

用于细胞成像的共聚焦内窥镜

王家福^{1,2}, 杨敏³, 杨莉^{1,2}, 张云^{1,2}, 袁菁^{1,2}, 刘谦^{1,2}, 侯晓华³, 付玲^{1,2*}

摘要: 使用内窥镜的目的是实现与组织病理诊断相符的即时诊断。在过去的十年里, 共聚焦激光扫描显微成像技术被引入内窥镜领域。共聚焦内窥镜使得对活体组织的显微观察能够达到与组织学样品的体外显微成像相当的放大倍数和分辨率。发展这种内窥镜的主要挑战在于具有微米级分辨率的显微成像光纤探头的小型化。笔者研制了一套基于光纤束, 分辨率为 1.4 μm , 成像速度可达 8 fps 的共聚焦内窥镜系统。光纤探头的直径为 2.6 mm, 可与常规内窥镜的活检通道兼容。该共聚焦内窥镜的样机已经被用于观察小鼠胃肠道上皮细胞, 并将进一步被用于临床试验。此外, 该共聚焦内窥镜能够被用于上皮细胞功能的转化研究, 以监测自然生理环境中细微颗粒的功能和细胞间的相互作用。

关键词: 细胞分辨率, 共聚焦内窥镜, 光学活检

1 引言

癌症是影响人类健康的主要疾病。《全球癌症报告 2014》显示, 2012年大约有1400万癌症新增病例以及820万与癌症相关的死亡病例, 并且在未来20年内, 癌症病例预计达到2200万[1]。癌症的早期诊断和治疗对提高生活质量和减少治疗费用至关重要。由于85%的肿瘤产生于上皮细胞, 所以迫切需要发展细胞水平分辨率的疾病检测技术。传统的癌症诊断方法通常基于筛选血清特异性抗原或其他肿瘤标记物而实现。然而, 这些方法的特异性和灵敏度都比较低[2]。在过去的十年里, 许多成像技

术在灵敏度和分辨率上都取得了重大进步, 如计算机断层扫描、磁共振成像、超声成像和正电子发射断层扫描。但是, 它们的分辨率仍然局限在亚毫米水平。

据“中国肿瘤登记年报”显示, 2012年与胃肠道相关的癌症所占比例超过了22%。因此, 高分辨率检测方法对临床应用至关重要, 尤其是胃肠道癌症的早期诊断。内窥镜检查是胃肠道诊断的常用技术。随着该技术的发展, 消化道内窥镜经历了三个阶段: 硬管式内窥镜时期(1805—1932年), 半可屈式内窥镜时期(1932—1957年)以及光纤内窥镜时期(1957年至今)[3]。光纤内窥镜即软管式内窥镜发明于1957年, 随后获得了迅速发展[4, 5]。最近, 随着光纤与共聚焦技术的结合, 消化道内窥镜向前迈出了一大步。

色素内镜检查是另一种为人熟知的内窥镜技术[6, 7]。与结肠镜检查和白光内窥镜相比, 色素内镜检查通过染色提高了组织信号的强度, 从而获得更高的特异性和病变特征[7, 8]。但是染色过程使得色素内镜检查与其他内窥镜技术相比需要花费更多的时间。

近几年, 出现了一种采用激光扫描共聚焦成像技术和荧光标记物的新型内窥镜——共聚焦内窥镜。它能够呈现与活检病理成像高度一致的细胞形态, 从而使医生能够在给病人带来最小不适的前提下, 原位准确判断癌症、癌前病变或者健康状态[9]。共聚焦内窥镜具有微米级分辨率, 是目前唯一一种能够进行细胞成像的内窥镜仪器。这种仪器的出现使内窥镜技术向前迈进了一大步。研究表明, 共聚焦内窥镜在早期结肠癌病变、溃疡

¹ Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; ² MoE Key Laboratory for Biomedical Photonics, Department of Biomedical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

³ Division of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

* Correspondence author. E-mail: lfu@mail.hust.edu.cn

Received 5 August 2015; received in revised form 6 September 2015; accepted 10 September 2015

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

英文原文: Engineering 2015, 1(3): 351–360

引用本文: Jiafu Wang, Min Yang, Li Yang, Yun Zhang, Jing Yuan, Qian Liu, Xiaohua Hou, Ling Fu. A Confocal Endoscope for Cellular Imaging. *Engineering*,

DOI 10.15302/J-ENG-2015081

性结肠炎、Barrett食管、胃食管反流病、非糜烂性反流病和消化道其他疾病的诊断中具有极大的临床价值和潜力[10]。

本文将首先简单介绍共聚焦内窥镜的概念，并重点阐述其核心器件和技术。接着，笔者将展示一台在胃肠病学上可与常规内窥镜兼容的共聚焦内窥镜样机，并介绍其主要部件和性能，包括视场和分辨率。最后，为了演示该样机的成像效果，笔者展示了小鼠大肠的成像结果。该共聚焦内窥镜样机已经通过国家食品药品监督管理局的医疗器械质量监督与检验，并将开始临床试验。

2 共聚焦内窥镜研究背景

内窥镜是胃肠道疾病诊断检验的试金石。有了内窥镜技术，我们可以看到口腔到直肠这部分肉眼看不到的地方，包括胃、小肠、结肠直肠和消化道附近的器官，如胰腺和胆道[11]。随着技术的发展，几种典型的内窥镜技术已经被广泛应用于临床，如常规内窥镜和窄带成像内镜。由于使用反射光，常规内窥镜分辨率低，几乎与肉眼相同，只能看到宏观结构而看不到细胞信息。图1 (a) 是使用常规内窥镜 (EG-590WZ, Fujinon, Tokyo, Japan) 对胃黏膜肠上皮化生组织进行成像的结果。由图可以看到粗糙的胃窦黏膜，但无法得到其他有用信息。窄带成像内镜使用红色、蓝色和绿色波长的光来增强黏膜表面某些地方的细节。人们可以通过窄带成像内镜看到血管形态，但是仍然无法在细胞层面分辨组织。图1 (b) 是使用窄带成像内镜 (CV-290/CLV-290, Olympus, Tokyo, Japan) 对组织进行成像的结果：腺管为卵圆形，而且在图中部分区域可见亮蓝嵴结构 (LBC)。图1 (c) 为共聚焦内窥镜 (Cellvizio, Mauna Kea Technologies (MKT), Paris, France) 获得的成像结果：在胃窦腺体上皮细胞间离散地分布着黑色杯状细胞，这些杯状细胞均清晰可见。图1 (d) 是胃黏膜肠上皮化生的组织病理成像结果：在胃窦腺管内有很多液泡状肠上皮细胞。这些成像结果表明，共聚焦内窥镜是唯一一种能够在细胞水平进行活体实时成像的内窥镜技术。以活检组织病理诊断为金标准，比较分别用窄带成像内镜、色素内镜和共聚焦内窥镜对87个病人进行萎缩性胃炎检查的结果。研究发现，共聚焦内窥镜与色素内镜和窄带成像内镜相比具有更高的敏感性、特异性和准确率[12]。

