

白细胞光学模型及其相位分布特征分析

徐媛媛¹ 王亚伟¹ 金卫凤² 姜守望² 岳去畏¹ 卜 敏¹ 尚学府¹ 吕翠红¹

(¹江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013)
(²江苏大学机械学院, 江苏 镇江 212013)

摘要 5类白细胞的识别与分析在临床医学和生命科学研究中有着极其重要的应用意义。近年来数字相位显微技术在红细胞的显微观察方面得到了突破性的发展。而白细胞由于其光学相位体结构的特殊性,相位显微方法的应用存在着一定困难。分析了5类白细胞的光学特征,建立了光学模型,并应用虚拟仿真技术研究了其相位分布特征,通过相位分布特征与白细胞类别关系的分析,发现白细胞在相位成像过程中,相位分布特征不仅仅由干涉而成,而且与细胞核的散射相关,但是存在着一定的可确定性。

关键词 显微;白细胞;识别;光学模型;相位分布特征

中图分类号 O436; R331.1⁺42 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.0504001

Study on Phase Characteristics of White Blood Cells and Their Optical Models

Xu Yuanyuan¹ Wang Yawei¹ Jin Weifeng² Jiang Shouwang²
Yue Quwei¹ Bu Min¹ Shang Xuefu¹ Lü Cuihong¹

(¹School of Science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)
(²School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract Identification and analysis of five different types of white blood cells (WBCs) have a very important application in many fields, such as clinical medicine and life science. In recent years, the digital phase microscopy techniques of red blood cells are remarkably expanded in their observing application. However, due to special optical phase structures of WBCs, the techniques of phase microscopy have difficulty in studying them. Based on this, the analysis of optical characteristics of five types of WBCs is done, and optical models of them are built in this paper. Distribution characteristics of WBCs under these phase models are obtained with numerical simulation techniques. It is found that phase distribution of WBCs is not only related to interference, but also to the scattering of nucleus by analyzing the relationship between phase distributions and classifications of them, but it has certainty to some extent.

Key words microscopy; white blood cell; identification; optical model; distribution characteristics of phase

OCIS codes 170.0180; 170.1530; 120.5050; 330.7326; 100.1160; 100.2960

1 引 言

血液细胞分析检测是医学中检测和诊断疾病的重要手段,而对血液中白细胞进行检测分类又是血液细胞检测中的一个重要方面。目前光学检测技术

主要分为流式散射和显微成像两大类。流式技术主要依据光的米氏(Mie)散射理论,按照细胞光学散射检测理论:不同的细胞具有不同的生化结构,内含体积不同大小的物质,具有不同大小的折射率,所以

收稿日期: 2011-11-10; **收到修改稿日期**: 2012-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(21146004)、江苏省高校自然科学重大项目(09KJA14001)、高等学校博士学科点科研基金(20113227110018)、江苏省博士后基金(1101113C)、PAPD江苏高校优势学科建设工程和江苏省2011年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX_0564)资助课题。

作者简介: 徐媛媛(1987—),女,硕士研究生,主要从事光信息处理方面的研究。E-mail: yuanyuanxulark@126.com

导师简介: 王亚伟(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事激光应用技术与光学检测等方面的研究。

E-mail: jszjwyw@yahoo.com.cn(通信联系人)

可以应用到光散射强度分布区分不同种类的细胞^[1]。显微成像主要依据光学成像理论的应用,其中主要应用了几何成像、幅值成像、相位成像、干涉成像等理论。近 10 年来,基于光全息理论数字全息显微(DHC)^[2]迅速发展,该方法具有精度高、速度快、可全场等优点,应用在如:希尔伯特相位显微(HPM)^[3]、傅里叶变换光散射(FTLS)^[4]、傅里叶相位显微(FPM)^[5]、衍射相位显微(DPM)^[6]、衍射相位和荧光显微(DPF)^[7]、空间光干涉显微(SLIM)^[8~10]技术等方面。此外,国内也有其他学者进行了相位检测和细胞模式识别的研究^[11~14]。从相位显微技术的应用成果可以看出相位信息的分析和解构趋于完善,但是仅仅适宜于红细胞的观察。对于白细胞,由于其相位体结构的复杂性,特别是胞核形态和结构的异性,尚未有较好的应用相位显微方法和理论。对此,本文对白细胞的光学结构进行了分析,建立了相应的模型,其中特别是双核模型,并应用数值仿真实验技术进行仿真实验,得到了各模型下的相位分布。通过对结果的分析得到了一些重要的结论。

