

文章编号: 0258-7025(2010)11-2906-06

数字全息显微术应用于生物样品相衬成像的实验研究

赵洁 王大勇 李艳 王云新 张亦卓

(北京工业大学应用数理学院, 北京 100124)

摘要 构建了无透镜傅里叶变换数字全息实验系统, 实现了对一组生物样品特别是活体细胞的高保真度定量相衬成像。系统的简单性在于其数值再现过程只需直接对全息图进行一次快速傅里叶变换, 而对由此引入到相位像中的畸变, 则采用两步相减法予以校正。成像物体首先选用家蚊口器和洋葱表皮细胞的生物教学样片, 进而使用无标记的活体宫颈癌细胞。实验中, 不仅观察到了静态生物样品清晰的形态, 而且观察到活体细胞形态的动态变化, 充分表明了数字全息显微术应用于生物样品相衬成像的有效性。

关键词 全息; 数字全息; 相衬成像; 生物样品; 活体细胞; 相位畸变校正; 两步相减法

中图分类号 O438.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20103711.2906

Experimental Study on the Quantitative Phase-Contrast Imaging of the Biological Samples by Digital Holographic Microscopy

Zhao Jie Wang Dayong Li Yan Wang Yunxin Zhang Yizhuo

(College of Applied Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract A setup of the lensless Fourier transform digital holography is built to get the quantitative high-fidelity phase-contrast images of the biological samples. The basic advantage of such system is that the numerical reconstruction is directly applying only once fast Fourier transform to the intensity distribution of the hologram. However, the aberration appears in the phase image obtained by this kind of reconstruction algorithm and degrades the quality of the phase image seriously. Then, two-step subtraction method is applied to correct the phase aberration. In the experiments, at first two biological sample-plates for teaching are used as the objects, which are the mouse of the skeeter and the epidermal cells of the onion respectively. Then the living free-of-marker cervical carcinoma cells are presented as the object. Not only the clear morphologies of the static biological samples, but also the dynamic variations of the living cells are observed. The experimental results verify the validity of the digital holographic microscopy for the quantitative phase-contrast imaging of the biological samples.

Key words holography; digital holography; phase-contrast imaging; biological sample; living cell; phase aberration correction; two-step subtraction method

1 引言

数字全息的迅猛发展使其得到了越来越广泛的关注^[1~6], 其应用范围也实现了广泛的拓展^[7~9]。尤其是近年来生物医学的发展, 推动了在生物细胞尺度上观测技术的发展, 而数字全息显微术无损、实时、可获得定量相位分布的特点恰好成为其在生物样品成像上的优势^[10~14]。活体生物细胞一般为透

明结构, 因此其相位图像能提供更多独特的信息。不同于已有的相衬成像方法, 数字全息技术不需要对活体生物样品进行标记、固定等处理就可获得观察对象定量的振幅和相位分布, 从而实现透明生物样品的成像并进行定量分析。数字全息技术还可以实现对生物样品形态的动态监测, 继而可能用于获取细胞动态特性、细胞间的相互作用以及细胞对

收稿日期: 2010-03-22; 收到修改稿日期: 2010-04-24

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划重点项目、北京市自然科学基金重点项目(B类)(KZ200910005001)和北京市属市管高等学校人才强教计划资助课题。

作者简介: 赵洁(1982—), 女, 博士研究生, 主要从事数字显微测量方面的研究。E-mail: xingyuan@emails.bjut.edu.cn

导师简介: 王大勇(1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事光学信息处理和数字显微测量等方面的研究。

E-mail: wdyong@bjut.edu.cn(通信联系人)