共聚焦内窥镜的出现改变了常规内窥镜的诊断方式。首先，细胞分辨能力有助于分辨细微平坦的黏膜病变。其次，共聚焦内窥镜能够实现活体实时无损伤成像。共聚焦内窥镜是一种具有超高放大率的内窥镜技术，它

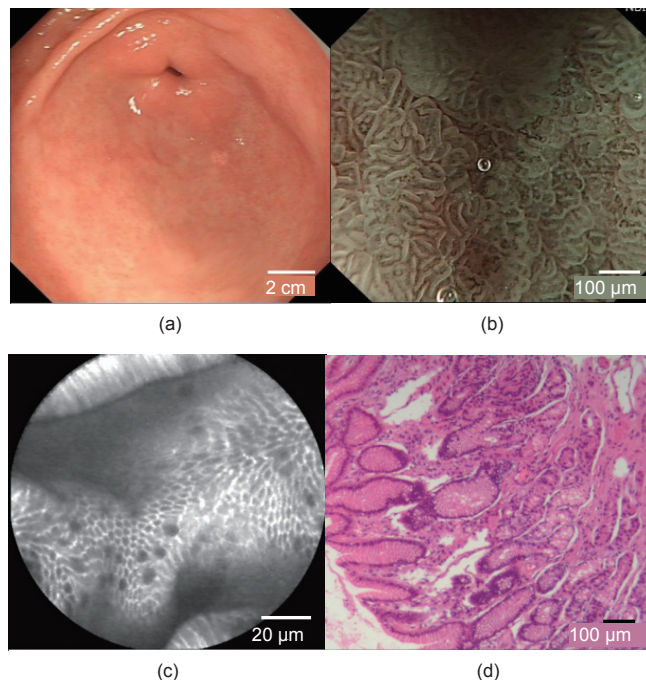


图1. 不同仪器对胃黏膜肠上皮化生 (GIM, 胃窦) 的成像结果。(a) 常规内窥镜的成像结果，看不到微观结构；(b) 窄带成像内镜的成像结果，可以看到血管结构但是看不到细胞；(c) 共聚焦成像结果，上皮细胞和杯状细胞均可见；(d) 对应的组织病理成像。

能够在内窥镜检查过程中实现对黏膜的微结构分析，从而使胃肠病医生在胃肠道实现疾病的早期诊断成为可能。此外，共聚焦内窥镜可用于大规模或弥散性病变中的靶向活检 (即智能活检)，以及指导和监视内窥镜切除过程[13]。尽管组织活检仍然是诊断学的金标准，但是如果把所有的因素都考虑进去，组织活检未必会优于共聚焦内窥镜。共聚焦内窥镜的活体组织学成像是一种可通过减少盲目取样来缩短诊断时间的靶向方法。因此，笔者相信这一新的方向将非常有利于内窥镜技术的发展。

3 核心器件和技术

3.1 激光扫描共聚焦内窥镜

共聚焦内窥镜自1957年由Marvin Minsky发明以来获得了迅速的发展。共聚焦技术使用一个针孔减少来自焦平面前后样品处的杂散光，从而极大提高了信噪比和轴向分辨率。图2为共聚焦内窥镜的原理示意图。从激光器出来的光束通过一个透镜会聚成点光源。从光源出来的光到达分光镜后被反射，而后由物镜进行聚焦。样品被照射之后激发出荧光。激发的荧光被物镜收集，由于其波长比原来的入射光更长而能够穿过分光镜到达探测器。探测器前面有一个与点光源共轭的针孔，该针孔可阻挡焦点以外被激发的光，因而只有焦点处的光才能被收集。

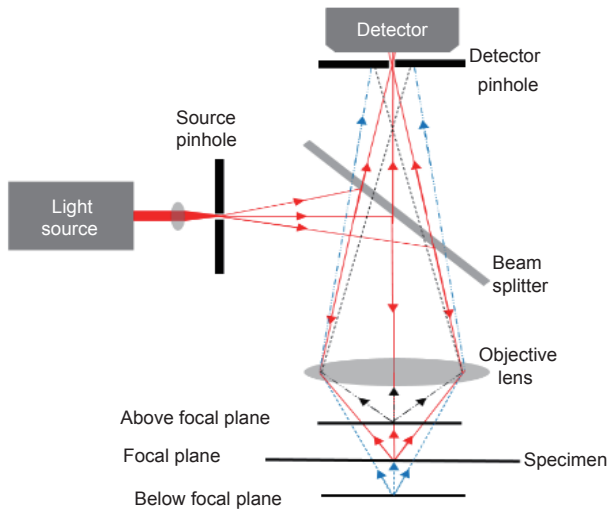


图 2. 共聚焦内窥镜的原理示意图。探测器针孔、光源针孔处的点光源和样品处的照明点共轭。探测器前面的针孔可以阻挡焦平面上面（图中黑线表示）或者下面（图中蓝线表示）的杂散光。

与传统的宽场显微成像相比，共聚焦显微镜有很多优点。例如，由于使用了小孔而具有很高的轴向分辨率。此外，共聚焦显微镜还具备之前的显微镜从未实现过的功能——对样品不同深度进行探测，即光学切片。与传统的组织切片检测相比，共聚焦显微内窥镜的这种光学切片能力使其非常适用于厚组织的活体成像而无需进行实验前的组织切片准备，从而具有很高的临床应用价值。

3.2 光纤和光纤束

共聚焦显微镜虽然受到了生物学家的广泛关注，但从一开始，大直径的物镜就成了它进行临床应用的主要障碍。1991年，由一根单模光纤代替小孔的共聚焦内窥镜第一次被用于临床实体成像[14–16]。随后，虽然光纤在共聚焦激光扫描显微镜中使用较少，但却因光通信应用而获得了迅速发展。

如图3 (a) 所示，最简单的光纤包括高折射率 (RI) 的玻璃纤芯和包围纤芯的低折射率的玻璃包层，纤芯和包层的折射率分别是 n_1 和 n_2 。光束在纤芯中依据全内反射原理传播。光纤特有的柔性使共聚焦显微镜能够在保持其光学切片和高分辨率的特性的前提下进入人体。

2006年，使用单模光纤的共聚焦内窥镜开始进入临床应用。除了传输激发光和收集来自组织的荧光，该光纤（或者光纤束中的单根光纤）在共聚焦成像中也可被当成针孔来减少散射光。后来商业的探头式共聚焦内窥镜使用一根光纤束代替一根单模光纤。如图3 (b) 所示，一根光纤束由很多根光纤组成。只有纤芯中的光束才能进行有效传输。光纤束中光纤的数量和光纤之间的距离分别决定了视

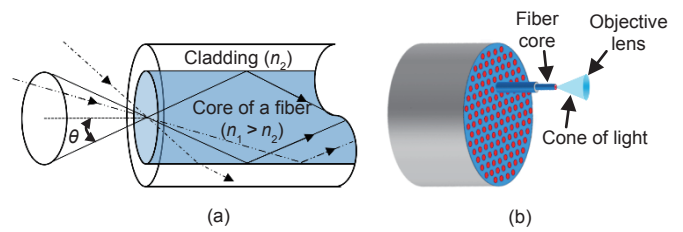


图 3. 耦合光进入光纤或者光纤束。(a) 只有纤芯中的光才能向前传播而不发生漏光；(b) 一根光纤束包含很多根光纤，从 2000 根到 100 000 根不等。

