

文章编号: 0258-7025(2009)06-1595-06

血液细胞光相位分布特征的虚拟仿真研究

王亚伟¹ 韩广才^{1*} 刘莹¹ 程晓农¹ Frank Wyrowski²

¹江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013

²Institute of Applied Physics, University of Jena, Germany Jena D-07743

摘要 为能够充分利用细胞光散射的全息信息,以更好地对生物细胞类别进行解构,根据血液细胞的光穿透特性,建立了血液细胞中红细胞(RBC)、白细胞(WBC)中粒细胞和非粒细胞的典型细胞光散射模型。借助于数字相位显微(DPM)技术的基本方法和实验条件参数,应用 VirtualLab™ 光学虚拟仿真实验系统,获得了血液细胞在光散射下的虚拟仿真相位分布和光强分布。针对所获得的相位和光强分布图谱进行了分布特征分析,发现了相位分布直接与细胞形态结构密切相关。该点可作为细胞类别分检的一个新的重要依据,该方法相对于 3D 重建方法来说计算量少、无需很多的边界条件。这种由细胞相位分布解构细胞形态的检测方法可为提升细胞检测技术和发展检测方法的研究提供一种新突破方向。

关键词 光学全息; 细胞检测; 虚拟仿真; 相位分布

中图分类号 O436.2; O438.1 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093606.1595

Simulation Study on Phase Distribution of Blood Cells by Virtual Imitation

Wang Yawei¹ Han Guangcai¹ Liu Ying¹ Cheng Xiaonong¹ Frank Wyrowski²

¹Faculty of Science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

²Institute for Applied Physics, University of Jena, Jena D-07743, Germany

Abstract In order to measure different life-cells with more scattering information of hologram, light propagation models of red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) are built based on their optical characters and the digit holograph function of the VirtualLab™ imitation system. The distributions of cells, scattering phase and their intensity are achieved after using this virtual imitation experiment system according to the digit phase microscopy (DPM) method and its experimental parameters. These distribution characters are studied and it is found that the phase distributions can be used as an important criterion for testing cells, distribution because of their relationship. Comparing the 3-D building method, this cell-constructing method based on the phase analysis needs fewer confine condition and less counting. It provides a breakthrough for developing cell's measurement in technique and method.

Key words optical hologram; cells-measuring; virtual imitation; phase distribution

1 引 言

由于生物细胞具有光学穿透性的特征,因此由相位分布能够准确地反演出细胞形体的三维形态,该方法常常称为全息相位显微。1994 年 Schnar 和 Jueptner 首次将 CCD 与计算机进行连接应用,将数字全息与显微技术结合用于生物细胞的微结构观察,成

为了其中一个最为吸引人的研究方向。由于该方法具有精度高(轴向分辨率达到了 $5 \text{ nm}^{[1]}$)、速度快(目前已经达到 $300 \text{ 幅/s}^{[2]}$)、可全场、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^[2]。G. Popescu 等^[3] 分别拓展了数字相位全息显微技术,获得了细胞的瞬态 3D 显微

收稿日期: 2008-06-17; 收到修改稿日期: 2008-09-28

基金项目: 江苏省六大人才高峰基金(06-E-059)、江苏大学创新基金(04cx06)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领域等方面的研究。

E-mail: jszjwyw@yahoo.com.cn

* 通信联系人: E-mail: gchan@uj.s.edu.cn

图。2007 年 Wonshik Choil 等^[4]应用数字相位显微 (DPM) 技术得到了目前世界上最为翔实的反映细胞内部动态的图像(宫颈癌细胞内部结构的三维图像), 而无需借助荧光标记物或其他外加的造影剂, 整个过程只需大约 0.1 s。此外, 细胞光散射偏振特征的研究^[5,6]、光镊测量技术^[7,8]、Raman 光谱检测技术^[9,10]、细胞核结构对光散射特征影响的研究^[11,12], 以及数字全息相位技术等的研究^[13], 这些成果极大地丰富了该方向的内容。