药物的反应等信息,期望为早期医学诊断和药物设计等提供一定的分析评价依据^[3,10,15]。

无透镜傅里叶变换数字全息系统^[16~18]光路简单,全息图的数值再现只需在计算机中进行一次快速傅里叶变换,因此本文选用这套光路进行实验。理论分析表明,用这种再现算法获取的物体振幅信息是准确的,但其对应的相位像存在畸变。校正该相位畸变通常需要精确测量记录距离和参考光的偏置等参数,但在实验中得到的这些参数往往达不到相应的精度要求。为此,采用两步相减法^[19]来校正该相位畸变。两步相减法的原理是分别记录物体存在和不存在两种情况下的两幅全息图,获得其相位分布再进行相减,即可得到没有畸变的相位图像。本文首先选用了家蚊口器和洋葱表皮细胞的生物教学样片作为成像物体,而后使用了无标记的活体宫颈癌细胞进行实验。实验中,不仅观察到了静态生物样品清晰的形态,还观察到活体细胞的形态及其动态变化。

2 原 理

2.1 无透镜傅里叶变换数字全息图的记录和再现

无透镜傅里叶变换数字全息的记录光路如图 1 所示, (x_0, y_0) 为物体所在平面的坐标, (x, y) 为探

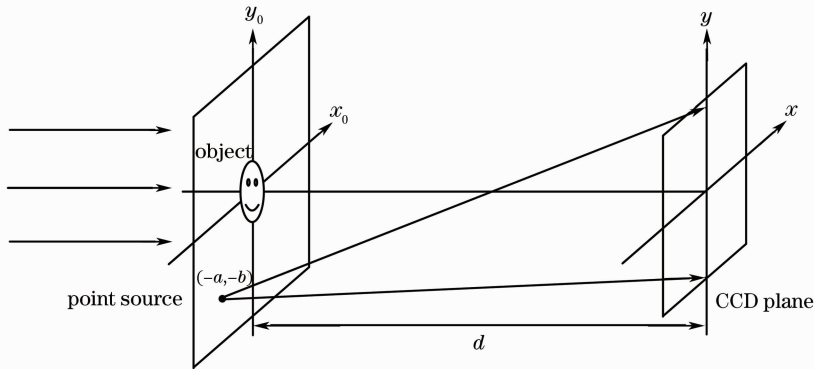


图 1 无透镜傅里叶变换全息记录光路示意图

Fig.1 Schematic of the recording configuration for the lensless Fourier transform holography

参考点源发出的球面波作为参考光,在 CCD 平面上的光场分布为

$$R(x, y) = \exp\left[j \frac{k}{2d}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[j \frac{2\pi}{\lambda d}(ax + by)\right]. \quad (5)$$

CCD 采集到的全息图是物光和参考光相干干涉所形成的光场强度分布,为

$$I(x, y) = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + O^*(x, y)R(x, y). \quad (6)$$

测器(CCD)光敏面上的坐标,这也是全息图平面。设物体的复振幅透射率为 $t(x_0, y_0)$,参考点源与物体位于同一平面上,在 x_0 方向上偏置距离为 a ,在 y_0 方向上偏置距离为 b , d 为物平面到 CCD 平面的距离,即为记录距离。

使用单位振幅平面光波垂直照明物体,在傍轴近似下,根据菲涅耳衍射积分公式,可得 CCD 平面上物光场分布为

$$O(x, y) = \exp\left[j \frac{k}{2d}(x^2 + y^2)\right] \times \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} t(x_0, y_0) \exp\left[j \frac{k}{2d}(x_0^2 + y_0^2)\right] \times \exp\left[-j \frac{2\pi}{\lambda d}(xx_0 + yy_0)\right] dx_0 dy_0, \quad (1)$$

若设

$$t'(x_0, y_0) = t(x_0, y_0) \exp\left[j \frac{k}{2d}(x_0^2 + y_0^2)\right], \quad (2)$$

和

$$T'\left(\frac{x}{\lambda d}, \frac{y}{\lambda d}\right) = \mathcal{F}[t'(x_0, y_0)], \quad (3)$$

式中 \mathcal{F} 表示傅里叶变换运算,则(1)式可以简化为

$$O(x, y) = \exp\left[j \frac{k}{2d}(x^2 + y^2)\right] T'\left(\frac{x}{\lambda d}, \frac{y}{\lambda d}\right). \quad (4)$$

