

# 数字全息技术在生物医学成像和分析中的应用

王云新<sup>1,2,3</sup> 王大勇<sup>1,2,3</sup> 杨怡姝<sup>4</sup> 赵洁<sup>5</sup> 欧阳丽婷<sup>1,2,3</sup> 肖向茜<sup>4</sup> 戎路<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>北京工业大学应用数理学院, 北京 100124; <sup>2</sup>北京工业大学微纳信息光子技术研究所, 北京 100124

<sup>3</sup>北京市精密测控技术与仪器工程技术研究中心, 北京 100124; <sup>4</sup>北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124

<sup>5</sup>北京工业大学实验学院, 北京 101101

**摘要** 数字全息成像具有全视场、非接触、无损伤、实时性和定量化的独特优势, 特别适合于无染色剂标记生物样品的定量三维重建和快速跟踪, 在生物医学应用领域发展迅速。介绍了生物细胞的数字全息相衬成像原理, 从细胞形貌测量、生物学参数、生理状态、药效反应和动力学分析几方面概述了数字全息成像方法在生物医学领域中的研究和应用进展, 讨论了数字全息在生物医学方面的发展前景, 并指出了数字全息成像所面临的挑战和亟待解决的技术问题。

**关键词** 全息; 相衬成像; 显微; 生物医学; 活体细胞

**中图分类号** O436 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL201441.0209002

## Application and Analysis in the Biomedicine Field Using Digital Holographic Technology

Wang Yunxin<sup>1,2,3</sup> Wang Dayong<sup>1,2,3</sup> Yang Yishu<sup>4</sup> Zhao Jie<sup>5</sup> Ouyang Liting<sup>1,2,3</sup>  
Xiao Xiangqian<sup>4</sup> Rong Lu<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>College of Applied Science of Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

<sup>2</sup>Institute of Information Photonics Technology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

<sup>3</sup>Beijing Engineering Research Center of Precision Measurement & Control Technology and Instruments, Beijing 100124, China

<sup>4</sup>College of Life Science & Biotechnology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

<sup>5</sup>Pilot College of Beijing University of Technology, Beijing 101101, China

**Abstract** The digital holography is characterized by its full field of view, non-contact, non-destructive, real-time and quantitative detection, which is especially suitable for the three-dimensional reconstruction and fast tracking of living cells without staining or labeling. The digital holography imaging has been developed rapidly in the field of the biomedical science. The basic principle of digital holography is introduced for the cell detection, and the major progress of the research and application is reviewed based on the cell morphology, biological parameters, physiological status, drug effect and dynamic analysis. The potential application and future research are discussed, and the challenge and problems of digital holography technology are pointed out.

**Key words** holography; phase-contrast imaging; microscopy; biomedicine; living cell

**OCIS codes** 090.1995; 180.3170; 050.1970; 000.1430

**收稿日期:** 2013-10-24; **收到修改稿日期:** 2013-11-19

**基金项目:** 国家自然科学基金(61077004, 61205010, 61307010)、北京市自然科学基金(1122004)、高等学校博士学科点专项科研基金(20121103120003)、北京市教育委员会科技计划(KM201310005031)、中国博士后科学基金(2013M540828)、北京市博士后科研活动经费资助(2013ZZ-17)、中央支持地方专项配套项目