2 5 类白细胞的光学模型

2.1 白细胞的结构形态特征分析

白细胞是人体血液中的重要成分,种类繁多且形态复杂。其数量和形态是临床诊断和免疫研究最为重要的指标,其中核像变化最为敏感。成熟的白细胞包括淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞 5 大类,如图 1 所示。其中中性粒细胞占白细胞总数最多,有时可达到 50%~70%,其次为淋巴细胞,其他 3 种细胞加起来不超过 10%。白细胞的外形一般为球形,直径为 10~

15 μm ,但其核的形态多样,一般胞核分叶为 2~5 叶。球形是细胞胞体和核的基本形态,所以传统模型是用球来表示白细胞。考虑到白细胞亚类结构,球形形态不是最为逼近真实细胞的形态。因此,必须建立逼近真实白细胞的新模型。

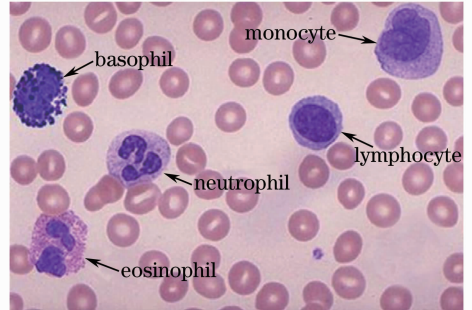


图 1 白细胞 5 类结构形态显微图

Fig. 1 Morphological structure of five different types of white blood cells

2.2 VirtualLabTM 4.0 平台下的几种白细胞光学模型

考虑到 VirtualLabTM 4.0 没有专门的细胞模型,结合到白细胞 5 类的典型结构形态,本文通过对系统中各个模块和参数的优化设计,建立了如图 2 所示的几种模型来开展研究。图 2 中的无核细胞模型可表示一般情况下的白细胞,但是比较粗糙。单柱核细胞模型和单球核细胞模型可逼近表示不同形态的淋巴细胞和单核细胞。横向双柱核细胞模型和纵向双柱核细胞模型可逼近表示不同结构形态的中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。无外胞双柱核模型是为了专门研究核散射对胞相位成像的影响而设计的模型。各模型的具体参数由下节各仿真实验述说。因为球核模型其他学者已有研究,本文不多作探讨。嗜碱性粒细胞可用多球核模型表示,该多球核模型将在他文中研究。

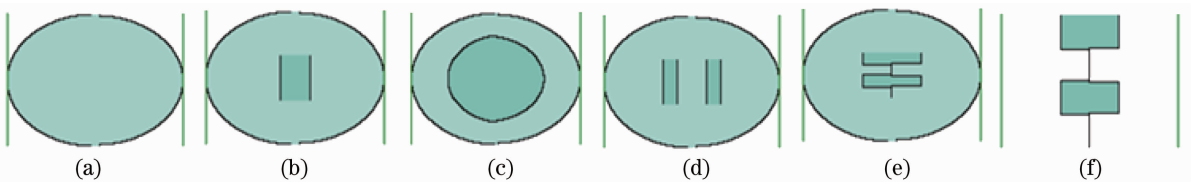


图 2 VirtualLab 系统下几种典型的白细胞模型。(a)无核;(b)单柱核;(c)单球核;(d)横向双核;(e)纵向双核;(f)无外胞双核

Fig. 2 Typical optical models of white blood cells in the system of VirtualLab. (a) Without nucleus; (b) a cylindrical nucleus; (c) a spherical nucleus; (d) dual transverse cylindrical nuclei; (e) dual longitudinal cylindrical nuclei; (f) dual longitudinal cylindrical nuclei without cytoplasm

