

文章编号: 0258-7025(2009)10-2629-07

# 几种典型血细胞的光学相位模型及其分布特征与识别方法

王亚伟 雷海娜\* 卜敏 韩广才

(江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013)

**摘要** 针对提高生物细胞形态检测速度和分类精确度的这一研究热点,以血细胞为主要研究对象,通过对几种典型血细胞的光学特征和形体结构的分析,建立了相应的光学模型。应用 VirtualLab 光学虚拟实验系统进行仿真模块设计和仿真实验。对所获得的血细胞包裹相位分布进行解包裹、去噪光滑处理后,结合相位分布特征分析的结果提出了一种血细胞相位分检快速、精确识别的方法。

**关键词** 光学检测;生物细胞;光学相位模型

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2629

## Distribution Characteristics and Identification of Several Typical Blood Cells under Optical Phase Models

Wang Yawei Lei Haina Bu Min Han Guangcai

(Faculty of Science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

**Abstract** In order to improve detection speed and classification precision of biological cells. Several typical blood cells's optical phase models are set up based on the analysis of their optical characteristics and physical structures. The VirtualLab imitation system is applied to design relevant modules, and the phase distributions of these blood cells are gaired. A fast and accurate identification method is proposed after unwrapping and smoothing of the phase.

**Key words** optical inspecting; biological cells; optical phase; model

### 1 引言

血细胞的大小和形态分布的检测技术涉及了众多学科的理论和技术,检测方法和仪器门类众多。目前,由于光学检测具有非侵入性、无电离辐射、实时、定量、操作模式多等优点成为血细胞检测的主要技术。其中镜检、荧光标记、新型显微识别、流式细胞术等多种方法成为主流。血细胞具有光学穿透性,因此由其相位分布能够准确地反演出细胞形体的三维形态。数字全息与显微技术结合用于生物细胞的微结构观察成为了一个吸引人的研究方向。该方法具有精度高、速度快、全场、实时在线等优点,其研究发展速度极其迅速,短短 10 多年便出现许多科学技术研

究成果。它们分为定性分析技术和定量分析技术两种,定性分析技术以相衬显微(PCM)<sup>[1]</sup>和微分干涉对比显微(DIC)<sup>[2]</sup>为代表;定量分析技术主要有:傅里叶相位显微(FPM)<sup>[3]</sup>、Hilbert 相位显微(HPM)<sup>[4]</sup>、衍射相位显微(DPM)<sup>[5]</sup>、荧光衍射相位显微(DPF)<sup>[6]</sup>、相分散显微技术(PDM)<sup>[7]</sup>。此外,全息相位校正技术<sup>[8]</sup>、光镊测量技术<sup>[9]</sup>和细胞光散射偏振特征<sup>[10]</sup>等的研究,都极大丰富了该研究方向的内容。

本文通过对血细胞光学特征和形体结构的分析,建立了相关的细胞光学模型。应用 VirtualLab 光学虚拟实验系统进行仿真模块设计和实验。结合相位分布特征分析,提出了一种血细胞分检识别方法。

收稿日期: 2009-05-31; 收到修改稿日期: 2009-08-10

基金项目: 江苏省六大人才高峰基金(06-E-059)和江苏省自然科学基金(BK2008230)资助课题。

作者简介: 王亚伟(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事光信息科学与技术等方面的研究。

E-mail: jszjwyw@yahoo.com.cn

\* 通信联系人。E-mail: leihn411@163.com

## 2 血细胞光学模型

血液由血浆和血细胞组成。血细胞则分为红细胞(erythrocyte)、白细胞(leukocyte)和血小板三类。它们的大小和形态结构差异都比较大。另外根据细胞质中是否有特殊颗粒,白细胞又可分为非粒白细胞和粒白细胞,而粒白细胞又可分为嗜酸性细胞、嗜中性细胞和嗜碱性细胞;非粒白细胞可分为淋巴细胞和单核细胞。选用红细胞、非粒白细胞、柱核白细胞和球核白细胞4种典型的细胞进行研究。由于细胞组织的主要成分是水,故选用以水为介质的细胞相位等效模型,其形态结构和大小参考对应细胞的实际特征。