本文围绕目前国外对细胞精密检测技术发展的研究方向, 针对细胞形态精密检测和细胞瞬态分类的国际热点研究问题, 取主要生物细胞检测对象中的几种典型血液细胞为研究对象, 以数字相位显微 (DPM) 和流式细胞仪 (FMC) 为基本实验参考条件, 应用基于电磁波介面传输思想的 VirtualLabTM 光学虚拟仿真实验系统, 通过该系统模块功能的优化选择, 血液细胞的光学特征研究以及模型的建立 (建立了血液细胞中红细胞 (RBC)、白细胞 (WBC) 中粒细胞和非粒细胞的典型细胞光传输模型), 虚拟仿真了血液细胞的光散射, 获得了这几种典型细胞的相位分布和光强发布。并针对所获得的相位分布和光强发布图谱特征进行了分析。

2 最新典型细胞相位光全息检测技术

数字相位显微技术主要是应用光干涉, CCD 数字成像技术和计算机的三维重建数字处理技术来高精度地显示细胞的三维形态。目前数字相位显微技术的方法较多, 其基本思想都是基于干涉方法, 虽然干涉方法形式多样, 但是都能够对不同细胞进行不同精度和不同速度的数字相位检测和细胞的 3-D 形态重建。所用激光光源也不同, 在可见光中就有 488 nm, 523 nm, 632.8 nm 等, 但光束基本为平行和会聚光, 接收器基本为 CCD, 相位的获取是由参考光和物光干涉条纹而得到, 所研究对象主要为血液细胞。

图 1 为 G. Popescu 对于 40 μm 标准聚苯乙烯球应用 Mach-Zehnder 干涉方法得到的 PDM 相位分布图谱^[14], 图 2 为参考其实验条件参数, 应用 VirtualLabTM 系统得到的虚拟实验结果, 可见两者存在着完全的一致性。

3 几种典型血液细胞的光学模型

由于 FCM 检测的对象主要为血液细胞, 主要

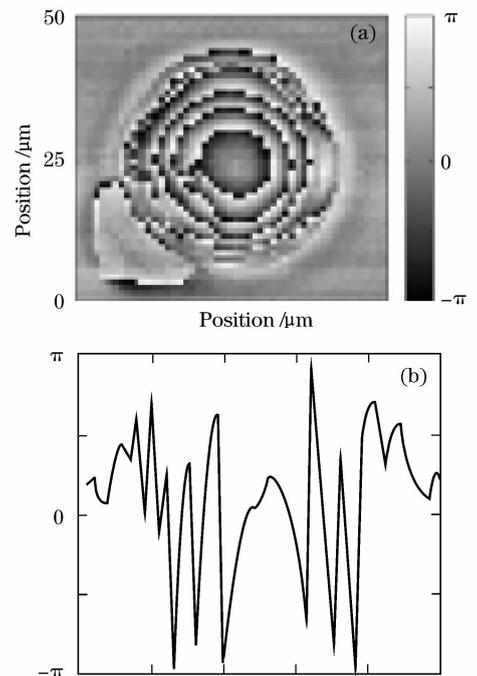


图 1 聚苯乙烯标准球的实验测量结果

Fig. 1 Experimental result of polystyrene

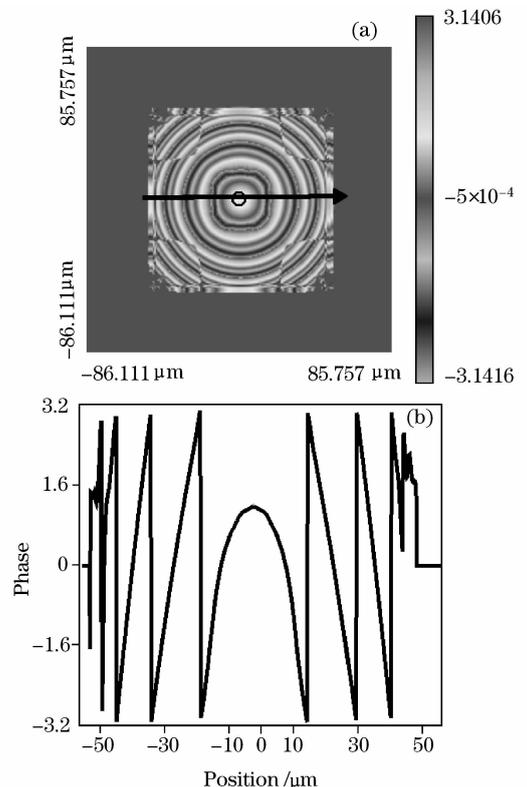


图 2 聚苯乙烯标准球的虚拟仿真结果

Fig. 2 Virtual imitation result of polystyrene

针对血液中的红细胞 (erythrocyte, red blood cell) 和白细胞 (leukocyte, white blood cell) 两大类细胞开展研究, 这两类细胞的形态结构差异较大。红细胞直径 7 ~ 8.5 μm , 呈双凹圆盘状, 中央较薄

