

文章编号: 1001-3806(2006)02-0123-03

荧光法成像系统信噪比的实验研究

郑卫峰, 李步洪, 谢树森, 林永钟, 周川钊

(福建师范大学 激光与光电信息科技学院, 福州 350007)

摘要: 在药物荧光成像系统中较好的荧光像的信噪比和分辨本领, 可最大限度地克服肿瘤诊断中出现的假阳性, 降低误诊率。理论分析并近似计算了用蓝光作为诊断早期鼻咽癌的激发光源时, 信号和背景光的亮度分别为 $4.5 \times 10^{-2} \text{ ln} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$ 和 $877 \text{ ln} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$ 。结果表明, 为了能从背景中分辨出信号, 窄带滤光片的荧光透过率应尽可能大, 而背景光要截止到原来的 4.3×10^{-5} 的量级。根据有色玻璃的吸收特性, 实验时适当增加光在玻璃中的行程和带宽, 使信号和背景光的透过率之比增大, 从而得到较好的荧光像的信噪比和分辨本领, 提高了图像目视探测的灵敏度。

关键词: 医用光学与生物技术; 药物荧光成像; 窄带滤光片; 信噪比; 鼻咽癌

中图分类号: Q632 文献标识码: A

Study on signal-to-noise ratio of drug-fluorescence imaging system

ZHENG Wei-feng, LI Bu-hong, XIE Shu-sen, LIN Yong-zhong, ZHOU Chuan-zhao

(School of Physics and Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract The quantity value of signal and background light of fluorescence imaging system of nasopharyngeal carcinoma is calculated when photosensitizer is excited by the light at the wavelength of 488nm. In order to distinguish the signal from the background light the light-transmission coefficient of a narrow-band filter must be as great as possible and noise must be reduced by a factor of 4.3×10^{-5} . According to the absorption characteristic of colored glass the ratio of signal transmission coefficient to background light transmission becomes large with optical-path increased suitably. If the thickness of the colored glass and the band width of the narrow-band filter now on hand is increased properly, fine signal-to-noise ratio and resolving capability of fluorescence imaging can be obtained.

Key words medical optics and biotechnology, drug-fluorescence imaging narrow-band filter signal-to-noise ratio nasopharyngeal carcinoma

引 言

激光诱导荧光诊断肿瘤作为一种无活检技术, 在实时、有效地诊断和定位早期肿瘤方面较常规的方法如: X 光检查、核医学、CT 层析术和白光内镜等有突出的优点。癌症的早期诊断, 特别是对一些粘膜下型的肿瘤如鼻咽癌有着重要的意义。它是提高患者 5 年生存率和彻底治愈的首要前提。目前, 人们已经开始用氩离子激光作为荧光法诊断早期鼻咽癌的激发光源。考虑用氩离子激光的原因是鼻咽部表面覆盖粘膜, 激光要能穿透粘膜到达病变部位, 再者 Ar^+ 激光 488nm 和 514.5nm 处在光敏剂 (以血卟啉衍生物 HpD 为例) 的第二吸收峰附近。本研究小组的前期工作表明, 488nm 激光更适合作

光动力活检鼻咽癌的激发光源^[1]。但 488nm 不在 HpD 的主吸收峰上, 其吸收强度约为主峰的 0.054 倍, 可见药物对激发光吸收效率很低, 产生的荧光强度微弱, 相比之下, 背景噪声如: 光源的放电辉光、组织体表面激发光的漫反射光及周围环境光亮度等较大, 荧光像信噪比不好, 这就造成增大利用计算机图像处理技术对荧光图像进行计算处理的难度^[2]。作者根据有色玻璃对不同波长的吸收率不同, 通过增加窄带滤光片基片的厚度即增加光程, 使信号和背景光经增厚的滤光片后, 二者光强的比值增大。从而使图像目视探测的灵敏度提高, 同时也为计算机图像处理创造了有利条件, 最大限度克服肿瘤诊断中出现的假阳性, 降低误诊率。

1 基本理论

1.1 信号亮度

图 1 为用 Edinburgh Analytical Instruments 公司的 FL/FS920 Combined TCSPC Spectrofluorimeter and Lifetime Spectrometer System 测量光敏剂 HpD 分别由 413nm 和 488nm 光源激发的荧光发射谱。HpD 在生理盐水

基金项目: 福建省自然科学基金重大资助项目 (2002F008)