红细胞呈双凹圆盘状,没有细胞核,直径约 $7\sim 8.5\ \mu\text{m}$ ,中央较薄(约为 $1.0\ \mu\text{m}$ ),周边较厚(约为 $2.0\ \mu\text{m}$ )。基于这些特征及已有研究结果的曲线旋转体模型<sup>[11]</sup>,选用(1)式所示的两个曲面组合成红细胞光相位模型,选取直径为 $7.7\ \mu\text{m}$ ,中央厚度为 $1\ \mu\text{m}$ 。

$$\begin{cases} h(x,y) = \frac{c r^2}{1 + \sqrt{1 - (1 + \kappa)c^2 r^2}} - 0.7r - 0.8r^3 \\ h(x,y) = \frac{-c r^2}{1 + \sqrt{1 - (1 + \kappa)c^2 r^2}} + 0.7r + 0.8r^3 \end{cases}, \quad (1)$$

其中 $h$ 为曲面的侧面高度, $R$ 为半径, $c = 1/R$ 表示曲面的曲率, $\kappa$ 是由仿真系统设定的曲面形态常数, $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ ,三维模型见图1。

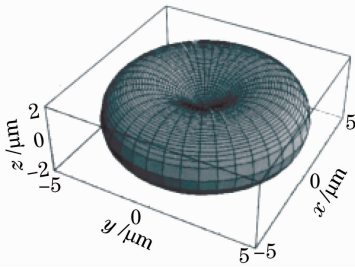


图1 红细胞模型图

Fig. 1 Erythrocyte model

非粒白细胞分为淋巴细胞和单核细胞,外形为球形或椭球形,体积比红细胞要大,直径为 $6\sim 20\ \mu\text{m}$ 。

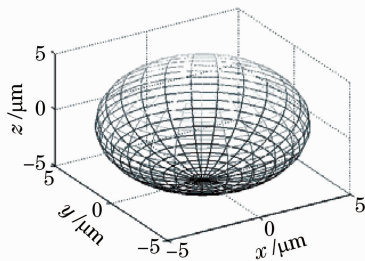


图2 非粒白细胞模型图

Fig. 2 Agranular leukocyte model

选用(2)式所示的直径为 $12\ \mu\text{m}$ 的球体作为非粒白细胞的光相位模型。三维模型见图2所示,其他相关参数在仿真系统中设定。

$$\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R. \quad (2)$$

粒白细胞的外形同样为球体,直径为 $10\sim 15\ \mu\text{m}$ ,内核形态不一,大小不等,并且有的分布也不均匀。基于已有研究成果的旋转椭球体模型<sup>[12]</sup>和真实细胞特征,选用两种不同的内核同心放置在球体中心,放置小球,构成(3)式所示的球核白细胞;放置圆柱构成(4)式所示的柱核白细胞。三维图分别如图3,图4所示。

$$\begin{cases} \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R_1 \\ \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R_2 \end{cases}, \quad (3)$$

其中 $R_1$ 为外球半径, $R_2$ 为内核球的半径。

$$\begin{cases} \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R_1 \\ \sqrt{x^2 + y^2} = R_2 \\ z = -d/2 \\ z = d/2 \end{cases}, \quad (4)$$

其中 $R_1$ 为外球半径, $R_2$ 为内核柱体半径, $d$ 为柱体的高。

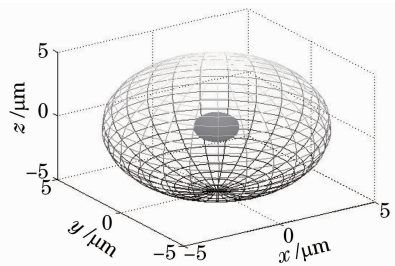


图3 球核白细胞模型

Fig. 3 Granular leukocyte model with a spherical nucleus

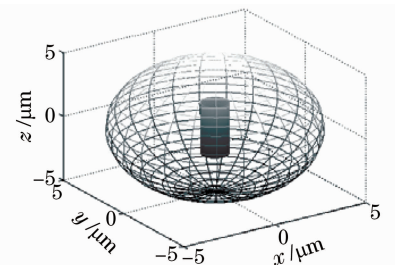


图4 柱核白细胞模型

Fig. 4 Granular leukocyte model with a cylindrical nucleus

## 3 虚拟仿真实验

VirtualLab<sup>[13]</sup>光学虚拟仿真系统是以麦克斯韦电磁场理论为基础,以电磁波界面传输思想为指导,运用有限元(FEM)数字计算方法和计算机图像处理