继而,把全息图在计算机中进行数字后处理,即实现全息图的数值再现。根据(6)式,全息图再现结果将包含三部分,第一部分是前两项形成的零级像,位于坐标原点,第二和第三部分是由(6)式的第三和第四项形成的原始像和共轭像,相对坐标原点对称偏置。合理安排实验条件,可使这三项相互分离。

为简化,仅分析感兴趣的产生原始像的项,对应(6)式的第三项。由(4),(5)式得

$$O(x, y)R^*(x, y) = T'\left(\frac{x}{\lambda d}, \frac{y}{\lambda d}\right) \exp\left[-j\frac{2\pi}{\lambda d}(ax + by)\right], \quad (7)$$

可见,全息图记录到的是如(2),(3)式所示的物体与一个二次相位因子乘积的频谱再乘上一次线性相位

$$U_1(x', y') = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} T'\left(\frac{x}{\lambda d}, \frac{y}{\lambda d}\right) \exp\left[-j\frac{2\pi}{\lambda d}(ax + by)\right] \exp\left[-j\frac{2\pi}{\lambda d}(x'x + y'y)\right] dx dy = (\lambda d)^2 t'(-x', -y') \times \delta(-x' - a, -y' - b). \quad (8)$$

对原坐标系进行 180° 反转,得到新的坐标为 (x'', y'') , 并把(2)式代入,则

$$U_1(x'', y'') = (\lambda d)^2 t(x'' - a, y'' - b) \exp\left\{j\frac{k}{2d}[(x'' - a)^2 + (y'' - b)^2]\right\}. \quad (9)$$

分析(9)式的再现结果可知,如果直接对无透镜傅里叶变换数字全息图进行一次傅里叶变换,则其振幅再现结果是中心在 (a, b) 的准确原物体分布,但其相位分布是不正确的,出现了二次相位畸变,对于高精度相衬成像,需要对该畸变予以校正。

2.2 两步相减法校正相位畸变

保持所有的实验条件不变,只去除掉物体,再记录一幅全息图进行再现, $U'_1(x'', y'')$ 表示此时再现得到的原始像的复振幅,则

$$U'_1(x'', y'') = (\lambda d)^2 \exp\left\{j\frac{k}{2d}[(x'' - a)^2 + (y'' - b)^2]\right\}, \quad (10)$$

可见,其振幅再现结果应为均匀的,但其相位分布与(9)式中造成物体相位畸变的一样,因此分别得到 $U_1(x'', y'')$ 和 $U'_1(x'', y'')$ 相位后再进行相减,即可得到没有畸变的物体的相位图像。如果物体的轴向光学厚度超过一个波长,则此时得到的是包裹着的相位图像,进一步可选用最小二乘法进行相位解包裹,最终得到解包裹的物体的相位图像。

3 实验结果

搭建了一套无透镜傅里叶变换数字全息实验装置,其光路结构如图 2 所示。激光器为相干公司 Verdi-5 激光器,最大输出功率为 5 W,波长为 532 nm,该激光器发出的光经偏振分束镜(PBS)分成两束,每束光均经过扩束滤波系统(BE)分别作为物光和参考光,两个半波片($\lambda/2$)与偏振分束镜配合使用,可实现物光和参考光光强比的调节,还可保证两路光偏振态一致。物体前面的光阑用来限制照射到物体上的光斑尺寸。参考光通过一个 25 倍

因子,其中的一次线性相位因子只会引起再现像的平移。因此,无透镜傅里叶变换数字全息的再现过程只需直接对全息图做一次傅里叶变换,若赋予其尺度因子 $f_x = x/(\lambda d)$, $f_y = y/(\lambda d)$,则再现的复振幅分布为

显微物镜(MO)产生点光源,和透过物体的物光,被消偏振合束棱镜(BS)合束,其干涉图样被 CCD 记录,从而完成数字全息图的记录过程。所使用的 Dalsa 公司的 CCD 分辨率为 $4016 \text{ pixel} \times 2672 \text{ pixel}$,每个像素大小为 $9 \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$ 。无透镜傅里叶变换全息要求点光源和物体到 CCD 的距离相同,该距离即为记录距离。NF 为连续衰减片,可用于进一步调节物光和参考光的光强比。