作者简介: 郑卫峰 (1974-), 女, 讲师, 理学硕士, 主要从事生物医学光学的研究。

E-mail: zhengwf@tom.com

收稿日期: 2005-01-07 收到修改稿日期: 2005-05-19

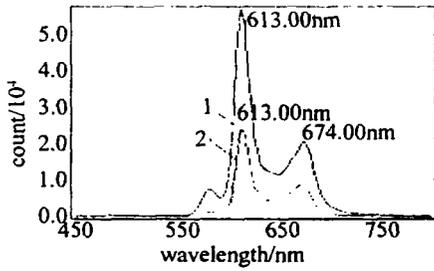


Fig 1 Fluorescence spectrum of HpD
1- $\lambda_{ex} = 413\text{nm}$ 2- $\lambda_{ex} = 488\text{nm}$

溶剂中的荧光发射谱主峰在 613nm。由两者相对的峰值可知,在相同条件下用 Kr^+ 激光器 413nm 激发产生的荧光强度约为用 Ar^+ 激光器 488nm 激发产生荧光强度的 2.6 倍。美国 PROFD 曾测得光源 413nm、功率密度为 $12\text{mW}/\text{cm}^2$ 、肿瘤厚度 $t = 0.007\text{cm}$ 、光敏剂 HpD 质量浓度 $c = 1\text{g}/\text{m}^3$ 时肿瘤表面的荧光产额 Y 为^[3]:

$$Y = 2.3\epsilon c t^2 w = 2.5 \times 10^{-5} \quad (1)$$

式中, ϵ 是消光系数(吸光系数)、 ϕ 是荧光效率、 w 为荧光光子与激发光光子能量。由此可得在肿瘤厚度、光敏剂浓度相同的条件下,用氩离子 488nm 激发产生的荧光产额 $Y \approx 0.96 \times 10^{-5}$ 。若 488nm 蓝光辐照的功率密度为 $22.7\text{mW}/\text{cm}^2$,早期鼻咽肿瘤表面的荧光亮度 L 约为:

$$L = \frac{K_{\max} V(\lambda) E Y}{4\pi} = 4.5 \times 10^{-2} \text{lm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1} \quad (2)$$

式中, $K_{\max} = 683 \text{lm/W}$ 为明视觉最大光谱光视效能; $V(\lambda)$ 为探测荧光波长的明视觉光谱光视效率, $V(620\text{nm}) = 0.381$ 。由此可见,早期肿瘤表面产生的荧光亮度极其微弱。

1.2 背景光亮度

背景光主要来源于光源的放电辉光、组织体表面激发光的漫反射光、像增强器的等效背景照度及周围环境光亮度等。为了降低周围环境光的影响,实验系统处于低照度的暗室;由 1460 型 OMA- 系统测得氩离子 488nm 蓝光的光谱曲线,其在 600nm~700nm 波段上的计数为 θ 像增强器的等效背景照度约为 10^{-7}lx 。由此分析可得组织体表面激发光的漫反射光是主要的背景噪声。为了便于讨论,把组织体近似为朗伯体,利用积分球技术已测得离体猪鼻咽组织的漫反射率 $R = 0.3554$ (激发光源 488nm)^[4]。当蓝光辐照的功率密度为 $22.7\text{mW}/\text{cm}^2$,组织体表面激发光的漫反射光亮度 L 为:

$$L = \frac{K_{\max} V(\lambda) E R}{4\pi} = 877 \text{lm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1} \quad (3)$$

式中, $V(488\text{nm}) = 0.2$ 。相比之下,背景亮度约为信号亮度的 2×10^4 倍。

人眼作为荧光成像系统的接受器时,在暗适应的

条件下绝对视觉阈值为 $9 \times 10^{-9} \text{lx}$ 相当于荧光十几个光子能量,即理论上只要几个癌细胞的荧光就能被发现,但背景光不容忽视。只有当肿瘤荧光亮度 L_s 与背景光亮度 L_n 之差 ΔL 满足能分辨出的最小百分差 $\Delta L/L_n$ (反衬灵敏度的倒数)大于某一数值时,才能把它们的亮度分辨出来。亮度在 $40 \text{lm}/\text{m}^2 \sim 2000 \text{lm}/\text{m}^2$ 的大范围内, $\Delta L/L_n$ 比值几乎保持常数 2%,对更强或更弱的亮度,眼的反衬灵敏度降低,能分辨的最小百分差将增大。因荧光亮度才 10^{-2} 量级,故背景亮度应小于该值,经查在此亮度条件下能分辨的最小百分差要达到 20%^[5] 即背景亮度要小于 $3.8 \times 10^{-2} \text{lm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$ 。实际系统中为了提高像的灵敏度 $\Delta L/L_n$ 要大于 20%。