3 几种模型下的相位仿真实验

参考数字相位显微技术和真实细胞的基本参

数,应用 VirtualLabTM 4.0 光学虚拟仿真平台对各种细胞模型进行仿真,研究其在相干光源传播下的

相位分布。在虚拟仿真实验中,各主要参数设置如下:1)光源类型为平面波;入射场形状是直径为 $20\ \mu\text{m}$ 的圆形;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;2)入射波传播算子为SPW/Fresnel结合算子;输入场采样精度因子为1;转换算子为复振幅场对局部平面波场;出射场传播算子为SPW/Fresnel结合算子;输出场采样精度因子为1;数据完善模式为最邻近原则插值;球形相位半径实测。

3.1 无核球细胞模型

无核球细胞模型的表面由两个对称非球曲面组成,呈直径为 $12\ \mu\text{m}$ 的球体,介质的折射率为1.3408;吸收系数为 $0.1\ \text{m}^{-1}$,虚拟仿真实验相位分布结果见图3(a)、(b)。为验证仿真实验方法的正确性,选用聚苯乙烯标准球做样品,应用马赫-曾德尔光干涉技术,得到其相位分布如图3(c)所示,比较图3(a)~(c),可以发现其相位分布条纹具有相同的形态。此外,Rappaz等^[15]实验研究了类球形态的神经元细胞,得到的相位分布条纹也具有相同的形态,从而说明本文研究方法的可靠性。

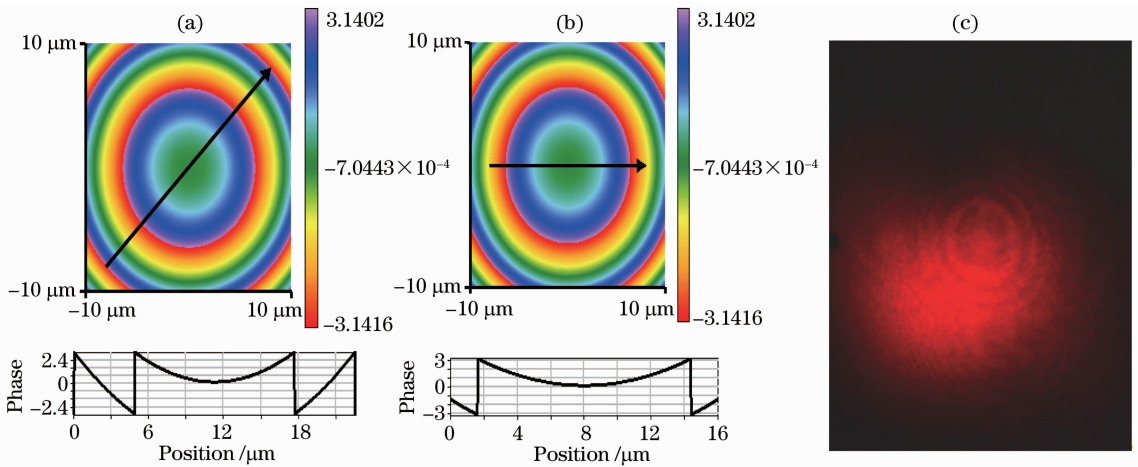


图3 相位分布。(a)仿真实验相位纵向分布;(b)横向分布;(c)聚苯乙烯标准球相位实验图

Fig. 3 Phase distribution. (a) Virtual simulative longitudinal result; (b) virtual simulative lateral results; (c) experimental result of polystyrene

3.2 单柱核球细胞模型

单柱核球细胞模型由两个对称的非球曲面,内包含两个平面介面构成。设定两平面介面的间距为 $2\ \mu\text{m}$,并设置其他相关参数,使得组合后形态为一直

径 $12\ \mu\text{m}$ 的球体,并且球体中心呈现出 $4\ \mu\text{m}$ (宽) $\times 4\ \mu\text{m}$ (高) $\times 2\ \mu\text{m}$ (长)的一柱核。另外,其中球(除核)的折射率为1.3408,吸收系数为 $0.1\ \text{m}^{-1}$;核的折射率为1.5917,吸收系数为 $0.1\ \text{m}^{-1}$,虚拟仿真实验相