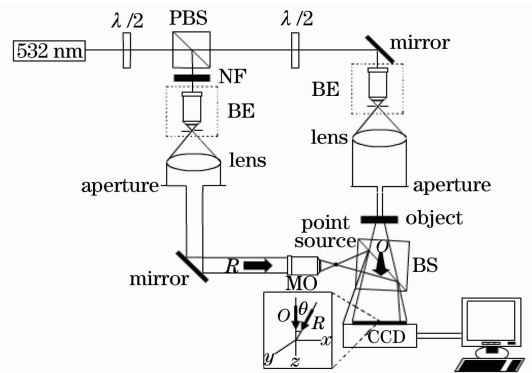


图 2 无透镜傅里叶变换数字全息实验光路示意图
Fig. 2 Schematic of experimental configuration for lensless Fourier transform digital holography

3.1 生物样品教学样片成像

首先选用家蚊口器的生物教学样片作为成像物体,记录距离为 12.1 cm, CCD 记录得到全息图,全息图经裁剪成正方形,大小为 $2672 \text{ pixel} \times 2672 \text{ pixel}$,如图 3(a)所示。然后,在计算机中进行数值再现,全息图直接经一次快速傅里叶变换得到的全视场振幅再现像如图 3(b)所示。再现像的像素大小与全息图像素大小之间存在约束关系 $\Delta x' = \lambda d/(M\Delta x)$, $\Delta y' = \lambda d/(N\Delta y)$ (Δx 和 Δy 为 CCD 的像素大小, M 和 N 为全息图总的像素数),由此可得

再现像的像素大小为 $2.67 \mu\text{m}$ 。这里需要指出,由于家蚊口器的生物样片是被标记、固定的,不是完全透明的,因此振幅像中也可得到物体的像。截取出右上角的原始像如图 3(c),其对应的包裹相位分布如图 3(d),可清楚地看到偏置了的环状条纹,对应(9)式中的二次相位因子。继而在实验光路中去掉物体,得到相应的全息图、全视场振幅再现像、原始

像和对应的包裹相位图像如图 3(e)~(h)所示。根据两步相减去畸变法,用图 3(d)的相位减去图 3(h)的相位得到包裹的相位图像如图 3(i)所示,再使用最小二乘法解包裹,并最终得到解包裹的相位图像如图 3(j)所示。可见,得到了基本没有畸变的高质量相位图像,且分辨率高,可看清家蚊口器的细节,其最精细的结构为 $24 \mu\text{m}$ 左右。