综上所述,对设置在像增强器前的窄带栅滤光片要有一定的要求,其荧光透过率要尽量大,同时 488nm 的激发光的漫反射光要截止到原来的 4.3×10^{-5} 的量级,这样才能保证荧光像有较好的信噪比。

2 实验与分析

在激光荧光成像系统中^[6,7] 为了得到较高的荧光像信噪比,在系统的设置上关键之一是窄带栅滤光片的选择。窄带栅滤光片就是在有色玻璃上渡诱增透滤光片。实验所用的有色片为长波通有色片,其对不同波长的吸收率不同,图 2 是玻璃牌号为 HB600 有色

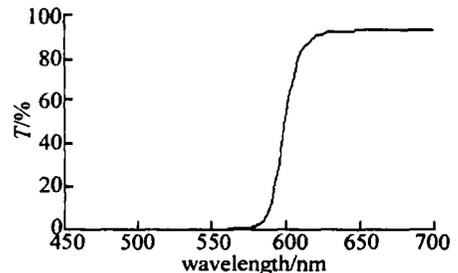


Fig 2 Transmission curve of colored glass HB600

片的透过率谱线。根据光通过均匀介质吸收符合朗伯定律,若有色玻璃的厚度增加即相应的光程增大,则吸收损耗增大,其透过率减小,但不同波长透过率减小的速率不一样。表 1 为用 Peikin Elmer 公司的 Lambda 900 UV/VIS/IR Spectrometer 紫外光可见分光光度计测量有色玻璃 HB600 厚度分别为 1mm 和 3mm 时的透过率谱。比较可得: 620nm 荧光透过率降低的速率比 488nm 背景光降低的小,所以增加一定的光程二者的透过率之比增大,有利于提高信噪比。

Table 1 Transmissivity of colored glass HB600

| thick/mm | transmissivity/% | | | | | | |
|----------|------------------|-------|-------|-----|--------|--------|--------|
| | 622nm | 620nm | 618nm | ... | 490nm | 488nm | 486nm |
| 1 | 89.60 | 89.15 | 88.63 | ... | 0.0645 | 0.0624 | 0.0545 |
| 3 | 86.58 | 85.47 | 84.27 | ... | 0.0150 | 0.0184 | 0.0210 |

实验测的光敏剂 H₂D 在生理盐水和体积分数为 10% 人血清溶剂中的荧光主峰分别为 613nm 和 626nm。故窄带栅滤光片的中心波长选择为 620nm, 带宽为 ± 15 nm, 更符合人体鼻咽组织实际情况。实验用的窄带栅滤光片是有色片 HB600 厚度为 1mm 和 3mm, 在相同条件下渡透增透滤光片, 分别标记为 HB6001 和 HB6003。实验系统见图 3 由激光器输

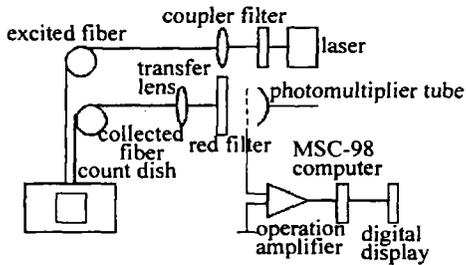


Fig 3 Measuring unit of fluorescence intensity

出的激光经过激发滤光片、耦合器, 会聚到光纤的入射端面, 由光纤输出端面出射的光束辐照在厚度为 0.1mm 的组织光学模型计数盘上。收集光纤与激发光纤平行放置, 且距样品均为 10mm。接受到的荧光和背景光, 经变换透镜、窄带栅滤光片照射到光电倍增管的阴极面上。由运算放大器组成的 I/V 放大器将光电流转换为电压输出。反映收集荧光强度的电压加到 MCS-98 单片机的 D/A 端口, 单片机完成 A/D 变换运算。通过数字显示器显示红色荧光强度。实验样品采用墨水、脂肪乳剂 (intralipid)、蒸馏水和光敏剂按一定比例配制而成的组织光学模型模拟人体的病变组织的情况^[8], 用未加光敏剂的模拟液模拟正常组织。该模型的光学特性参数与人体组织相近似, 能很好地重现典型人体组织在激光照射时的光能流率空间分布。光敏剂的质量浓度配比为 $5\text{g}/\text{m}^3$, 蓝光功率为 10mW, 实验结果由表 2 给出。结果表明, 适当增加有色片的厚度, 信号和背景光的光强虽有一定的减弱, 但系统的信噪比有明显提高。