技术设计研发出来的一种光学虚拟仿真实验计算机软件系统。应用 VirtualLab4. 2 虚拟仿真系统对图 1~4 四种细胞光相位模型进行虚拟仿真, 获得它们在相干光源下的相位分布, 并对其比较分析。此外还仿真了光束以  $0.6^\circ$  斜入射时的红细胞和柱核白细胞的相位分布, 用以对位置取向随机性进行比较性研究。使用 VirtualLab 仿真的可行性已由文献[14]说明, 在此将进一步验证。取圆盘厚度为  $4 \mu\text{m}$ , 直径为  $12 \mu\text{m}$ , 圆盘介质为水 ( $n=1.3319$ ); 取直径为  $30 \mu\text{m}$ , 波长为  $488 \text{ nm}$  的平面波光源, 垂直圆盘入射, 接收到圆盘的近场相位分布如图 5 所示。

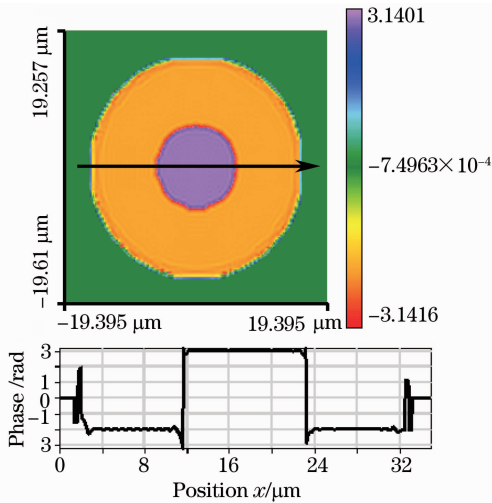


图 5 圆盘相位分布

Fig. 5 Phase distribution of disc

根据光的干涉原理, 光经过圆盘的光程差为

$$\delta = (n-1)h = 1.3276(\mu\text{m}), \quad (5)$$

其中  $n=1.3319$  为圆盘的折射率,  $h=4$  为圆盘的厚度, 由于  $\delta > \lambda$ , 故圆盘的相位变化超出了一个周期  $2\pi$  的范围。而计算机处理出的相位一般都在一个  $2\pi$  周期内, 为了便于与图 5 的模拟相位值比较, 可以把相位差减去  $2k\pi$  使相位差控制在一个周期内, 又因为  $\lambda=488 \text{ nm}$ ,  $\delta/\lambda \approx 2.72$ , 所以可取  $k=2$ , 从而相位差表示为

$$\Delta\phi = \frac{2\pi\delta}{\lambda} - 4\pi \approx 4.53, \quad (6)$$

由图 5 知模拟实验得到圆盘的相位变化为  $4.9 \text{ rad}$ , 这与 (6) 式所示的理论结果间误差为  $7.9\%$ 。因此可以进一步验证 VirtualLab 仿真软件系统对本研究的适用性。

在 VirtualLab4. 2 虚拟仿真系统中, 选用 Spread Sheet 应用窗口为设计平台, 光源各主要参数设置为: 光源类型为平面波; 入射场直径为  $20 \mu\text{m}$