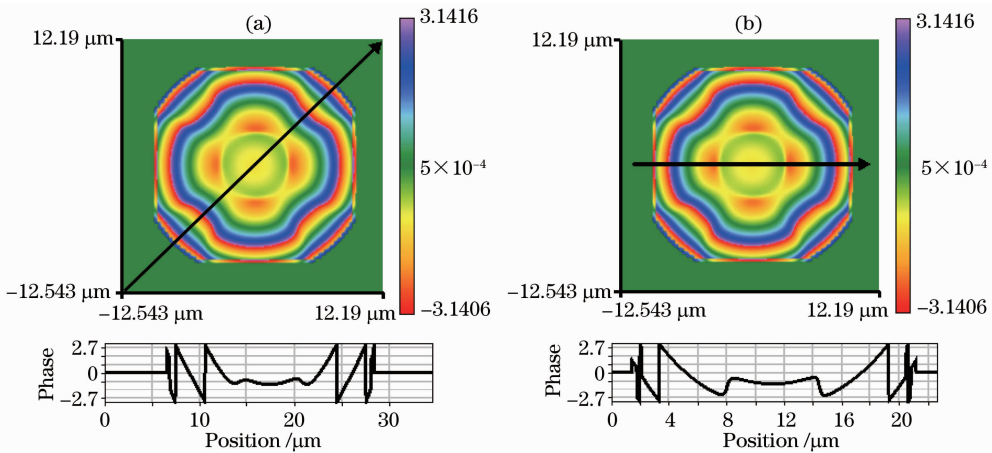


图4 单柱核球细胞模型的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 4 Phase distribution of white blood cell with a cylindrical nucleus. (a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

位分布结果见图 4(a)、(b)。

3.3 单球核球细胞模型

单球核球细胞模型由两个对称的非球曲面,内包含两个对称非球曲面构成,组成后形态呈现出中

心有一个球核的球体。其中球核直径为 $8 \mu\text{m}$,介质折射率为 1.5917 ,吸收系数为 0.1 m^{-1} ;球体直径为 $12 \mu\text{m}$,介质折射率为 1.3408 ,吸收系数为 0.1 m^{-1} 。虚拟仿真实验相位分布结果见图 5(a)、(b)。

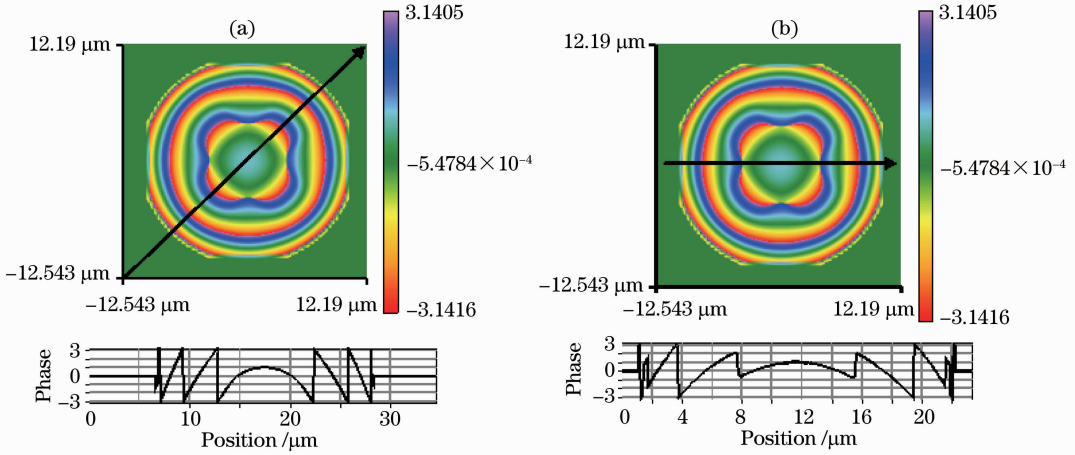


图 5 单球核球细胞模型的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 5 Phase distribution of white blood cell with a spherical nucleus. (a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

3.4 横向双柱核球细胞模型

横向双柱核球细胞模型是由两个对称的非球曲面组成一球体,并且其内包含由两组分别对称的平面界面构成的一双柱核。其中 1) 球体直径为 $12 \mu\text{m}$;球体内(除核)的折射率为 1.3408 ;吸收系数为 0.1 m^{-1} ;2) 孔径为矩形;直径为 $4 \mu\text{m}$ 两对称平