场 (FOV) 和分辨率[17]。光纤束外径小，可以插入常规内窥镜的活检通道，在内窥镜设备中发挥着越来越重要的作用。这两种内窥镜都可以活体实时分辨人体不同组织的细胞，这是其他内窥镜所不能实现的[18–20]。

3.3 微型物镜

微型物镜是共聚焦内窥镜中最重要的部件之一。微型物镜用于把激发光会聚到组织上并收集来自组织的发射光。共聚焦内窥镜的分辨率和视场由微型物镜的数值孔径 (NA) 和放大倍数决定。小尺寸的透镜系统能够通过消化内镜的活检通道进入人体。因此，共聚焦内窥镜进行高质量成像的一个前提是使用小尺寸高数值孔径的微型物镜。

格林透镜 (GRIN lens) 因外径尺寸小而备受青睐。人们通常把高数值孔径的格林透镜与低数值孔径的格林透镜组装成显微内窥镜[21, 22]。然而，格林透镜系统难以校正色差和场曲等像差，因此无法满足荧光共聚焦内窥镜的需求。

为了提高成像性能，定制透镜系统是比较好的方案。然而，微型物镜的设计存在两大挑战。首先，由于技术限制，小尺寸外径透镜的制造和组装过程很复杂，因此透镜的设计需要同时考虑光学参数和加工过程。其次，为保证微型物镜能顺利进入人体内部器官，其长度也受到限制。当其长度比商业显微物镜更短时，只能使用更少的光学元件来校正像差。因此，适当地权衡设计、制造和组装等因素是定制微型物镜的关键。

表1总结了共聚焦内窥镜微型物镜的技术参数。专门定制的全玻璃球面镜已经能够用于反射光和荧光共聚焦内窥镜[23, 24]。然而，全玻璃球面镜的结构会导致微型物镜内使用更多的光学元件，从而使组装过程复杂化。用于反射光共聚焦内窥镜的非球面塑料透镜和玻璃球面透镜可以减少光学元件的数量[25, 26]。在 452–623 nm 波长范围内，用于荧光共聚焦内窥镜的衍射受限微型物镜可设计为六个非球面塑料透镜的组合[27]。

设计由少量光学元件组成的高数值孔径微型物镜仍然存在困难。目前,由非球面透镜和球面透镜组成的微型物镜更容易制作。随着制造和组装技术的发展,微型物镜设计的自由度将得到提升,从而促进成像质量的提高。

3.4 光纤扫描装置

因为共聚焦内窥镜采用点对点激光扫描技术,所以简单紧凑的扫描装置是必需的。一般来说,用于光纤内窥镜的微型扫描装置可以分为两类。第一类扫描装置用于控制激光光束,类似传统的检流计振镜。它使用一个二维机电系统 (MEMS) 反射镜作为光束控制器,置于光纤端面 and 微型物镜之间[28]。这种方式得益于反射镜的小尺寸和低功耗,而且机电系统具有小型化的潜力。但是,由于其复杂性以及高昂的价格,这种方法还没有得到广泛的应用。

第二类扫描装置直接控制照明光纤使其发生偏转而不是扫描光束。这类扫描装置中,照明光束由微型光学器件(如格林透镜)进行校准和聚焦,这意味着光纤端面的任何运动都将转化为聚焦光斑较小的横向位移。通过使光纤末端发生偏转,我们可以实现对焦平面的二维扫描。

压电器件由于其灵敏度高、响应速度快、成本低等优点已经逐渐成为使光纤末端发生偏转的最佳选择之一。尤其是与由逆压电效应引起的驱动电压相对应,压电晶片也可以发生振动。有人曾研发过一个帧速为15 Hz的用于检测自由行为大鼠大脑新皮层单个神经元钙信号的非共振压电杠杆[29]。其视场直径约为260 μm ,在10.9 Hz的帧速下图像为64 \times 64像素。该扫描器由四个压电晶片、一根扫描光纤和两根用作铰链的细光纤组成。由于杠杆原理,由压电晶片产生的微小挠度可以转化为很大的光纤悬臂位移[30]。杠杆由两部分组成:一个自由光纤悬臂和一个位于交叉点和纤维锚状物之间的小元件。当锯齿信号和斜坡信号同时分别驱动快轴与慢轴时,即可实现光栅式扫描。这种装置也可以进行矢量扫描和随机存取扫描。然而,非共振压电杠杆光纤扫描器通常需要一个由高压电

驱动的大压电晶片用于使光纤末端发生足够大的偏转。

幸运的是,利用共振放大,微型共振压电光纤扫描器只需要很低的电压就能够提供足够大的扫描范围。此外,由于高共振频率,共振扫描器通常具有较高的帧速。常用的共振压电光纤扫描器由一个压电管和一根光纤组成[31]。光纤悬臂在两个正交的方向上振动,从根本上消除了串扰。通过在正交方向上采用90°相移来驱动振动可以轻易实现螺旋式扫描[32]。该扫描器的前片长度为32 mm,外径为2 mm。当扫描器工作在1.4 kHz的共振频率下时,成像帧速即显示器显示的频率(速度)为2.7 fps,视场约为110 μm 。表2为不同微型扫描装置的特性。

本研究组通过把四个压电元件排列成一个方形管而研制出一种共振光纤压电扫描器(RFPS)。该方形管易于制作和驱动[34]。通过使用一个基于有限元的耦合视场模型,扫描器件中包括振动方式、共振频率和扫描范围在内的扫描特性可为通用设计作数值研究。压电片大小为16 mm \times 1.2 mm \times 0.2 mm;悬臂是一根单模光纤,其长度和直径分别为16 mm和125 μm 。在10 V低电压的驱动下,当频率为384 Hz和370 Hz时,悬臂末端在两个方向上可实现最大范围的扫描,分别为1.671 mm和1.893 mm。不同的像素对应不同的成像帧速,最常用的是2 fps。我们可通过螺旋式扫描获得图像,如图4(a)所示[34]。此外,通过在两个正交方向上产生不同的有序共振,该共振光纤压电扫描器能够产生光栅式扫描,如图4(b)所示[35]。当帧扫描和线扫描的驱动电压分别为3 Hz/20 V和879 Hz/154 V时,即可得到方形区域。

4 光纤共聚焦内窥镜

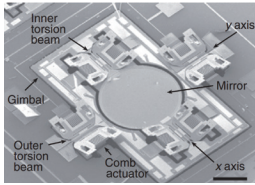
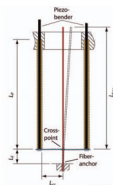
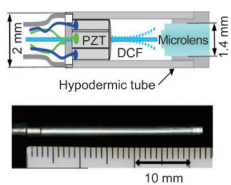
4.1 系统结构

自医疗器械起源,微损或无损活体光学成像方法已经成为胃肠病学家追求的目标。活检是胃肠道疾病检测的金标准。然而,活检过程不仅费时而且无法实现实时成像。此外,传统光学成像系统由于物镜太大而无法用于临床。结合光纤束和共聚焦激光扫描显微镜的光纤共聚焦内窥镜为解决这个问题提供了一种有效的方法。

