱表皮细胞和猪肝组织切片的光学断层图像,这对生物学、尤其是人体临床医学辅助诊断有着极大的贡献。传统的石蜡切片至少需要 1~3 d 制作切片,而冰冻切片所需要的技术成本也较高。本文提出的非荧光标记、非入侵性成像技术可以应用于肝脏等重大器官癌症术中的突发状况,例如癌细胞扩散、术前误诊,简便且快速的 FFOCT 系统可以为挽救生命争取更多的时间。目前正在对系统进行改进,以期能够对临床诊断样品实现大视场三维实时成像。

参考文献 (References)

- [1] Beaufort E, Boccara A C. Full-field optical coherence microscopy[J]. Optics Letters, 1998, 23(4): 244-246.
- [2] Dubois A, Vabre L, Boccara A, et al. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope[J]. Applied Optics, 2002, 41(4): 805-812.
- [3] Dubois A, Grieve K, Moneron G, et al. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography[J]. Applied Optics, 2004, 43(14): 2874-2883.
- [4] Dubois A, Moneron G, Grieve K, et al. Three-dimensional cellular-level imaging using full-field optical coherence tomography[J]. Physics in Medicine and Biology, 2004, 49: 1227-1234.
- [5] Hariharan P, Roy M. White-light interferometry phase-stepping for surface profiling[J]. Journal of Modern Optics, 1994, 41(11): 2197-2201.
- [6] Latrive A, Boccara A C. *In vivo* and *in situ* cellular imaging full-field optical coherence tomography with a rigid endoscopic probe[J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(10): 2897-2904.
- [7] Nahas A, Bauer M, Roux S, et al. 3D static elastography at the micrometer scale using full field OCT[J]. Biomedical Optics Express, 2013, 4(10): 2138-2149.
- [8] Moneron G, Boccara A, Dubois A. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2007, 32(14): 2058-2060.
- [9] Akiba M, Chan K P, Tanno N. Full-field optical coherence tomography by two-dimensional heterodyne detection with a pair of CCD cameras[J]. Optics Letters, 2003, 28(10): 816-818.
- [10] Zheng J, Lu D, Chen T, et al. Label-free subcellular 3D live imaging of preimplantation mouse embryos with full-field optical coherence tomography[J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 17(7): 070503-1-070503-3.
- [11] Vabre L, Dubois A, Boccara A C. Thermal-light full-field optical coherence tomography[J]. Optics Letters, 2002, 27(7): 530-532.
- [12] Lu S, Chang C, Kao C. Full-field optical coherence tomography using immersion Mirau interference microscope[J]. Applied Optics, 2013, 52(18): 4400-4403.
- [13] Watanabe Y, Hayasaka Y, Sato M, et al. Full-field optical coherence tomography by achromatic phase shifting with a rotating polarizer[J]. Applied Optics, 2005, 44(8): 1378-1392.
- [14] Moreau J, Lorient V, Boccara A. Full-field birefringence imaging by thermal-light polarization-sensitive optical coherence tomography[J]. Applied Optics, 2003, 42(19): 3800-3810.
- [15] SeobPark K, Choi W J, Eom T J, et al. Single-camera polarization-sensitive full-field optical coherence tomography with polarization switch[J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(10): 100504-1-100504-3.
- [16] Srivastava V, Nandy S, Mehta D S. High-resolution full-field spatial coherence gated optical tomography using monochromatic light source [J]. Applied Physics Letters, 2013, 103: 103702-1-103702-5.
- [17] 杨亚良. 全场光学相干层析成像研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008. Yang Yaliang. Full-field optical coherence tomography[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [18] 李静娜. 全场光学相干层析成像的信号分析和试验研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2008. Li Jingna. Signal analysis and experimental study of full-field optical coherence tomography[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2008.
- [19] Shoude C, Youxin M, Sherif S, et al. Full-field optical coherence tomography used for security and document identity[J]. Proceedings of SPIE, 2006, 6042: 60420Q-1-60420Q-9.
- [20] Fischer D G, Ovryn B. Phase shifting optical coherence tomography[J]. SPIE, 2001, 4251: 97-101.
- [21] 杨艳艳, 张改平, 王选年, 等. 猪瘟病毒单克隆抗体的制备及其免疫组织化学研究[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(10): 782-786. Yang Yanyan, Zhang Gaiping, Wang Xuannian, et al. Preparation and immune histochemical studies of monoclonal antibody against CSFV [J]. Chinese Veterinary Science, 2006, 36(10): 782-786.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》“卷首语”栏目征稿

“卷首语”栏目每期邀请一位中国科学院院士和中国工程院院士就重大科技现象、事件,以及学科发展趋势、科学研究热点和前沿问题等,撰文发表个人的见解、意见和评论。本栏目欢迎院士投稿,每篇文章约 2000 字,同时请提供作者学术简历、工作照和签名电子文档。投稿邮箱:kjdbbjb@cast.org.cn。