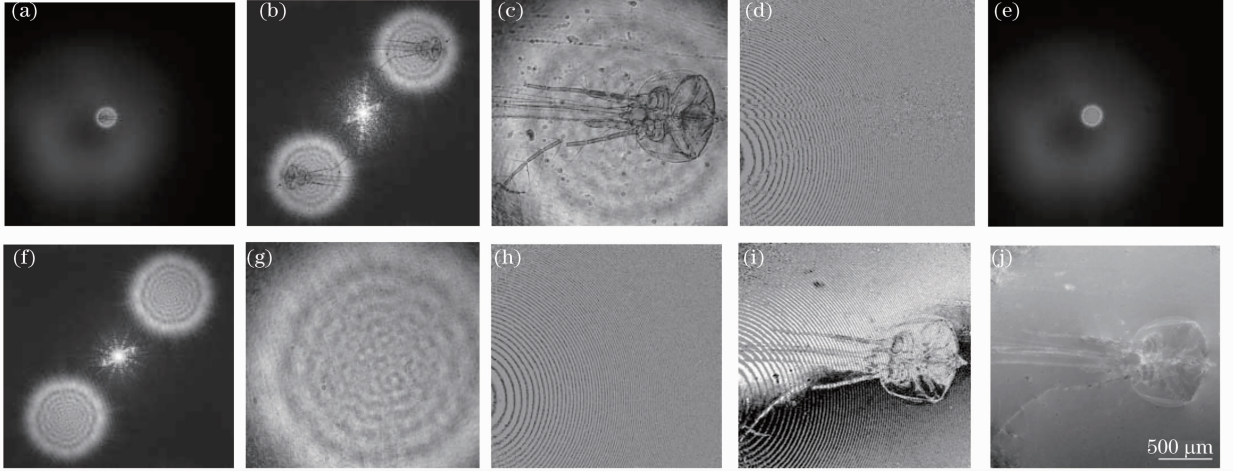


图 3 家蚊口器教学样片的实验结果。(a)~(d)物体存在时的全息图、全视场振幅再现像、原始像、包裹相位图像,(e)~(h)物体不存在时的全息图、全视场振幅再现像、原始像、包裹相位图像,(i)两步相减法去畸变后包裹的相位图像,(j)解包裹的没有畸变的相位图像

Fig. 3 Experimental results of the mouse of the skeeter sample-plate. (a)~(d) with the existence of the object, the hologram, the reconstructed amplitude image of the whole field, the real image and the wrapped phase image, (e)~(h) with the absence of the object, the hologram, the reconstructed amplitude image of the whole field, the real image and the wrapped phase image, (i) the wrapped phase image after using the two-step subtraction method, (j) the unwrapped free-of-aberration phase image

改换洋葱表皮细胞的生物教学样片作为成像物体,同样运用上述的方法进行实验和数值再现,得到了很好的再现结果,如图 4 所示,洋葱表皮细胞的细胞壁和细胞核清晰可见。

3.2 活体宫颈癌细胞成像

实验中所用的宫颈癌细胞是在培养皿中培养的,由于细胞贴壁生长的特点,因此大部分细胞都伏贴于培养皿中的盖玻片上,待细胞长成单层,即可用来观察。实验中不仅观察到静态活体细胞清晰的贴壁状态,而且观察到活体细胞形态在消化过程中从贴壁到脱落的变化。

3.2.1 静态活体细胞形态观察

把伏贴有细胞的盖玻片从培养皿中取出,盖于载玻片上制成样片,如图 5 所示。然后把这个样片置于光路中即可观察细胞的形态。随着细胞离开培

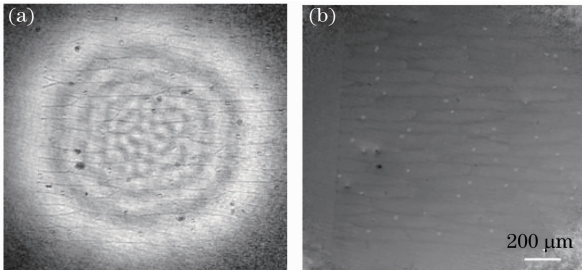


图 4 洋葱表皮细胞生物教学样片的实验结果。(a)振幅再现像,(b)解包裹的没有畸变的相位图像

Fig. 4 Experimental results of the epidermal cells of the onion sample-plate. (a) the reconstructed amplitude image, (b) the reconstructed free-of-aberration phase image



图 5 观察静态活体细胞时样片制作示意图
Fig. 5 Schematic of the fabrication for the sample-plate of the static living cells

养液时间的延长,细胞就慢慢濒临死亡,可以观察到细胞边缘渐渐模糊的过程,但该过程持续时间长、变化小,不易观察。

实验中记录距离约为 8.9 cm,再现像的像素大小约为 $1.97 \mu\text{m}$,观察到的静态细胞的相位分布如图 6(a)所示,其贴壁状态清晰可见。为了对比,还