面界面的间距为 $1 \mu\text{m}$;双柱核的折射率为 1.5917 ,吸收系数为 0.1 m^{-1} ,经平面界面组合和设置不同的折射率,呈现出两内核均为 $4 \mu\text{m}$ (宽) $\times 4 \mu\text{m}$ (高) $\times 1 \mu\text{m}$ (长)的长方体柱核。虚拟仿真实验相位分布结果如图 6(a)、(b)所示。

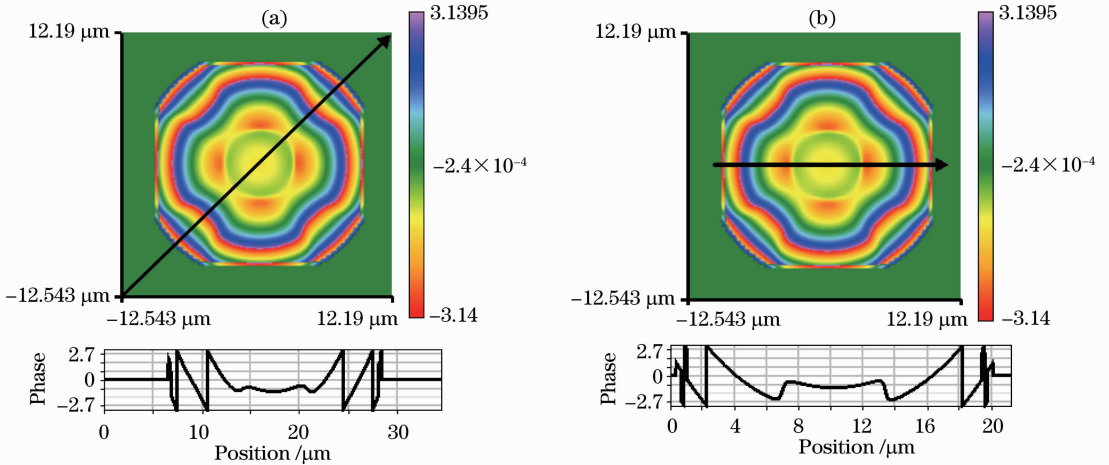


图 6 横向双柱核球细胞模型的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 6 Phase distribution of white blood cell with dual transverse cylindrical nuclei. (a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

3.5 纵向双柱核球细胞模型

纵向双柱核球细胞模型是由两个对称的非球曲面组成一球体,并且其内包含由两个对称的矩形光栅界面构成的一双柱核。其中 1) 球体直径为 $12 \mu\text{m}$;球体内(除核)的折射率为 1.3408 ;吸收系数

为 0.1 m^{-1} ;2) 左侧光栅狭缝宽度为 $1 \mu\text{m}$;光栅周期为 $2 \mu\text{m}$;调制深度为 $2 \mu\text{m}$;侧向位移为 0 ;旋转角为 0° ;孔径为矩形;直径为 $4 \mu\text{m}$;2) 右侧光栅狭缝宽度为 $1 \mu\text{m}$;光栅周期为 $2 \mu\text{m}$;调制深度为 $2 \mu\text{m}$;侧向位移为 0 ;旋转角为 180° ;孔径为矩形;半径为

4 μm ;双柱核的折射率为 1.5917,吸收系数为 0.1 m^{-1} ,经矩形光栅组合和设置不同的折射率,呈现出两内核均为 4 μm (宽) \times 1 μm (高) \times 4 μm (长)