的圆形(对于红细胞的直径设置为  $30 \mu\text{m}$ ); 波长为  $488 \text{ nm}$ ; 光强权重为 1; 相对边缘宽度为  $3\%$ ; 偏心为 0; 介质实折射率为  $1.0003$ ; 采样因子为 2; 嵌入结构数为 10; 偏振类型为线偏振; 入射方式为正入射; 入射波传播算子为 combined SPW/Fresnel operator; 转换算子为 Complex Amplitude Field to Local Plane Wave Field; 出射场传播算子为 Combined SPW/Fresnel Operator; 数据完善模式为 Nearest Neighbor Interpolation; 球形相位半径设为 Detect; 虚拟视场为 Close Field。

细胞模型在 VirtualLab 虚拟仿真系统的参数根据具体光学模型形态和折射率数据设定。所有模型的介质折射率为  $1.3319$ , 细胞核的介质折射率为  $1.6007$ , 模型介质和核介质的吸收系数均为  $0.1/\text{m}$ 。红细胞模型: 由两个对称曲面组成, 其组合曲面为 Aspherical Interface 和 Plane Interface, 组成后呈双凹圆盘状, 中央为  $1 \mu\text{m}$ , 周围边缘为  $2 \mu\text{m}$ , 直径为  $7.7 \mu\text{m}$ 。非粒白细胞模型: 由两个对称的 Aspherical Interface 组成, 呈球形, 直径为  $12 \mu\text{m}$ 。球核白细胞模型: 由两个对称的 Aspherical Interface 曲面, 内包含两个对称 Aspherical Interface 构成, 组成后形态呈现中心有一个球核的球体, 球核直径为  $6 \mu\text{m}$ , 球体直径为  $12 \mu\text{m}$ 。柱核白细胞模型: 由两个对称的 Aspherical Interface 曲面, 内包含两个 Plane Interface 构成, 组成后形态呈现为中心有一个圆柱核的球体, 圆柱核端面直径为  $2 \mu\text{m}$ , 高为  $6 \mu\text{m}$ , 球体直径为  $12 \mu\text{m}$ 。另外, 还选用红细胞和柱核细胞进行了光源以  $0.6^\circ$  斜入射的实验。以上几种细胞模型经 VirtualLab4. 2 虚拟仿真系统模拟得到其近场的相位分布分别如图 6~11 所示。

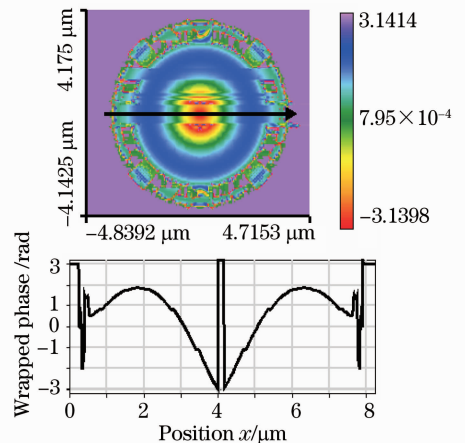


图 6 红细胞相位分布

Fig. 6 Phase distribution of erythrocyte

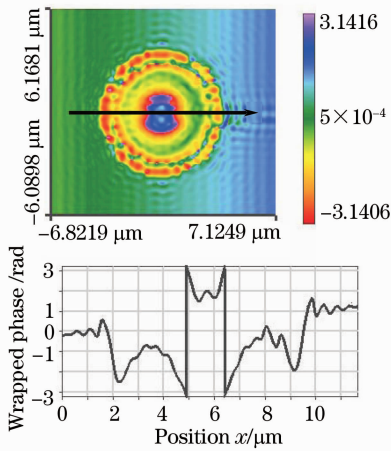


图 7 斜入射的红细胞相位分布  
Fig. 7 Phase distribution of erythrocyte with oblique incidence

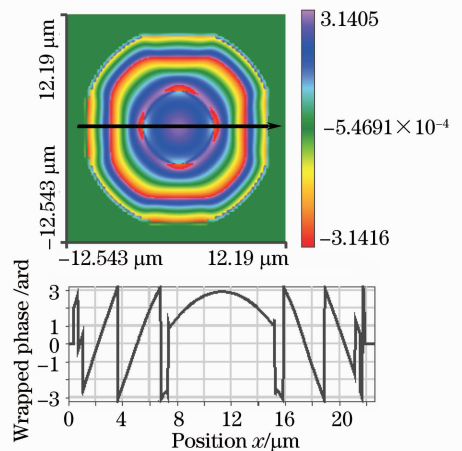


图 10 柱核白细胞相位分布  
Fig. 10 Phase distribution of granular leukocyte with a cylindrical nucleus