($1.0 \mu\text{m}$), 周缘较厚($2.0 \mu\text{m}$), 没有细胞核。白细胞为无色有核的球形细胞, 体积比红细胞大, 根据细胞质中是否含有特殊颗粒, 可把白细胞分为粒细胞和无粒细胞, 粒细胞主要有嗜中性、嗜酸性和嗜碱性。嗜中性粒细胞呈球形, 直径 $10\sim 12 \mu\text{m}$, 细胞核形态不一, 有的呈腊肠状, 有的呈分叶状, 叶间有细丝相连, 细胞质内的特殊颗粒细小, 分布均匀; 嗜酸粒细胞呈球形, 直径 $10\sim 15 \mu\text{m}$, 细胞核形状很不规则, 核常为 2 叶, 颗粒粗大, 大小一致, 分布均匀; 嗜碱粒细胞呈球形, 直径 $10\sim 12 \mu\text{m}$ 。胞核分叶或呈 S 形或不规则形, 颗粒大小不等, 分布不均匀。无粒细胞主要有淋巴细胞和单核细胞。淋巴细胞呈圆形或椭圆形, 大小不等, 直径 $6\sim 8 \mu\text{m}$ 的为小淋巴细胞, $9\sim 12 \mu\text{m}$ 的为中淋巴细胞, $13\sim 20 \mu\text{m}$ 的为大淋巴细胞; 单核细胞呈圆形或椭圆形, 是白细胞中体积最大的细胞, 直径 $14\sim 20 \mu\text{m}$, 胞核形态多样, 呈卵圆形、肾形、马蹄形或不规则形等。基于细胞组织的成分主要为水, 因此细胞光学等效模型均取水为介质, 形态结构和大小将参照其细胞的形态结构和大小特征而定。由于血液细胞形态结构的多样性, 并考虑到研究结果的可比性, 在此仅作 3 种典型的、具有代表性的光学等效模型分别表示红细胞、非粒白细胞和粒白细胞。

已有研究结果的红细胞模型是用 4 条曲线旋转组合而成^[15], 在此作了简化仅用下面的两个曲面组合而成, 最大直径为 $7.7 \mu\text{m}$, 具体相关物理参数在仿真系统中确定。

$$h_{(x,y)} = \frac{cr^2}{1 + \sqrt{1 - (1+k)c^2r^2}} - 0.7r - 0.8r^3, \quad (1)$$

$$h_{(x,y)} = \frac{-cr^2}{1 + \sqrt{1 - (1+k)c^2r^2}} + 0.7r + 0.8r^3, \quad (2)$$

其中 h 为曲面变量, $c = \frac{1}{R}$, R 为半径, k 为形态常数(可由系统确定), $r = \sqrt{x^2 + y^2}$, x, y 为垂直光轴(z)平面的变量。

非粒白细胞外形为球体, 模型取直径为 $12 \mu\text{m}$, 其曲面方程为

$$\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R. \quad (3)$$

粒白细胞同样外形为球体, 内核形态多样, 为能够简单地体现所研究问题的特征, 在此取圆盘视为核放置在球的中心, 所以有两组曲面组成粒白细胞的模型, 为

$$\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} = R_1, \quad (4)$$

$$\begin{cases} \sqrt{x^2 + y^2} = R_2 \\ z = 0 \\ z = d \end{cases}. \quad (5)$$