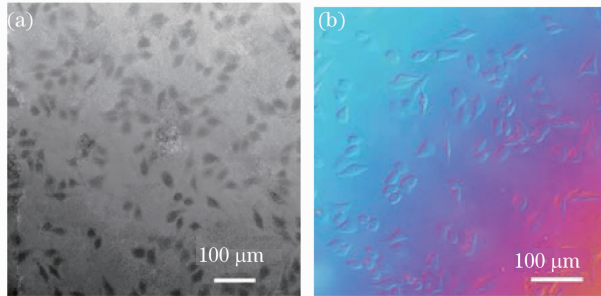


图 6 静态活体宫颈癌细胞形态对比。(a)数字全息显微术得到的细胞形态,(b)常规相衬显微镜观察到的细胞形态

Fig. 6 Comparison for the morphologies of the static living cervical carcinoma cells. (a) phase distribution obtained by the digital holographic microscopy, (b) morphologies of the cells obtained by the traditional phase-contrast microscope

给出了常规相衬显微镜下观察到的细胞形态,显微镜的放大倍率为 100,如图 6(b)所示,可见其形态和图 6(a)是类似的,但数字全息显微术能够提供定量的相位信息和进行可靠的结构分析,这也是数字全息显微术的优势所在。需要说明的是,这两幅图对样片所成像的区域不同。

3.2.2 活体细胞形态变化观察

首先把培养液从培养皿中吸出,接着用 PBS 洗液清洗培养皿两遍,这样做的主要目的是洗掉细胞上残留的血清。然后,把盖玻片取出,盖到载玻片上,此时盖玻片和载玻片之间留有约 1 mm 厚的空间,如图 7 所示,最后在该小空间加入胰酶,便可观察快速的细胞形态变化,即细胞由贴壁状态到慢慢脱落变成圆形的过程。实验结果如图 8 所示,这里分别显示了 0, 2, 7, 16, 60 min 时细胞的相位分布,可观察到细胞形态的动态变化过程,例如方框中的两个细胞,随着时间的推移,可以看到它们逐渐变圆并最终分离的过程。



图 7 观察细胞形态变化时样片制作示意图

Fig. 7 Schematic of the fabrication for sample-plate to observe the morphology variations of the cells

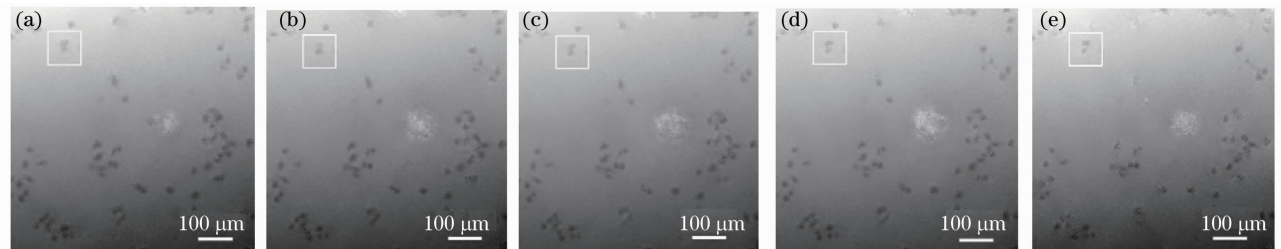


图 8 活体宫颈癌细胞形态随时间的变化。(a) 0, (b) 2 min, (c) 7 min, (d) 16 min, (e) 60 min

Fig. 8 Dynamic morphology variations of the living cervical carcinoma cells. (a) 0, (b) 2 min, (c) 7 min, (d) 16 min, (e) 60 min

4 结 论

构建了用于生物样品测量的无透镜傅里叶变换数字全息系统,通过直接对全息图进行一次傅里叶变换的数值再现方法结合两步相减法校正相位畸变,实现了对一组生物样品高保真度的定量相衬显微成像。所使用的生物样品包括家蚊口器和洋葱表皮细胞的生物教学样片,以及活体宫颈癌细胞,特别是观察到该活体细胞形态的动态变化。研究结果充分表明数字全息方法在对透明的生物样品相衬成像方面的适用性和优越性。同时,对活体细胞形态的