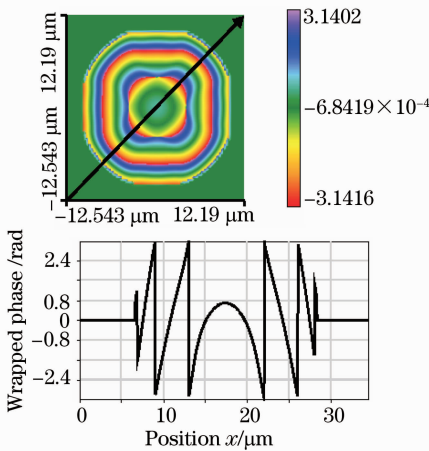


图 8 非粒白细胞相位分布  
Fig. 8 Phase distribution of agranular leukocyte

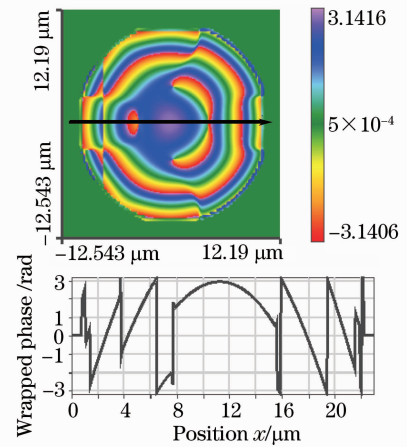


图 11 斜入射的柱核白细胞相位分布  
Fig. 11 Phase distribution of granular leukocyte with a cylindrical nucleus with oblique incidence

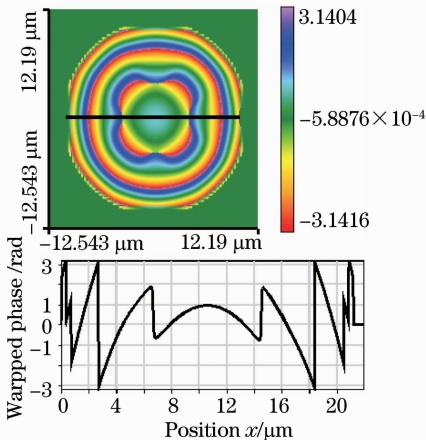


图 9 球核白细胞相位分布  
Fig. 9 Phase distribution of granular leukocyte with a spherical nucleus

## 4 特征分析与细胞类别的相位检测识别方法

### 4.1 相位解包裹处理

沿包裹相位数据矩阵的行或者列方向,比较相邻两个点的相位值,若差值小于  $-\pi$ ,则后一点的相位值加上  $2\pi$ ;若差值大于  $\pi$ ,则后一点的相位值减去  $2\pi$ 。不考虑噪声对包裹相位的影响,则解包裹后的相位  $\phi(i, j)$  理论上可以表示为

$$\phi(i, j) = \begin{cases} \Phi(i, j) + 2\pi \times k(i, j) & (i, j) \text{ is valid region} \\ 0 & (i, j) \text{ is invalid region} \end{cases} \quad (7)$$

其中  $k(i, j) = W^{-1}[\Phi(i, j), \Phi(N_{ij}^8)]$ ,  $k$  取值为整数,  $\Phi(i, j)$  为  $(i, j)$  点的包裹相位数据,  $W^{-1}$  是一个解包函数,  $N_{ij}^8$  为  $(i, j)$  的 8 点领域,表示为

$$N_{ij}^{\circ} = \{(m,n) | (m,n) \in T, \Phi(m,n) \text{ is valid region}\}$$

其中  $T = \{(i-1, j-1), (i-1, j), (i-1, j+1), (i, j-1), (i, j+1), (i+1, j-1), (i+1, j), (i+1, j+1)\}$ 。理想无噪声、边界形状规则的包裹相面，可以直接通过行或列扫描法对空间相邻点的相位值进行比较，来完成解包。但实际干涉图处理中，因为光路系统中光源的边缘效应，被测样本的形状或某些随机因素会影响有效数据的边缘形状，使其呈现复杂的不规则性。根据该方法本文对几种细胞模型的一维相位分布图进行了相位解包裹处理，对应的解包裹相位图如图 12~17 所示。