表 1. 微型物镜的参数性能

Parameter	Knittel et al. [21]	Rouse et al. [23]	Liang et al. [24]	Chidley et al. [25]	Kester et al. [26]	Kyrish et al. [27]
Number of elements	2	9	8	5	3	6
Outer diameter (mm)	1	4	7	7	4	2.1
Length (mm)	7.8	13	20.4	17.5	10	10
Confocal endoscopy	Fluorescence	Fluorescence	Reflectance	Reflectance	Reflectance	Fluorescence
NA at tissue	0.5	0.46	1.0	1.0	1.0	0.55
FOV (μm)	280	450	250	250	250	360
Lateral resolution (μm)	3.1	1.8	0.93	0.65	0.65	4.4

表 2. 微型扫描装置特性

Type	MEMS [28, 33]	Nonresonant [30]	Resonant [31]
Schematic diagram			
Geometry size	20 mm × 19 mm × 11 mm	2 mm × 10 mm	∅2 mm × 25 mm
Driving voltage	60 V/150 V	124 V	140 V
Frequency/frame rate	1.08 kHz & 0.56 kHz/1-15 fps	790 Hz/10.9 fps	1.4 kHz/2.7 fps
FOV	295 μm × 100 μm	260 μm	110 μm
Features	Small size, low power consumption; complexity, high price	Random access scanning; large size, high voltage	High resonant frequency; lacking vector scanning

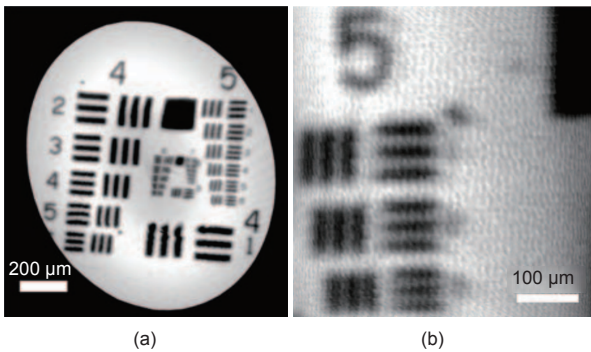


图 4. USAF 1951 分辨率板成像结果。(a) 螺旋式扫描, 标尺为 200 μm; (b) 光栅式扫描, 标尺为 100 μm。

共聚焦激光扫描技术是获得高分辨率光学成像的关键。通过使用该技术, 笔者研发了一台高分辨率共聚焦内窥镜。图5为该光纤共聚焦内窥镜系统的原理示意图。图6为该共聚焦内窥镜系统。由于488 nm的激光很容易激发荧光素和盐酸吡啶黄等常用染料的荧光, 所以笔者选择了这一波长的激光器[36, 37]。从激光器 (OBIS 488-50, Coherent, Santa Clara, CA, USA) 发出的激光经过扩束之后到达一个截止波长为488 nm的二向色镜 (DM, Semrock, Rochester, NY, USA) 并被反射。利用由反旋转扫描振镜和检流计振镜组成的XY扫描装置对光束进行扫描。在1024 × 1024像素时系统成像速度为4 fps, 在512 × 512像素时系统成像速度为8 fps。此后, 光束由一组透镜中继到物镜 (20 × /0.50, Olympus, Tokyo, Japan) 后瞳, 该物镜将光束耦合至光纤束 (FIGH-30-650S, Fujikura, Tokyo, Japan) 近端。光纤束中的所有光纤都被用于传输激光和荧光。用于直接接触样品的微型物镜粘在光纤束的另一端。在焦点处产生的具有更长波长的荧光将被微型物镜收集。荧光穿过二向色镜和滤光片 (FF02-525/40, Semrock, Rochester, NY, USA), 而后被一个镜筒透镜收集。该镜筒透镜的焦点处是一个针孔, 该针孔与位于光纤束近端端面的物镜焦点相互共轭, 用于阻挡杂散光。最后, 一个光电倍增管 (R3896, Hamamatsu, Shizuoka

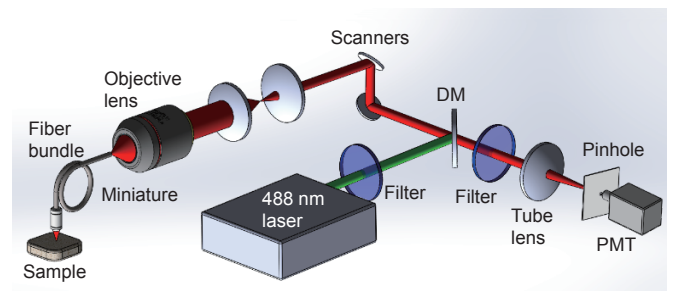


图 5. 共聚焦内窥镜系统的原理示意图。DM: 二向色镜; PMT: 光电倍增管。

Pref., Japan) 被用于探测信号。

图6 (a) 所示为高分辨率共聚焦内窥镜样机。该样机包括一个便携式扫描单元、用于控制激光器和记录数据的脚踏开关、用于数据处理和图像显示的电脑和一个探头。便携式扫描单元集成了光学元件和电子元件。由光纤束和微型物镜组成的可插拔探头与扫描单元是相互独立的, 如图6 (b) 所示。

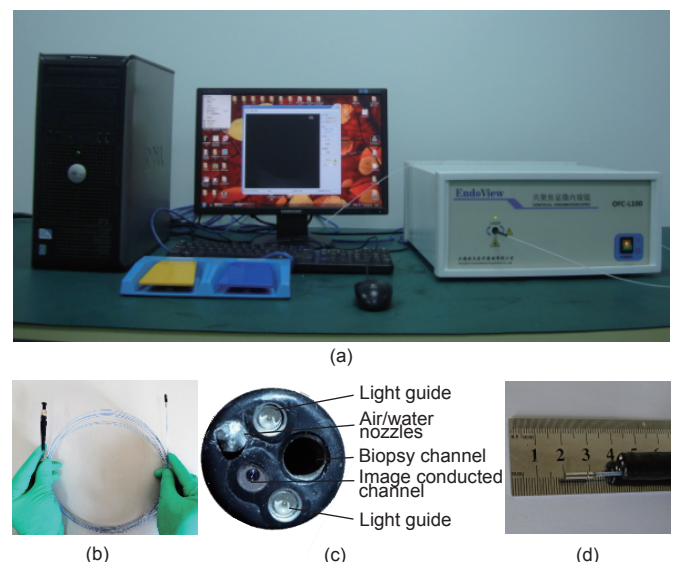


图 6. 共聚焦内窥镜系统。(a) 共聚焦内窥镜样机; (b) 共聚焦内窥镜探头; (c) 常规内窥镜的探头端面; (d) 光纤探头穿过一个常规内窥镜。

4.2 可用于胃肠病学的微型化探头

图6 (b) 和 (c) 分别为笔者的共聚焦内窥镜的光纤探头和常规内窥镜 (GIF-XQ40, Olympus, Tokyo, Japan) 的探头。光纤探头是共聚焦内窥镜中极为关键的一部分。光纤探头里面的微型物镜直接决定了成像分辨率。为了进一步提高共聚焦内窥镜的横向分辨率, 笔者设计了一个直径为 2.6 mm 的微型物镜。图6 (d) 所示为光纤探头可穿过常规内窥镜的活检通道, 可与常规内窥镜兼容, 无需改造已有的常规内窥镜。在透镜设计时, 除了尺寸, 像差也是需要考虑的重要因素。笔者研制的微型物镜能同时校正球差、色差和场曲。