4 细胞在虚拟仿真下的相位和光强分布

应用 VirtualLab™ 3.5 光学工程虚拟仿真软件系统对上述 3 种细胞模型进行虚拟仿真, 研究其在相干光源下的相位和光强分布状态。为了确定该软件应用的可行性, 首先选取劈尖为模型进行验证性论证实验。取劈尖面积为 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 两平面夹角为 6° , 取介质为水($n = 1.3319$)。根据实际实验条件和软件模块特征, 选取波长为 488 nm 的平面波激光光源, 平行传输, 考虑 Fresnel 效应, 探测器位置分为近场和远场两种情况, 得到劈尖的相位分布如图 3 所示。

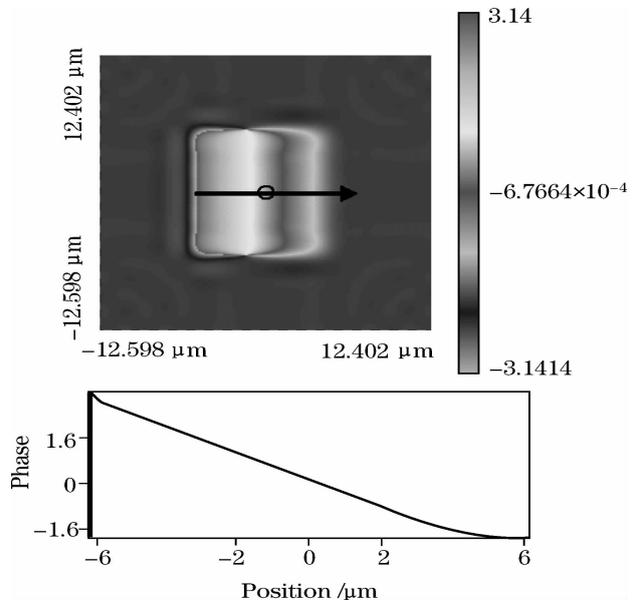


图 3 劈尖相位分布

Fig. 3 Phase distribution of rip
根据劈尖的光干涉理论, 有如下计算:
光经过该劈尖最大厚度处的光程差为

$$\begin{aligned} \delta_m &= 2L \times \pi \times \frac{\alpha}{360} \times (n - 1) = \\ &2 \times 10 \times \pi \times \frac{6}{360} \times (1.3319 - 1) \approx \\ &347.56 \text{ nm}. \end{aligned} \quad (6)$$

该状态下产生的最大相位变化为

$$\Delta\phi = 2\pi \times \frac{\delta_m}{\lambda} = 2\pi \times \frac{347.56}{488} \approx 4.47, \quad (7)$$

其中 L 为劈尖长度, α 为其夹角, n 为其折射率, λ 为真空中的波长。当 $\delta_m \leq \lambda$ 时, 劈尖的相位将呈线性变化, 未完成一个周期的相位变化。从图 1 中可以看出虚拟结果的最大相位变化为 4.7, 其虚拟结果与理论结果的误差仅为 5%。由此可说明该仿真软件系统完全可适用于本文研究目的。

在 VirtualLab™ 3.5 虚拟仿真系统的应用窗口中, 光源各主要参数取值波长为 488 nm; 光强权重为 1; 相对边缘为 3%; 直径为 60 μm ; 偏心为 0; 介质实数折射率为 1.0003; 采样因子为 2; 嵌入结构数为 10; 偏振类型: Linearly Polarized; Mode: SPW(Spectrum of plane wave)。其他主要相关参数取值为: 入射波传播算子: SPW; 出射波传播算子: Combined SPW/Fresnel Operator; 转换方式: Complex Amplitude Field to Local Plane Wave; 数据完善模式: Cubic 6 Points Interpolation; 球形相位半径: Detect; 虚拟视图: Close Field, Far Field; 输入场预算精度因子为 2; 输出场采样精度因子为 2。关于细胞模型参数分别根据其光学模型中的形态数据、介质折射率和吸收系数决定。红细胞模型: 表面由两个对称组合曲面组成, 其组合曲面为 Aspherical Interface 和 Plane Interface。组成后呈双凹圆盘状, 中央为 1.0 μm , 周缘为 1.8 μm , 直径为 7.7 μm , 介质折射率为 1.3319, 吸收系数为 0.1 /m。非粒白细胞模型: 表面由两个对称的 Aspherical Interface 组成, 呈球形直径为 12 μm , 介质折射率为 1.3319, 吸收系数为 0.1 /m。粒白细胞模型: 表面由 4 个对称曲面组成, 其曲面为两个对称的 Aspherical Interface 和两个对称的 Plane Interface 组成, 组成后形态呈球状中心有一圆盘的核, 圆盘核的直径为 3 μm , 厚度为 2 μm , 介质折射率为 1.6007, 吸收系数为 0.1 /m, 球体的直径为 12 μm , 介质折射率为 1.3319, 吸收系数为 0.1 /m。这 3 种细胞模型经 VirtualLab™ 3.5 虚拟仿真系统处理后得到其相位分布, 近场和远场光强分布分别如图 4~8 所示。