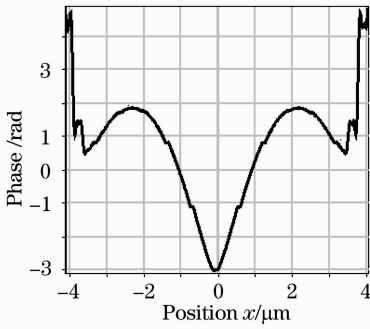


图 12 红细胞解包裹相位

Fig. 12 Unwrapped phase of erythrocyte

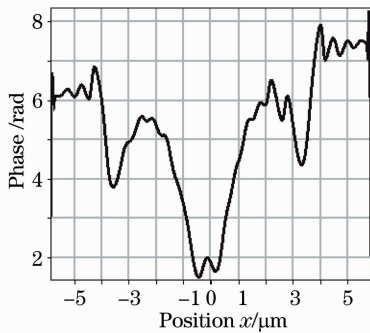


图 13 斜入射的红细胞解包裹相位

Fig. 13 Unwrapped phase of erythrocyte with oblique incidence

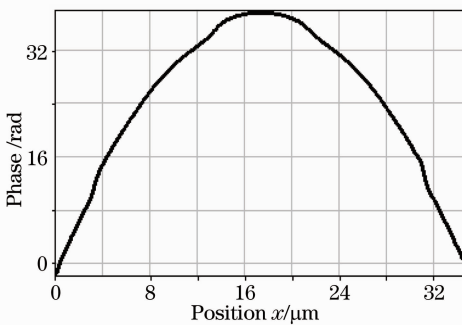


图 14 非粒白细胞解包裹相位

Fig. 14 Unwrapped phase of agranular leukocyte

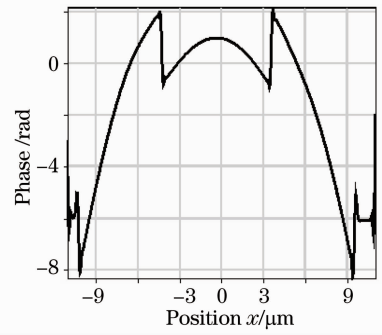


图 15 球核白细胞解包裹相位

Fig. 15 Unwrapped phase of granular leukocyte with a spherical nucleus

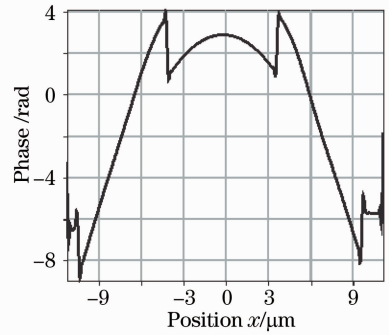


图 16 柱核白细胞解包裹相位

Fig. 16 Unwrapped phase of granular leukocyte with a cylindrical nucleus

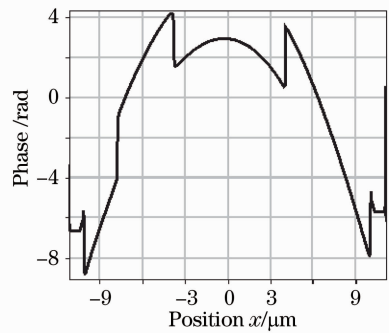


图 17 斜入射的柱核白细胞解包裹相位

Fig. 17 Unwrapped phase of cylindrical nucleus inside granular leukocyte with oblique incidence