的长方体柱核。在虚拟仿真实验中,为方便比较,选择与横向双柱核球模型相同的参数,虚拟实验相位分布结果如图 7(a)、(b)所示。

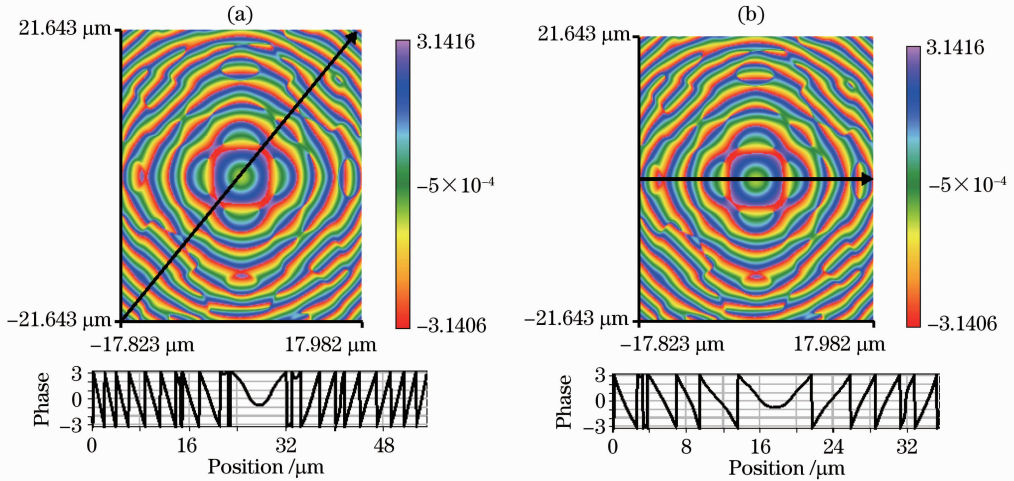


图 7 纵向双柱核球细胞模型的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 7 Phase distribution of white blood cell with dual longitudinal cylindrical nuclei. (a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

比较图 3~7 可以发现:细胞核从无核到一核,再到双核,相位图发生了较大的变化,可见核对细胞的相位成像极为敏感。根据光干涉理论,在此情况下,光强分布有^[11]

$$I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = |O|^2 + |R|^2 + 2|O||R|\cos(\phi_o - \phi_R), \quad (1)$$

式中 $O(x, y)$ 、 $R(x, y)$ 分别为物光和参考光, ϕ_o 、 ϕ_R 分别为物光和参考光的相位。其相位差 $\delta = \phi_o - \phi_R$, 即表示为^[11]

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} [(n_m - 1)h_o + (\bar{n}_c - n_m)h], \quad (2)$$

式中 λ 为波长, n_m 为胞质折射率, \bar{n}_c 为胞核折射率, h_o 、 h 分别为胞质和胞核的厚度[与空间位置 (x, y, z) 相关], z 为光传输方向坐标, x, y 为与 z 垂直成像面的二维坐标,可见相位条纹分布与胞质、胞核折射率及厚度相关。图 4 与图 6 比较表明,虽然是单核和双核(内部结构分布不同),但是(2)式中的各个物理参量相同,特别是在 z 方向的光程差相同,因此其相位分布条纹形态基本相同,所以分辨不了单核和双核;图 6 与图 7 比较表明,同样大小和形态的双核,由于核在胞内的位置不同,(2)式中胞核厚度 h 因为位置 (x, y, z) 不同,所以其产生的光程差分布不同,因此相位分布条纹不一样。

为了单独研究细胞内核对相位成像的影响,对上述双柱核球细胞模型进行去胞处理,得到无外胞纵向双柱核模型。选择同纵向双柱核球细胞模型一

样的物理参数和系统参数,经虚拟仿真可得到其相位图,如图 8(a)、(b)所示。将图 8(a)、(b)与无核球模型下的图 3(a)、(b)对位线性叠加,可得到如图 9(a)、(b)所示的相位分布图。比较图 9 与纵向双柱核模型下的相位分布图 7,显然发现两相位图存在着一定的差别。这是由于在有核的情况下,相位图的产生不仅仅是基于单纯的光干涉,而核的散射光也是相干光,在许多相位显微方法中,正是应用散射光与透射光干涉的,一般情况下由于散射光强度远小于透射光强度,所以散射光与透射光干涉的效果基本不可见,除非用特别的技术^[2,6]。而对于有核细胞,本课题组^[16]的研究表明:胞核与胞质的偏振化方向在散射面内的散射光是相干光,由于胞核与胞质空间相位差不同,会产生调制现象;这种调制光强与胞核大小及位置密切相关;其调制光强在前向大大增强,远大于无核细胞的散射光强,所以在这种情况下,散射光足以与透射光发生可见的干涉现象,这种干涉会大大影响原来的透射干涉结果,因此图 9 与图 7 的条纹分布必定不同。虽然这种现象的发生机理和理论分析十分复杂,目前国内外尚未见这方面的研究成果报道,但是本课题组^[16]的研究结果阐明了胞核将产生光强调制,特别是高频和次高频的调制现象在胞核增加的情况下会加强,从纵向双柱核模型的仿真实验结果图 7 可以明显看出这种调制在相位条纹图中出现,相位条纹的变化明显多于仅仅由于透射干涉产生的相位条纹变化。因