动态观测为生物医学提供了一种可能的观测手段,期望为早期医学诊断和药物设计等提供一定的分析评价依据,这将具有一定的意义和应用前景。在下一步工作中,将引入预放大,进一步提高再现相位图像的空间分辨率,测量活体细胞内部结构和相关生理参数等。

致谢 感谢北京工业大学生命科学与生物工程学院杨怡妹老师和肖向茜老师提供的活体宫颈癌细胞,更感谢她们在生物样品制备和特性等相关知识方面给予的指导。

参 考 文 献

- 1 E. Cuhe, P. Marquet, C. Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms[J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(34): 6994~7001
- 2 I. Yamaguchi. Phase-shifting digital holography with applications to microscopy and interferometry [C]. *SPIE*, 1999, **3749**: 434~435
- 3 D. Carl, B. Kemper, G. Wernicke *et al.*. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis[J]. *Appl. Opt.*, 2004, **43**(36): 6536~6544
- 4 Dayong Wang, Jie Zhao, Fucui Zhang *et al.*. High-fidelity numerical realization of multiple-step Fresnel propagation for the reconstruction of digital holograms [J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(19): D12~D20
- 5 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
- 6 Wang Huaying, Wang Guangjun, Zhao Jie *et al.*. Imaging resolution analysis of digital holographic microscopy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(12): 1670~1675
王华英, 王广俊, 赵洁等. 数字全息显微系统的成像分辨率分析[J]. *中国激光*, 2007, **34**(12): 1670~1675
- 7 Md. Mosarraf Hossain, Chandra Shakher. Temperature measurement in laminar free convective flow using digital holography[J]. *Appl. Opt.*, 2009, **48**(10): 1869~1877
- 8 M. Frederic, E. Yves, S. Eduardo *et al.*. Surface roughness parameters measurements by digital holographic microscopy[C]. *SPIE*, 2006, **6280**: 62800V
- 9 Vijay Raj Singh, Jianmin Miao, Zhihong Wang *et al.*. Dynamic characterization of MEMS diaphragm using time averaged in-line digital holography[J]. *Opt. Commun.*, 2007, **280**(2): 285~290
- 10 B. Kemper, Gert von Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection[J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(4): A52~A61
- 11 T. Colomb, E. Cuhe, F. Charrière *et al.*. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation [J]. *Appl. Opt.*, 2006, **45**(5): 851~863
- 12 B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe *et al.*. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(23): 9361~9373
- 13 Dong Keping, Qian Xiaofan, Zhang Lei *et al.*. Digital holographic microscopy study for cells [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(11): 2013~2016
董可平, 钱晓凡, 张磊等. 数字全息显微术对细胞的研究[J]. *光子学报*, 2007, **36**(11): 2013~2016
- 14 Qian Xiaofan, Dong Keping, Zhang Lei *et al.*. Study on cells by use of digital holographic microscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(7): 1318~1321
钱晓凡, 董可平, 张磊等. 反射式数字全息显微术对细胞的研究[J]. *光子学报*, 2007, **36**(7): 1318~1321
- 15 B. Kemper, D. D. Carl, J. Schneckeburger *et al.*. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(3): 034005
- 16 D. Dirksen, H. Droste, B. Kemper *et al.*. Lensless Fourier holography for digital holographic interferometry on biological samples[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2001, **36**(3): 241~249
- 17 Jie Zhao, Dayong Wang, Huaying Wang *et al.*. High-resolution lensless Fourier transform holography for microstructure imaging [C]. *SPIE*, 2007, **6723**(1): 67230N
- 18 Lü Xiaoxu, Zhang Yimo, Zhong Liyun *et al.*. Analysis and experiment of phase-shifting coaxial lensless Fourier digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(11): 1511~1515
吕晓旭, 张以谟, 钟丽云等. 相移同轴无透镜傅里叶数字全息的分析与实验[J]. *光学学报*, 2004, **24**(11): 1511~1515
- 19 P. Ferraro, S. D. Nicola, A. Finizio *et al.*. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging [J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(11): 1938~1946