目前, 只有Pentax/Hoya (Tokyo, Japan) 和MKT两家公司可以制作在胃肠道进行活体成像并具有细胞分辨率的共聚焦内窥镜。EC-3870Cik (Pentax/Hoya) 和Cellvizio (MKT) 最大的区别在于扫描的位置不同: 前者是远端扫描, 后者是近端扫描。在远端扫描设计中, 单根光纤由电磁驱动扫描装置进行扫描, 但是远端扫描装置的小型化问题始终是阻碍其与常规内窥镜兼容以及进行其他应用的重要因素[38]。然而, 如果使用近端扫描装置和一根光纤束, 扫描器的尺寸就不再是问题了。相反, 可以针对不同应用设计不同探头。因而近几年出现了不同用途的多种探头, 如用于表面成像的S系列, 用于高分辨率成像的M系列, 以及用于深度成像的Z系列[39]。具有近端扫描装置的共聚焦内窥镜可与常规内窥镜兼容。这避免了购置专门设计的内窥镜, 从而大大降低了成本。

4.3 图像处理算法

与常规内窥镜相比, 共聚焦内窥镜能够在细胞分辨率水平上实现无损实时成像。在共聚焦内窥镜中, 光纤

束起着传输激发光和荧光信号的重要作用。光纤束由大量单根光纤组成, 而每根光纤由高传输率的纤芯和低传输率的包层组成, 从而在原有的荧光图像上产生了对成像分辨率极为不利的蜂窝状图案。因此, 在保证图像质量的前提下去除蜂窝状图案是十分必要的。基于之前对蜂窝状图案消除问题的研究, 笔者在这里介绍三种方法来实现高分辨率图像的复原。

第一种方法被称为空间滤波算法。它将蜂窝状图案视为干扰。为了去除这一干扰, 一个事先设定的用来避免信号展宽的均值滤波器被应用于有效图像区域来实现对噪声的抑制; 然后利用直方图均衡化来提高图像对比度; 最后, 采用高斯滤波去除蜂窝状图案。

第二种方法是频域滤波算法。首先, 使用二维快速傅里叶变换来获取图像的频域信息。由于在空间域中蜂窝状图案的伪周期性排列具有很高的频率, 其频域信息主要对应高频分量。接着, 一个专门设计的高斯低通滤波器足以除去蜂窝状图案的频域信息。最后, 可以通过应用快速傅里叶逆变换滤除频域信息来实现图像恢复。

第三种方法是三角插值重建算法。图像中的蜂窝状图案反映了光纤束的横向结构[40]。因为包层阻碍了位于样品平面中的包层对应区域信息的采样, 该算法把对应于纤芯中心的像素当成正确抽样的像素, 视为“中心像素”。该算法的目的是根据中心像素对图像进行插值。三角插值重建算法包括三个步骤。第一步是计算中心像素, 这可通过局部极值的搜索和附加滤波来实现。第二步是用Delaunay三角剖分对计算出的中心像素三角化[41]。第三步是在第二步中得到的被覆盖三角形的顶点灰度值的基础上对每个非中心像素进行线性插值。

图7 (a) 为通过共聚焦内窥镜获取的铃兰茎图像, 其中蜂窝状图案十分明显。图7 (b) 是由空间滤波算法处理过的图像。蜂窝状问题得到改善, 并且铃兰茎结构清晰。由于使用了加权平均或平滑滤波, 图中信号水平和图像的对比度与原始图像相比有所下降, 并且图像也变得模糊。这种算法的优点是速度快: 共聚焦内窥镜系统使用该方法, 速度可以达到8 fps。图7 (c) 为经过频域滤波算法处理的结果。在该图中, 铃兰茎的结构完整无失真; 然而, 随着蜂窝状图案的消除, 原始图像中主要包含在高频分量的边缘信息分量也丢失了, 从而导致图像模糊。信号水平和图像对比度的降低是空间滤波算法和频域滤波算法的共同问题, 但两种算法都很快。图7 (d) 是三角插值重建算法的

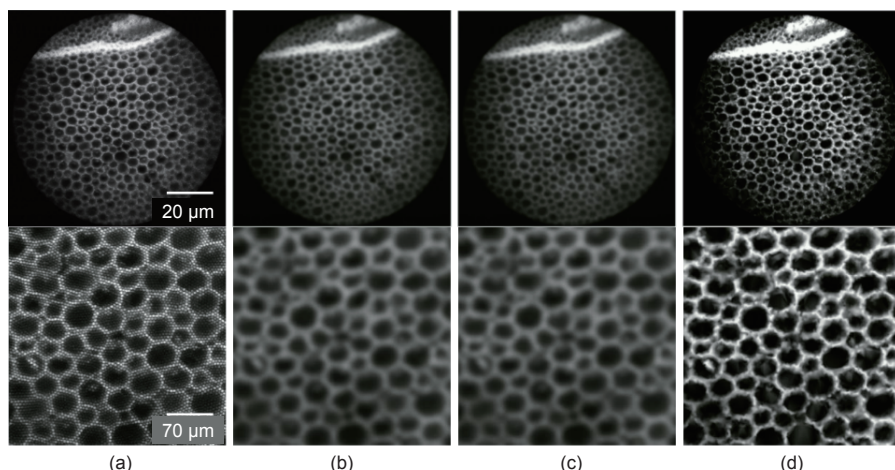


图7. 三种去除蜂窝状图案方法的对比。(a) 铃兰茎的共聚焦图像; (b) 空间滤波算法处理结果; (c) 频域滤波算法处理结果; (d) 三角插值重建算法处理结果。

表 3. 三种去除蜂窝状图案方法的对比

Algorithm	Spatial domain	Frequency domain	Triangulation
Contrast	Normal	Normal	Excellent
Details	Normal	Normal	Excellent
Speed	>> 8 fps	>> 8 fps	Slow

结果。和前面两个算法的结果相比蜂窝状问题大为改善，而且信号水平和图像对比度也有所增加。然而，该算法相对较慢，无法满足共聚焦内窥镜实时成像的要求。表3对比了这三种算法。

4.4 共聚焦内窥镜系统的性能参数

笔者使用的光纤束外径为750 μm，有效成像直径为620 μm。当使用自制微型物镜时，其有效成像直径将变为原来的一半。如图8 (a) 所示，只有那些有光纤的区域是照亮的，也可看见蜂窝状图案。通过使用XY扫描振镜可实现由物镜到光纤束近端端面每根光纤的光束耦合，从而实现点对点传输。由于光纤束是用于传输光束的，其端面必须非常准确地与物镜焦平面重合。当这两者重合时，光纤束中的每根光纤均可清晰成像，如图8 (b) 所示。当光纤束端面在物镜焦平面的前面或者后面时，我们将获得模糊的图像。除了这两种情况，当光纤束的端面与光轴不垂直时，情况更为复杂。