此,引入调制强度的物理参数可在相位识别作用不明显的情况下发挥作用,从而增加白细胞亚类识别

的确定性。

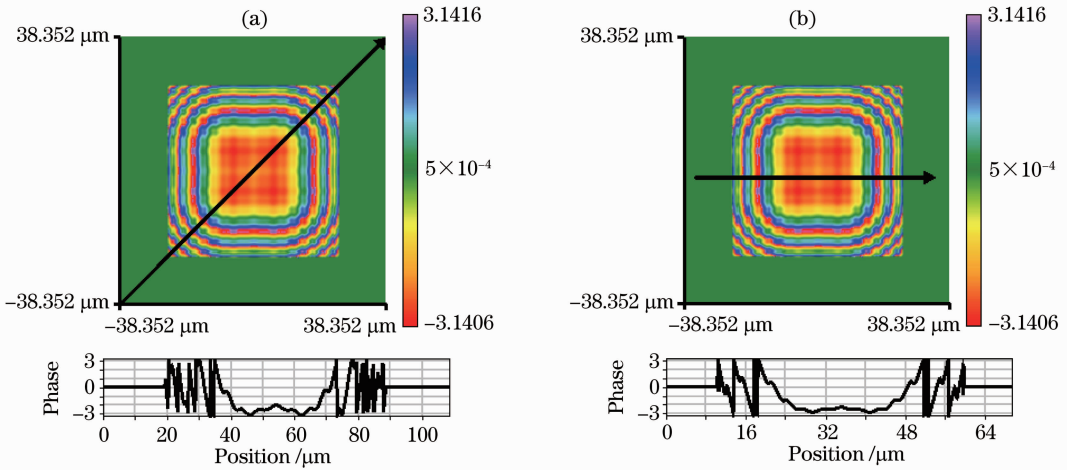


图 8 无外胞双核模型的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 8 Phase distribution of dual logarithmic cylindrical nuclei of white blood cell without cytoplasm.

(a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

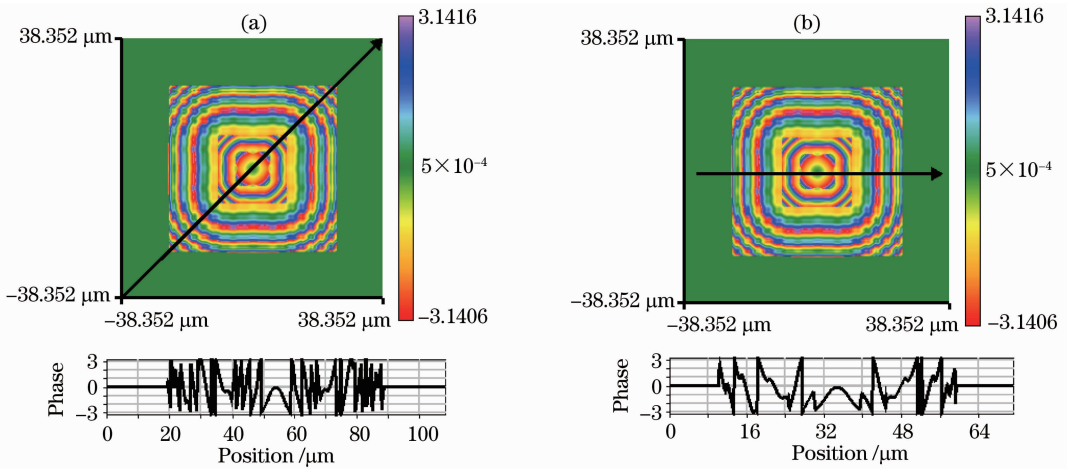


图 9 线性叠加后的相位分布。(a)纵向分布;(b)横向分布

Fig. 9 Phase distribution with linear superposition. (a) Longitudinal distribution; (b) lateral distribution