图 18 为实验测得的正常红细胞相位分布，包括沿着细胞直径和垂直于细胞直径方向的两个相位分布，该实验结果是 Gabriel Popescu<sup>[15]</sup>应用 Hilbert 相位显微方法得到的；图 19 为实验测得的球形 HeLa 细胞的相位分布，该结果为 2006 年 Niyom Lue 等<sup>[16]</sup>应用 Hilbert 相位显微方法为获得细胞平均折射率而得到的，图中包括实验测量出的相位及其拟合曲线和细胞的折射率。图 12 和图 14 为参考以上两实验参数，应用 VirtualLab 虚拟仿真系统得



到的结果,二者的一致性可以证明本虚拟实验结果的可靠性。

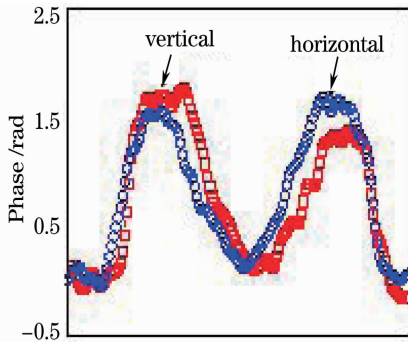


图 18 红细胞的实验测量结果

Fig. 18 Experimental result of erythrocyte's phase testing

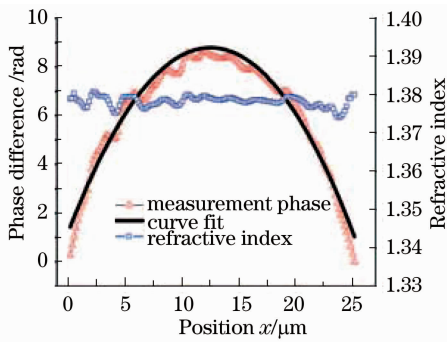


图 19 球形 HeLa 细胞的实验测量结果

Fig. 19 Experimental result of spherical HeLa cell's phase testing

## 4.2 细胞相位识别

对上述解包裹相位图中有噪声的图进行最小二乘法平滑去噪处理,如图 13 处理后得到图 20。对图 12~20 分布特征分析后可以发现:一般情况下选取一维特征方向就可以较好地反映出细胞的形体和结构对称的相位分布特征;细胞的一维解包相位分布比较直观地反映了细胞形体和结构在一维方向的变化;对于球(或者椭球)细胞(淋巴细胞和单核细胞)对应相位分布空间内,相位一维分布曲线连续,仅有一个极大值,一阶导数分布也连续;红细胞相位一维分布曲线连续,有两个极大值,一阶导数分布连续或者存在一个奇点;球粒细胞(粒白细胞)相位一维分布曲线连续,有多于两个极大值,一阶导数分布不连续,存在多于一个的奇点;细胞检测时在偏离垂直入射的情况下,其上述分布特征不变。根据此特征分析结果,对虚拟实验获得的细胞一维分布曲线通过自行编译的计算机程序进行判读一维曲线跟踪扫描判读,即可对细胞类别进行准确识别。本文对于上述一般情况下的虚拟仿真实验结果的细胞类别识别达到了令人满意的结果。