图9 (a) 所示为滴有荧光溶液的光栅 (80 L/MM, Edmund, Barrington, NJ, USA) 放在共聚焦内窥镜探头前面

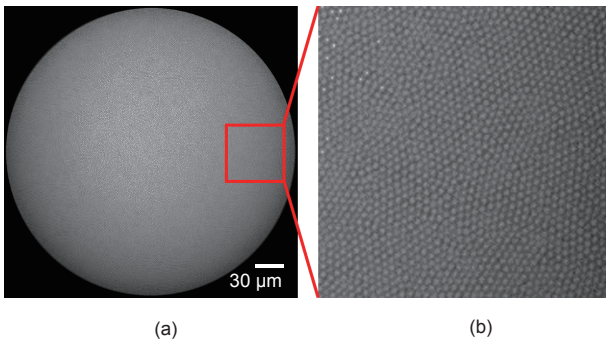


图 8. 光纤束端面。(a) 光纤束端面；(b) 图 (a) 中红色矩形区域放大后的结果，红色矩形中所有的光纤均可见。

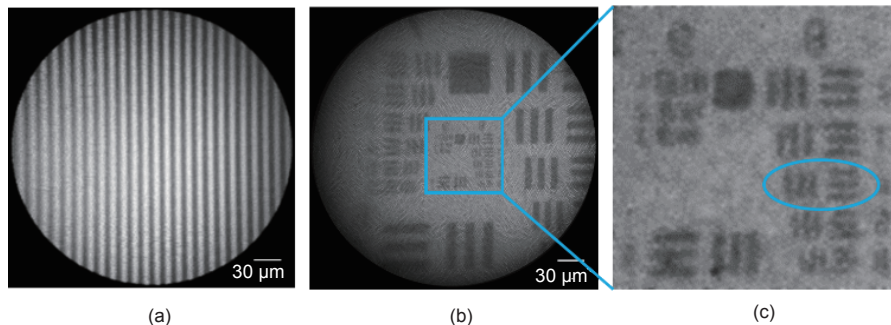


图 9. 使用光栅和 USAF 1951 分辨率板进行参数测试。(a) 规格为 80 L·mm⁻¹ 的光栅成像结果；(b) 用于测试共聚焦内窥镜系统空间分辨率的 USAF 1951 分辨率板成像结果；(c) 图 (b) 中蓝色矩形区域放大后的结果。

的成像结果，光栅的条纹清晰可见。图中可见25对条纹，对应约310 μm的成像视场。在显微成像中，大的视场往往更加有利。笔者研制的共聚焦内窥镜的视场足够用于观察组织。

基于光纤束的共聚焦内窥镜，其相邻光纤纤芯之间的距离决定了系统的分辨率。为了测试该系统的分辨率，笔者使用标准USAF 1951分辨率板和荧光样品进行成像，如图9 (b) 所示。可分辨的最小刻度是蓝色椭圆内第八组第四号元素，对应的分辨率是1.4 μm，如图9 (c) 所示。该分辨率足够分辨人体与小鼠消化道黏膜表面的细胞。表4对比了笔者研制的系统与商业共聚焦内窥镜的主要参数。与Pentax/Hoya公司和MKT公司的系统对比发现，Pentax/Hoya公司的系统的分辨率略高，但是它的内窥镜探头很大。笔者研制的系统和MKT公司的系统都使用探头式共聚焦内窥镜，可以通过研制多种探头来应对各种不同的临床应用。

5 细胞成像

5.1 实验方法

从武汉大学中南医院 (中国，湖北) 购买的质量约为20 g的C57BL/6小鼠养殖于无特定病原体环境中。所有实验均遵从华中科技大学动物实验伦理委员会 (中国，湖北) 的规定。为了提高组织信号的对比度，笔者使用一种被广泛应用的荧光对比剂——盐酸吡啶黄来对黏膜表面进行染色[37]。盐酸吡啶黄是一种有效的染料并且不会造成严重的不良反应[38]。这种染料在进行局部染色之后会立即与细胞核里面的DNA和RNA结合。按照90 μL/10 g的规格对C57BL/6小鼠腹腔注射乌拉坦进行麻醉，随后解剖并取出大肠。然后，用质量浓度为0.1 %的盐酸吡啶黄溶液对该大肠组织进行染色。最后，用共聚焦内窥镜系统的探头直接接触大肠黏膜进行成像。系统使用的激发波长为488 nm，系统检测到的是波长在505 nm和545 nm之间的光信号。

5.2 成像结果

这里，笔者使用自制共聚焦内窥镜系统观察了盐酸吡啶黄染色后的C57BL/6小鼠大肠。如图10 (a) 所示，降结肠黏膜和直肠黏膜清晰可见。隐窝是结肠的典型结构，我们可以观察到规律分布的圆形或椭圆形隐窝结构。在视场内，大约可见5~12个黏膜隐窝。此外，由于盐酸吡啶黄

表 4. 自制共聚焦内窥镜与商业共聚焦内窥镜主要参数对比

Probes	Size of probe (mm)	Lateral resolution (μm)	FOV (μm × μm)	Working distance (μm)	
Homemade	S-500	0.8	2.8	620	0
	U-240	2.6	1.4	310	150
Pentax/Hoya	ISC-1000	12.8	0.7	475	250
MKT	S-650	0.65	3.3	600	0
	UltraMinio	2.6	1.4	240	60
	Minio/30	4.2	1.4	240	30
	Mini-Z	0.91	3.5	325	50 or 70

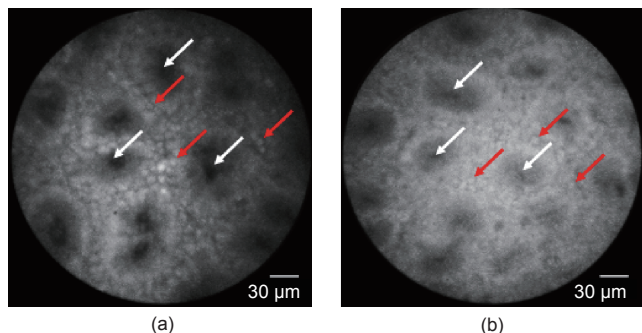


图 10. 用质量浓度为 0.1 % 的盐酸吡啶黄对小鼠降结肠黏膜和直肠黏膜进行局部染色后的共聚焦成像。(a) 降结肠黏膜, 可见充分染色后的黏膜表面上皮细胞紧密分布在隐窝周围; (b) 直肠黏膜。红色箭头所指为柱状上皮细胞, 白色箭头所指为隐窝。

是对组织表面进行染色, 我们可以看到上皮细胞紧密围绕隐窝分布。在直肠黏膜中可以看见相似结构, 如图 10 (b) 所示。

在黏膜表面被盐酸吡啶黄染色的同时, 黏膜亚表面也能够被染色。然而, 如图 11 所示, 位于黏膜表面以下约 50 μm 处的固有层无法被染色。如图 11 (a) 所示, 黏膜表面可见; 同时我们可以看到来自亚表面的荧光, 如图 11 (b) 所示。这种可在不同深度进行成像的能力就是该共聚焦内窥镜系统的光学切片能力。