5 讨 论

图 4~6 直接显示了平面光波通过细胞模型后近场的相位分布, 该相位的显示直接由软件应用光界面传输理论^[16] 所产生, 而并非是利用干涉方法, 通过产生干涉条纹分布来间接显示相位的变化。因此, 对于图谱的定性解释可以直接采用在 2π 周期

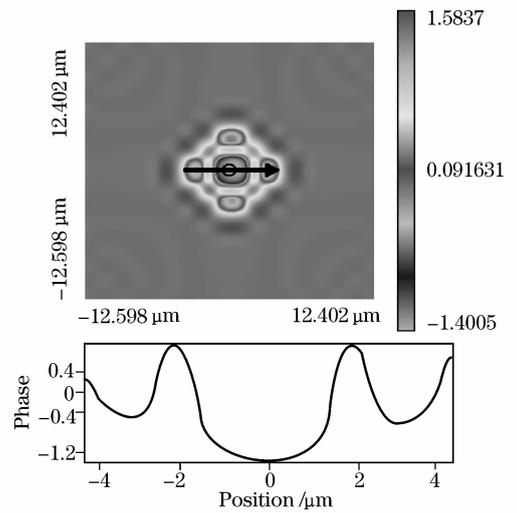


图 4 红细胞相位分布

Fig. 4 Phase distribution of RBC

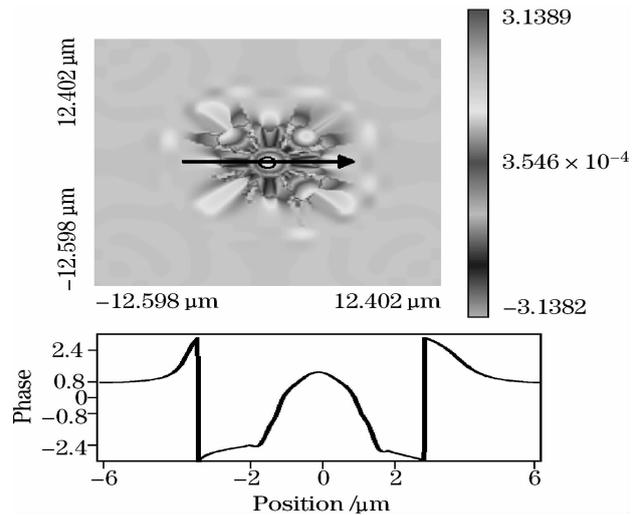


图 5 非粒白细胞相位分布

Fig. 5 Phase distribution of WBC without nucleus

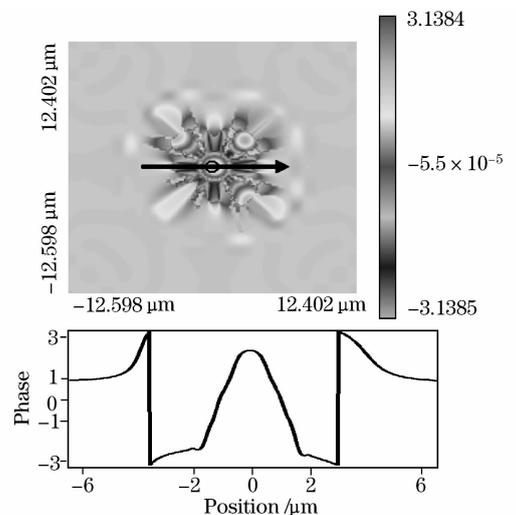


图 6 有粒白细胞相位分布

Fig. 6 Phase distribution of WBC with a nucleus

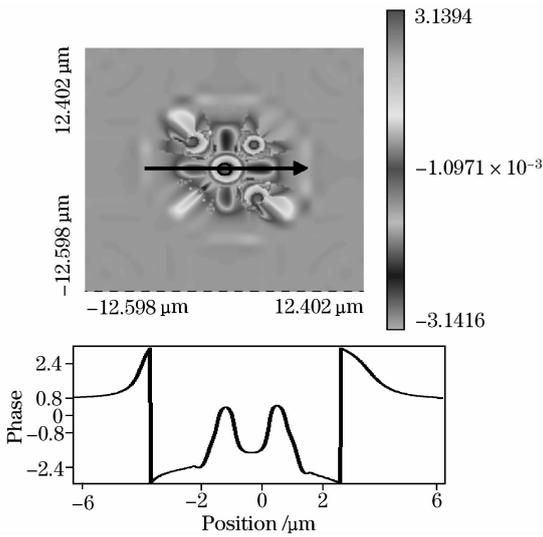


图 7 负核细胞相位分布

Fig. 7 Phase distribution of WBC without air nucleus

内,光程差与相位变化量呈正比的关系来进行说明。从图 4 的相位分布可以看出,中部相位变化量变小,从图 5 与图 6 可以看出,中部相位变化量变大。对此,可以把所有的细胞模型先看作为介质为水的球,对该球形模型有图 5 的相位分布,即非粒细胞模型下的相位分布。对于粒细胞模型,由于中部有了一