Table 2 Signal-to-noise ratio of fluorescence imaging

| filter | signal/ 10^{-9}A | noise/ 10^{-9}A | signal-to-noise ratio |
|--------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| HB6001 | 1.38 | 1.85 | 0.74 |
| HB6003 | 1.28 | 0.85 | 1.5 |

3 讨论

在激光药物荧光法诊断和定位早期肿瘤的系统^[9], 荧光像的信噪比和分辨本领的大小直接影响肿瘤诊断的效果。因此, 在系统设计中要求尽可能多的采集荧光, 同时应采取措施最大限度抑制背景噪声。

采用窄带栅滤光片来降低背景噪声是一种有效的技术手段。现有研制的鼻咽癌诊断系统中所采用的窄带栅滤光片是美国进口的中心波长为 620nm、带宽为 ± 5 nm, 其 620nm, 488nm 处的透过率分别为 51.513%, 0.003098%。用此窄带栅滤光片测荧光强度时, 测得信号为 $0.48 \times 10^{-9}\text{A}$, 背景为 $0.16 \times 10^{-9}\text{A}$ 。其与 HB6003 窄带栅滤光片的实验结果比较, 测得的信号较小, 而信噪比略高, 但二者均相差不大仍处于同一数量级水平。一般临床试验使用光敏剂质量浓度为 $2\text{g}/\text{m}^3 \sim 5\text{g}/\text{m}^3$, 激发的荧光辐照度极弱约为 10^{-3}k 。由像增强器的分辨率随照度变化关系曲线可知, 在低照度条件下, 像增强器的分辨率随着辐照度的降低急剧下降。由于窄带栅滤光片 HB6003 中心波长 620nm 的透过率为 75.09%, 带宽为 ± 15 nm, 通过滤光片的光通量高于前者, 因此, 在鼻咽癌诊断成像系统上看荧光像的边界略比用美国进口的窄带栅滤光片来得清晰。诚然, 若在美国进口的窄带栅滤光片基础上, 考虑临床诊断的实际情况, 增加一定的光程和适当的带宽, 既能提高荧光的透过率, 亦能得到较好的信噪比。这样可提高图像探测的灵敏度, 最大限度克服肿瘤诊断中出现假阳性, 降低误诊率。

参 考 文 献

- [1] ZHENG W F, SU W J, LIBH *et al*. Optical and fluorescent characterization of porcine post-pharyngeal wall tissue at 488nm and 514.5nm [J]. Journal of Optoelectronics • Laser 2004, 15(12): 1506~1509 (in Chinese).
- [2] LIBH, XIE Sh S, LIN Q R *et al*. Processing of pseudocolor display of lung cancer fluorescence image [J]. Journal of Optoelectronics • Laser 1998, 9(6): 495~498 (in Chinese).
- [3] PROF D A E, DOIRON D R. Laser fluorescence bronchoscope for localization of occult lung tumors [J]. Medical Physics 1979, 6(6): 523~525.
- [4] LIBH, XIE Sh S. Preliminary study of diagnostic spectroscopic imaging for nasopharyngeal carcinoma [J]. Proc SPIE, 2003, 5254: 388~392.
- [5] YUN T, ZHENG W Y. Vision and visual mechanism [J]. Yunguang Technology 1998, 30(4): 17~33 (in Chinese).
- [6] ZHOU Ch Zh, LIBH, CHEN J *et al*. Design of fluorescence imaging for localizer of early nasopharyngeal carcinoma [J]. Journal of Optoelectronics • Laser 2002, 13(6): 639~642 (in Chinese).
- [7] ZHOU Ch Zh, XIE Sh S. Some problems of irradiation lesion simultaneously with low level CO_2 laser and He-Ne laser [J]. Laser Technology 1992, 16(3): 184~187 (in Chinese).
- [8] XIE Sh S. Design of the optical phantom of tissue for photodynamic therapy research [J]. Proc SPIE, 1990, 1616: 246~251.
- [9] XIE Sh S, LIBH, LU Z K. A new fluorescence imaging system for diagnosis and localization of nasopharyngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Scientific Instrument 2004, 25(4): 448~451 (in Chinese).