4 结 论

通过虚拟仿真光学实验得到了图 3~9,从其相位分布条纹的形态可以发现:有无内核,其相位分布特征不同;球形下分布最简单,完全与模型下光程差的球形变化相对应;有内核时外部相位分布基本不变化,内核的相位分布与内核形态有关,但是不完全直接对应;比较图 7 与图 9 可以发现核的散射对相位成像有影响,但是部分情况下存在确定性。因此可得出如下结论:

1) 一般情况下,白细胞结构形态所决定的类别不同,对应着不同的相位分布。但是白细胞亚类结构不同会产生基本相同的相位分布,此时由于胞核

光散射的调制变化与亚类相关,从而可用于白细胞亚类的辅助确定。

2) 相位分布不仅仅与干涉相位成像相关,而且与核的散射有关。因此,用相位显微法观察红细胞就可以,而用同样的方法观察白细胞的类别时需要考虑到核散射的影响,因此必须建立新的显微成像识别理论。

参 考 文 献

1 Wang Yawei, Bu Min, Cui Qingyi *et al.*. Dynamic characters of light scattering intensity distribution for a nuclear-cell [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(10): 1434~1440
 王亚伟,卜敏,崔青义等.有核细胞光散射幅值分布动态特性的研究[J]. *中国激光*, 2006, **33**(10): 1434~1440

- 2 B. Kemper, P. Langehanenberg, G. V. Bally. Digital holographic microscopy[J]. *Optik & Photonik*, 2007, **2**: 41~44
- 3 T. Ikeda, G. Popescu, R. R. Dasari *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent system[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(10): 1165~1167
- 4 Huafeng Ding, L. J. Millet, M. U. Gillette *et al.*. Actin-driven cell dynamics probed by Fourier transform light scattering[J]. *Biomed. Opt. Express*, 2010, **1**(1): 260~267
- 5 G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(21): 2501~2505
- 6 G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(6): 775~778
- 7 Y. K. Park, G. Popescu, K. Badizadegan *et al.*. Diffraction phase and fluorescence microscopy [J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(8): 8263~8268
- 8 S. D. Babacan, Zhuo Wang, M. Do *et al.*. Cell imaging beyond the diffraction limit using sparse deconvolution spatial light interference microscopy[J]. *Biomed. Opt. Express*, 2011, **2**(7): 1815~1827
- 9 Zhuo Wang, L. Millet, V. Chan *et al.*. Label-free intracellular transport measured by spatial light interference microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2011, **16**(2): 026019
- 10 Zhuo Wang, L. Millet, M. Mir *et al.*. Spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(2): 1016~1026
- 11 Yawei Wang, Weifeng Jin, Naifei Ren. Dual-medium quantitative measurement simulation on cells[J]. *Appl. Opt.*, 2011, **50**(35): 6440~6445
- 12 Yawei Wang, Min Bu, Xuefu Shang *et al.*. Light scattering models of white blood cells and back-scattering distribution analysis of it[J]. *Optica Applicata*, 2011, **41**(3): 527~539
- 13 Weifeng Jin, Yawei Wang, Naifei Ran *et al.*. Simulation of simultaneous measurement for red blood cell thickness and refractive index[J]. *Opt. & Lasers in Engng.*, 2012, **50**(2): 154~158
- 14 Wang Yawei, Lei Haina, Bu Min *et al.*. Distribution characteristics and identification of several typical blood cells under optical phase models[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2629~2635
王亚伟, 雷海娜, 卜敏等. 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[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2629~2635
- 15 B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuche *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
- 16 Bu Min, Wang Yawei, Jin Weifeng *et al.*. Effect of scattering intensity modulation on the study of cell morphology[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(11): 1104001
卜敏, 王亚伟, 金卫凤等. 单核细胞散射光强调制在细胞形态研究中的作用[J]. *中国激光*, 2011, **38**(11): 1104001

栏目编辑: 韩峰