此外, 笔者发现结肠各处的结构也并不完全相同。在有些区域, 集中在黏膜表面的是上皮细胞而没有杯状细胞, 如图 12 (a) 所示。在另一些区域, 我们可以看到一些细胞外基质和杯状细胞离散地分布在隐窝周围, 如图 12 (b) 所示。杯状细胞由于内含黏液而呈黑色。

6 讨论与展望

这种带有微型探头的共聚焦内窥镜能够对正常和病理条件下的不同组织、细胞、微小颗粒甚至是细菌进行实时活体成像[43, 44]。很多研究已经证实了共聚焦内窥镜具有很高的诊断准确率。共聚焦内窥镜并不是要替代组织病理检查, 而是可以根据组织微结构把活检目标引向感兴趣的区域[20]。这是临床研究应用中一种非常重要

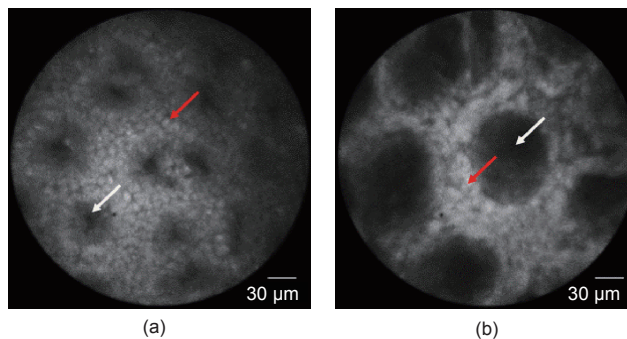


图 11. 用质量浓度为 0.1 % 的盐酸吡啶黄对小鼠降结肠黏膜进行局部染色后的共聚焦成像。(a) 表面上皮细胞被充分染色; (b) 亚表面也被染色, 但是几乎无法分辨上皮细胞。红色箭头所指为上皮细胞, 白色箭头所指为隐窝。

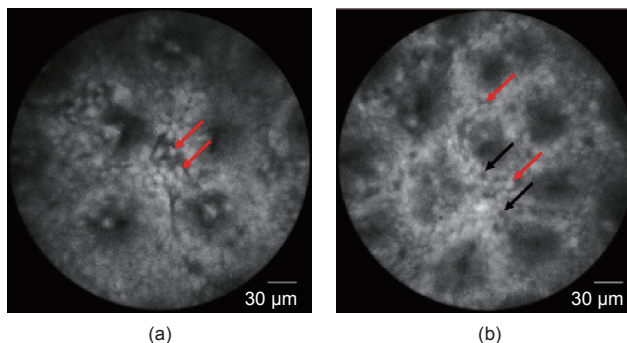


图 12. 用质量浓度为 0.1 % 的盐酸吡啶黄对小鼠降结肠黏膜和升结肠黏膜进行局部染色后的共聚焦成像。(a) 降结肠黏膜, 可见上皮细胞; (b) 升结肠黏膜, 杯状细胞离散地分布在隐窝周围。红色箭头所指为上皮细胞, 黑色箭头所指为杯状细胞。

的工具。

然而, 共聚焦内窥镜仍然存在一些局限性。内窥镜的成像深度使我们的观察范围局限在组织表面, 如小肠上皮细胞 (IEC) 和上皮乳头内毛细血管袢 (IPCL)。小肠上皮细胞以下的组织和细胞如固有层中对肠的运动、感知和免疫都很重要的肠神经系统 (ENS) 和免疫细胞难以被观察到[45]。在下一代共聚焦内窥镜系统中这个缺陷将得到弥补, 如可以考虑结合红外技术来解决。同时, 为了充分利用共聚焦显微成像的光学切片能力, 在未来的发展中也可以通过轴向扫描来移动焦平面, 从而实现约 100 μm 深度的三维组织成像。

临床上常用的共聚焦内窥镜系统通常只有一个激发波长, 这就把荧光染料局限在荧光素钠、盐酸吡啶黄和具有特异性抗体的染料或者标记物这个范围内[46]。这限制了具有细胞或分子特异性或者对人体毒性低、副作用小的染料的使用。在将来, 为适应临床应用, 可发展具有多个激发波长的共聚焦系统用于更宽的荧光染料光谱。由于荧光染料只能在特定的光谱范围内被激发, 所以使用白光作为光源并不合适[36, 37]。与反射光内窥镜相比, 使用荧光成像的共聚焦内窥镜可以获得更多的组

织信息。

共聚焦内窥镜的观察目标一般都是上皮细胞。细胞是生物体的基本结构和功能单元。由于共聚焦内窥镜与常规内窥镜相比具有更高的放大倍数和分辨率，它能够清楚地观察到活体细胞，从而使研究细胞的各种活动成为可能。这样就能更好地揭示细胞活动的过程和机制，同时实现疾病的早期诊断。然而由于细胞的功能在健康和病理条件下有很大区别，这些在目前条件下还很难实现。

综上所述，笔者研制出一台基于光纤束、具有高分辨率和高对比度的共聚焦内窥镜系统。该系统的高分辨率和宽视场已经采用USAF 1951分辨率板和标准光栅进行了测试，并进一步在小鼠组织上得到了证实。共聚焦内窥镜是唯一一种能够用来观察组织表面微结构的内窥镜。从小鼠成像结果中我们看到了结肠的基本结构。小型化光纤探头使该共聚焦内窥镜系统配合常规内窥镜应用于临床成为可能，有助于内窥镜实现在体的组织活检和消化道疾病的早期诊断。

致谢

笔者感谢李慧、田念、周舟和田庚在图像分析中的帮助，也感谢王瀛提供与光纤扫描器相关的信息。笔者感谢华中科技大学同济医学院病理科的聂秀在组织病理样品准备中的帮助。该工作得到了国家科技支撑计划(2011BAI12B06)和国家自然科学基金(61205197, 61178077)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Jiafu Wang, Min Yang, Li Yang, Yun Zhang, Jing Yuan, Qian Liu, Xiaohua Hou, and Ling Fu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