个折射率大的核,所以在中部将产生更大的光程差,也即产生更大的相位差,因此中部相位变化量增大,从图 6 可以明显看出此特征。对于红细胞模型,可以看成球的两侧被空气代替,这样光通过细胞中部的光程改变量变小,所以中部相位变化量变小,从图 4 中明显可以看出此特征。图 5 与图 6 中的色谱相位分布具有相同的分布结构,这是由于这两种细胞模型的外部形态相同所致。而图 4 的色谱相位分布与此不同,这是由于红细胞的外形与白细胞的外形不同所致。为了进一步说明结果的正确性,又做了球形中部为空核的模型(核部为空气),在此称为负核模型,图 7 为其近场相位分布图谱,从中可见,由于中部的折射率变小,所以其光程差也变小,因此中部的相位变化量必然变小,图 7 的结果正好说明了这一点。图 8 所示为这几种模型下的近场光强分布图谱,从中可见所有这些模型的近场光强分布特征均不同,这是由于其结构形态不同,光干涉的效果不同所致。但是,在远场下,夫朗和费衍射特征体现出来了,由于这些模型的外部边缘均为圆形,所以强度分布有相同的分布结构特征,图 9 所示为这几种模型下的光强分布谱。

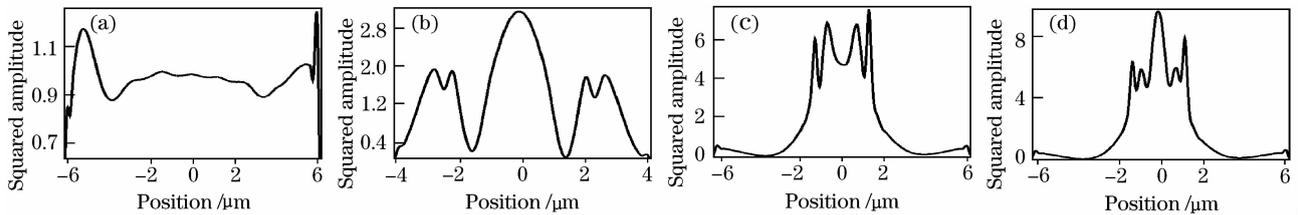


图 8 劈尖和 3 种细胞近场光强分布曲线。(a)劈尖;(b)红细胞;(c)非粒细胞;(d)粒细胞

Fig. 8 Intensity distribution of rip and cells in close field. Rip (a), RBC (b), WBC without nucleus (c) and WBC with nucleus(d)