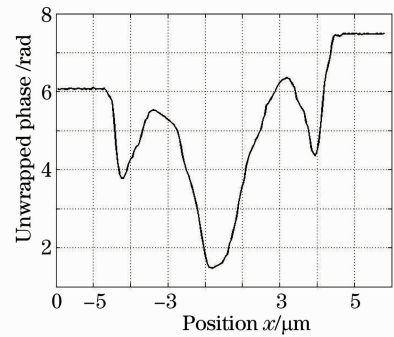


图 20 去噪后的斜入射红细胞解包裹相位

Fig. 20 Unwrapped phase of erythrocyte with oblique incidence after deroising

## 5 结 论

根据对血细胞形体特征的分析结果所建立的几种典型血细胞相位模型可以较为接近地表示相对应细胞的光相位真实分布,应用 VirtualLab 虚拟仿真实验系统可以获得接近真实情况下的细胞相位特征分布,典型细胞情况下其相位一维分布曲线通过解包和平滑处理后可以较好地直观反映细胞的形体类别特征,所建立的由细胞相位一维分布曲线连续性和一阶导数连续性的分析识别和判读方法是一种较为精确的识别方法,可弥补流式细胞仪(FCM)识别精确度的不足。研究表明,血细胞的相位分布信息可以较好地用于细胞形态的精确识别和定量分析。关于细胞大小分布的识别还将依靠于其他技术(如散射幅值分析法)辅助识别,关于特殊情况下(如变异细胞或者细胞大取向角检测情况下的检测)的细胞定量识别方法还有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 F. Zernike. How I discovered phase contrast[J]. *Science*, 1955, **121**(3141): 345~349
- 2 A. J. Gray, D. Young, N. J. Martin *et al.*. Cell identification and sizing using digital image analysis for estimation of cell biomass in high rate algal ponds[J]. *J. Applied Phycology*, 2002, **14**(3): 193~204
- 3 G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**( 21): 2503~2505
- 4 Takahiro Ikeda, Gabriel Popescu, Ramachandra R. Dasari *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(10): 1165~1167
- 5 Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Ramachandra R. Dasari *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**( 6): 775~777
- 6 Yong Keun Park, G. Popescu, K. Badizadegan *et al.*. Diffraction phase and fluorescence microscopy[J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(8): 8263~8268
- 7 Andrew Ahn, Changhui Yang, Adam Wax *et al.*. Harmonic

- phase-dispersion microscope with a Mach-Zehnder interferometer [J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(7): 1188~1190
- 8 Di Jianglei, Zhao Jianlin, Fan Qi *et al.*. Phase correction of wavefront reconstruction in digital holographic microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(1): 56~61  
邸江磊, 赵建林, 范琦等. 数字全息显微术中重建物场波前的相位校正[J]. *光学学报*, 2008, **28**(1): 56~61
- 9 Yu Youli, Zhang Lei, Zhang Zhenxi. Computation for optical trap stiffness versus refractive index of biological cell [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(6): 1076~1079  
喻有理, 张磊, 张镇西. 细胞光阱刚度与折射率关系理论计算[J]. *光学学报*, 2007, **27**(6): 1076~1079
- 10 Deng Yong, Lu Qiang, Luo Qingming. Measurement of particle size distribution and refractive index using azimuth-resolved based diffuse backscattering light [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(8): 1214~1219  
邓勇, 鲁强, 骆清铭. 用基于方位分辨的漫后向散射光确定粒子尺寸分布及相对折射率[J]. *光学学报*, 2006, **26**(8): 1214~1219
- 11 Wang Yawei, Han Guangcai, Liu Ying *et al.*. Light scattering virtual simulation of red blood cell under double curve symmetrical model [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(12): 1676~1681  
王亚伟, 韩广才, 刘莹等. 双曲面对称体红细胞模型的光散射虚拟仿真[J]. *中国激光*, 2007, **34**(12): 1676~1681
- 12 Wu Dajian, Wang Yawei, Han Guangcai. Model for elastic light scattering from nucleated cells [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(12): 1670~1675  
吴大建, 王亚伟, 韩广才. 有核细胞的弹性光散射模型[J]. *光学学报*, 2005, **25**(12): 1670~1675
- 13 VirtualLab User's Manual, Lighttrans, www.lighttrans.com (EB/OL)2007
- 14 Wang Yawei, Han Guangcai, Liu Ying *et al.*. Simulation study on the phase distribution of blood cells by virtual imitation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(6): 1595~1600  
王亚伟, 韩广才, 刘莹等. 血液细胞光相位分布特征的虚拟仿真研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(6): 1595~1600
- 15 Gabriel Popescu. Quantitative phase imaging and applications; a review. [http://light.ece.uiuc.edu/QPI\\_review.htm#\\_Toc146699134](http://light.ece.uiuc.edu/QPI_review.htm#_Toc146699134), (EB/OL) October 5, 2006
- 16 N. Lue, G. Popescu, T. Ikeda *et al.*. Live cell refractometry using microfluidic devices [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(18): 2759~2761