1. B. Stewart, C. P. Wild. *World Cancer Report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014
2. T. A. Stamey, N. Yang, A. R. Hay, J. E. McNeal, F. S. Freiha, E. Redwine. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. Engl. J. Med.*, 1987, 317(15): 909–916
3. J. M. Edmonson. History of the instruments for gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest. Endosc.*, 1991, 37(Suppl. 2): S27–S56
4. B. I. Hirschowitz, C. W. Peters, L. E. Curtiss. Preliminary report on a long fiberscope for examination of stomach and duodenum. *Med. Bull. (Ann Arbor)*, 1957, 23(5): 178–180
5. B. I. Hirschowitz. A personal history of the fiberscope. *Gastroenterology*, 1979, 76(4): 864–869
6. J. Pohl, et al. Comparison of computed virtual chromoendoscopy and conventional chromoendoscopy with acetic acid for detection of neoplasia in Barrett's esophagus. *Endoscopy*, 2007, 39(7): 594–598
7. ASGE Technology Committee; L. M. Wong Kee Song, et al. Chromoendoscopy. *Gastrointest. Endosc.*, 2007, 66(4): 639–649
8. K. K. Wang, N. Okoro, G. Prasad, M. Wong Kee Song, N. S. Buttar, J. Tian. Endoscopic evaluation and advanced imaging of Barrett's esophagus. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, 2011, 21(1): 39–51
9. R. Kiesslich, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer *in vivo*. *Gastroenterology*, 2004, 127(3): 706–713
10. M. Goetz, N. P. Malek, R. Kiesslich. Microscopic imaging in endoscopy: Endomicroscopy and endocytoscopy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11(1): 11–18
11. A. Meining, et al. Direct visualization of indeterminate pancreaticobiliary strictures with probe-based confocal laser endomicroscopy: A multicenter experience. *Gastrointest. Endosc.*, 2011, 74(5): 961–968
12. T. Liu, H. Zheng, W. Gong, C. Chen, B. Jiang. The accuracy of confocal laser endomicroscopy, narrow band imaging, and chromoendoscopy for the detection of atrophic gastritis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2015, 49(5): 379–386
13. M. Goetz. Endomicroscopy and targeted imaging of gastric neoplasia. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, 2013, 23(3): 597–606
14. L. Gintlunas, R. Juškaitis, S. V. Shatalin. Scanning fibre-optic microscope. *Electron. Lett.*, 1991, 27(9): 724–726
15. M. Gu, C. J. R. Sheppard, X. Gan. Image formation in a fiber-optical confocal scanning microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1991, 8(11): 1755–1761
16. S. Kimura, T. Wilson. Confocal scanning optical microscope using single-mode fiber for signal detection. *Appl. Opt.*, 1991, 30(16): 2143–2150
17. A. F. Gmitro, D. Aziz. Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle. *Opt. Lett.*, 1993, 18(8): 565–567
18. M. B. Wallace, P. Fockens. Probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterology*, 2009, 136(5): 1509–1513
19. R. Kiesslich, M. Goetz, M. Vieth, P. R. Galle, M. F. Neurath. Technology insight: Confocal laser endoscopy for *in vivo* diagnosis of colorectal cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2007, 4(8): 480–490
20. M. Goetz, A. Watson, R. Kiesslich. Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J. Biophotonics*, 2011, 4(7–8): 498–508
21. J. Knittel, L. Schnieder, G. Buess, B. Messerschmidt, T. Possner. Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system. *Opt. Commun.*, 2001, 188(5–6): 267–273
22. J. C. Jung, M. J. Schnitzer. Multiphoton endoscopy. *Opt. Lett.*, 2003, 28(11): 902–904
23. A. R. Rouse, A. Kano, J. A. Udovich, S. M. Kroto, A. F. Gmitro. Design and demonstration of a miniature catheter for a confocal microendoscope. *Appl. Opt.*, 2004, 43(31): 5763–5771
24. C. Liang, K. B. Sung, R. R. Richards-Kortum, M. R. Descour. Design of a high-numerical-aperture miniature microscope objective for an endoscopic fiber confocal reflectance microscope. *Appl. Opt.*, 2002, 41(22): 4603–4610
25. M. D. Chidley, K. D. Carlson, R. R. Richards-Kortum, M. R. Descour. Design, assembly, and optical bench testing of a high-numerical-aperture miniature injection-molded objective for fiber-optic confocal reflectance microscopy. *Appl. Opt.*, 2006, 45(11): 2545–2554
26. R. T. Kester, T. Christenson, R. R. Kortum, T. S. Tkaczyk. Low cost, high performance, self-aligning miniature optical systems. *Appl. Opt.*, 2009, 48(18): 3375–3384
27. M. Kyriash, et al. Needle-based fluorescence endomicroscopy via structured illumination with a plastic, achromatic objective. *J. Biomed. Opt.*, 2013, 18(9): 096003
28. W. Piyawattanametha, et al. *In vivo* brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror. *Opt. Lett.*,

- 2009, 34(15): 2309–2311
29. J. Sawinski, D. J. Wallace, D. S. Greenberg, S. Grossmann, W. Denk, J. N. Kerr. Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106(46): 19557–19562
 30. J. Sawinski, W. Denk. Miniature random-access fiber scanner for *in vivo* multiphoton imaging. *J. Appl. Phys.*, 2007, 102(3): 034701
 31. Y. Zhang, et al. A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109(32): 12878–12883
 32. C. M. Lee, C. J. Engelbrecht, T. D. Soper, F. Helmchen, E. J. Seibel. Scanning fiber endoscopy with highly flexible, 1 mm catheterscopes for wide-field, full-color imaging. *J. Biophotonics*, 2010, 3(5–6): 385–407
 33. B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha, J. C. Jung, E. L. M. Cheung, M. J. Schnitzer. Fiber-optic fluorescence imaging. *Nat. Methods*, 2005, 2(12): 941–950
 34. Z. Li, Z. Yang, L. Fu. Scanning properties of a resonant fiber-optic piezoelectric scanner. *Rev. Sci. Instrum.*, 2011, 82(12): 123707
 35. Z. Li, L. Fu. Note: A resonant fiber-optic piezoelectric scanner achieves a raster pattern by combining two distinct resonances. *Rev. Sci. Instrum.*, 2012, 83(8): 086102
 36. R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 1995, 51(6): L7–L21
 37. V. K. Sharma, P. D. Sahare, R. C. Rastogi, S. K. Ghoshal, D. Mohan. Excited state characteristics of acridine dyes: Acriflavine and acridine orange. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2003, 59(8): 1799–1804
 38. A. L. Polglase, W. J. McLaren, S. A. Skinner, R. Kiesslich, M. F. Neurath, P. M. Delaney. A fluorescence confocal endomicroscope for *in vivo* microscopy of the upper- and the lower-GI tract. *Gastrointest. Endosc.*, 2005, 62(5): 686–695
 39. J. M. Jabbour, M. A. Saldua, J. N. Bixler, K. C. Maitland. Confocal endomicroscopy: Instrumentation and medical applications. *Ann. Biomed. Eng.*, 2012, 40(2): 378–397
 40. S. C. Park, M. K. Park, M. G. Kang. Super-resolution image reconstruction: A technical overview. *IEEE Signal Proc. Mag.*, 2003, 20(3): 21–36
 41. S. Lertrattanapanich, N. K. Bose. High resolution image formation from low resolution frames using Delaunay triangulation. *IEEE Trans. Image Process.*, 2002, 11(12): 1427–1441
 42. T. Kuiper, et al. New classification for probe-based confocal laser endomicroscopy in the colon. *Endoscopy*, 2011, 43(12): 1076–1081
 43. M. Goetz, et al. *In vivo* molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 435–446
 44. D. Moussata, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease *in vivo*. *Gut*, 2011, 60(1): 26–33
 45. Y. Goto, H. Kiyono. Epithelial barrier: An interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol. Rev.*, 2012, 245(1): 147–163
 46. S. Foersch, et al. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer *in vivo* using confocal laser endomicroscopy. *Gut*, 2010, 59(8): 1046–1055