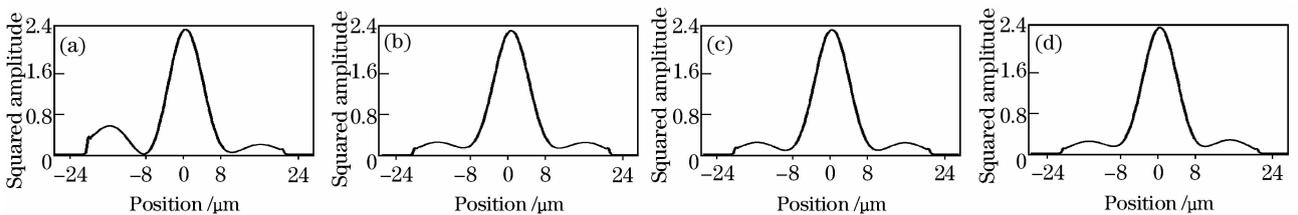


图 9 劈尖和 3 种细胞远场光强分布曲线。(a)劈尖;(b)红细胞;(c)非粒细胞;(d)粒细胞

Fig. 9 Intensity distribution of rip and cells in far field. Rip (a), RBC (b), WBC without nucleus (c) and WBC with nucleus(d)

6 结 论

细胞的相位分布与细胞的大小、形态和结构完全有关,由细胞的相位分布完全可以解析出细胞的形态结构,因此无需进行细胞的三维重建就可以直接由细胞的相位分布特征对细胞进行模式识别和分

检。随着电子相位图像接受、处理速度的不断提高和分辨率的不断提高,应用相位进行细胞分检的技术研究必将成为一种必然。而传统的应用光散射理论进行细胞模式识别和分检的技术将成为一种补充技术。关于由细胞相位分布来定量解析出细胞的形

态结构的方法有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 B. Kemper, P. Langehanenberg, G. Von Bally. Digital holographic microscopy [J]. *Optik & Photonik*, 2007, (2): 41~44
- 2 Yong Keun Park, Gabriel Popescu, Kamran Badizadgan *et al.*. Diffraction phase and fluorescence microscopy[J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(8): 8263~8268
- 3 Gabriel Popescu, Kamran Badizadgan, Ramachandra R. Dasari *et al.*. Observation of dynamic subdomains in red blood cells [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(4): 04050301
- 4 Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan *et al.*. Tomographic phase microscopy [J]. *Nature Methods*, 2007, **4**(9): 717~719
- 5 Alex Vitkin, Nirmalya Ghosh, Michael F. G. Wood. Diagnostic photo medicine probing biological tissues with polarized light [C]. *SPIE*, 2008, DOI: 10.1117/2.1200808.1238
- 6 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
- 7 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
- 8 Yuli Yu, Zhenxi Zhang, Zhang Li *et al.*. Method of calibration optical trapping force upon non-spherical cell [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(12): 722~724
- 9 Jipeng Yang, Jianyu Guo, Liangping Wu *et al.*. Raman spectroscopic identification of normal and malignant human stomach cells [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2005, **3**(12): 705~707
- 10 Yaqin Li, Guoshu Jian, Shifa Wu. Design of the sample cell in near-field surface-enhanced Raman scattering by finite difference time domain method [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(11): 671~674
- 11 Wang Yawei, Bu Ming, Cui Qingyi *et al.*. Dynamic characters of light scattering intensity distribution for a nuclear-cell [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(10): 1434~1439
王亚伟, 卜 敏, 崔青义等. 有核细胞光散射强度分布的动态特性[J]. *中国激光*, 2006, **33**(10): 1434~1439
- 12 Wang Yawei, Cai Lan, Wu Dajian. Influencing upon light scattering for variety of cell's body and cytoplasm thickness in measurement of their size distribution [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(10): 1300~1304
王亚伟, 蔡 兰, 吴大建. 细胞形体和胞质厚度变化对光散射法测量细胞大小分布影响的分析与修正[J]. *中国激光*, 2005, **32**(10): 1300~1304
- 13 Tatsunori Nakamura, Kouichi Nitta, Osamu Matoba. Iterative algorithm of phase determination in digital holography for real-time recording of real objects [J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(28): 6849~6853
- 14 Andre Ahun, Changhui Yang, Adam Wax *et al.*. Harmonic phase-dispersion microscopy with a Mach-Zehnder interferometer [J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(7): 1188~1190
- 15 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
- 16 VirtuablLab, Lighttrans, 2007, [http:// www.lighttrans.com](http://www.lighttrans.com)