**作者简介:** 王云新(1981—), 女, 博士, 讲师, 主要从事光学信息处理和数字显微测量方面的工作。

E-mail: yxwang@bjut.edu.cn

\* **通信联系人.** E-mail: wdyong@bjut.edu.cn

## 1 引言

在生物医学和生命科学研究中,对生物细胞在玻璃器皿培养液内和在自然条件下进行可视化观测,期望获得细胞的结构形态、动态特性、生理学参数、细胞间的相互作用、细胞对药物的反应和药物输运等信息,对于早期医学诊断和药物设计开发等具有重要意义。然而,当前的定性、二维和较慢成像速度的显微成像方法已经不能满足生物医学研究 and 发展的需求,迫切需要可实现定量、三维和快速跟踪的成像方法。由于生物细胞一般为相位型或者类相位型物体,只能提供振幅像的传统光学显微镜很难清晰分辨细胞边缘,且其成像焦深较短,每次聚焦只能获取物体的二维图像,对样品的厚度、位置以及三维形貌的观测非常困难。为了提高细胞成像的对比度,人们提出了荧光显微镜,但使用该显微镜前需要利用罗丹明、吖啶橙或绿色荧光蛋白等物质对生物细胞进行染色预处理<sup>[1]</sup>,此预处理增加了操作的复杂度,且不可避免地会影响生物细胞的生理特性。为此,各种光学相衬显微成像方法得到快速发展,如广泛使用的泽尼克相衬显微镜、微分相衬显微镜、激光共焦显微镜和光学相干层析术等<sup>[2-3]</sup>。但随着生物医学和生命科学的迅速发展,这些方法已经不能满足对生物活细胞的动态定量观测需求,例如泽尼克相衬显微镜和微分相衬显微镜的基本原理是把相位信息转换成强度信息,该变换一般是非线性的,因而测量的相位信息只是定性的。激光共焦显微镜和光学相干层析术虽然可以进行物体的三维形貌测量,但这两种显微镜都需要对样品进行精确扫描,导致成像系统的结构十分复杂,且成像历时长,不能实现实时动态测量。在以上技术基础上也提出了其他改进的全视场定量相衬成像方法,如希尔伯特变换相位显微术(HPM)、傅里叶变换相位显微术(FPM)和衍射相位显微术(DPM)等<sup>[4-7]</sup>。然而,在这些方法中,有的需要扫描镜和平移台等机械运动装置,系统结构复杂,有的则需要波前传感器及多次曝光。

数字全息术利用面阵光电探测器(如 CCD、CMOS)代替传统光学全息记录介质(如银盐干板、感光胶片),将全息图以数字化的形式存储于计算机中;然后计算机运用衍射传播理论模拟全息再现时光波的传输过程,通过数值计算得到定量的物光波场的振幅和相位分布,实现了全息图记录、存储和再现全过程的数字化。数字全息技术具有如下的优势<sup>[8-12]</sup>:1)实时性:光电图像传感器能够记录运动

物体的各个瞬时状态,再现过程省去了繁琐的化学湿处理过程,提高了图像信息处理速度,可用于实时处理的场合;2)信息丰富:利用单幅全息图就能定量地得到被记录物体再现像的振幅和相位信息,不仅可以得到反射型物体的形貌分布,还适用于透明或半透明物体的定量相衬成像;3)结构简单:无需任何扫描装置即可对微小物体进行无损检测,同时可以方便调节再现距离得到不同再现距离下的物光波分布,对物空间进行逐层成像,实现全场观察与测量;4)灵活性:可利用现代数字图像处理技术处理数字全息图,减少或消除在全息图记录过程中的像差、噪声与畸变等因素的影响,提高再现像质量;5)无损性:数字全息无需像荧光显微镜那样要对待测样品进行染色等预处理。综上所述,数字全息成像是一种新型的实时、非破坏性的全视场三维定量相衬成像方法。

数字全息显微成像(DHM)的横向分辨率取决于系统的数值口径,可以达到亚微米量级,而轴向分辨率可以达到亚纳米量级<sup>[13-15]</sup>。并且由于数字全息技术具有非破坏性和实时性,特别适合于无染色剂标记生物活细胞的定量相衬成像和三维重建,可实时获得细胞形貌和功能分析,这将为生物医学的研究提供各种定量参数,例如细胞的新陈代谢、生死、凋亡、可塑性、信号传输,细胞膜或细胞质的移动,细胞动力过程研究以及生物组织的成像等。近几年来引起了国内外科科研人员的高度重视,并逐步应用到了生物学和医学成像等研究领域。

本文针对生物医学方面的应用,介绍了生物细胞的数字全息相衬成像原理,从细胞形貌测量、生物学参数、生理状态、药效反应和动力学分析几方面,综述了数字全息成像方法在生物医学领域中的研究和应用进展,讨论了数字全息在生物医学方面的发展前景和存在的技术问题。

## 2 生物细胞相衬成像原理

数字全息作为一种定量的相衬成像方法,其本质是测量待测样品的透射光束或反射光束的相位延迟的光学相干成像方法。一般体外检测的生物细胞需要在培养液中生长,以图 1 中的透射生物样品检测为例,当光通过活体细胞这种相位型样品时,光强度变化非常小,因此细胞的振幅信息不能清晰地体现细胞结构。但是光在活体细胞和细胞周围物质中的传播速度不同,会产生相应的相位延迟。

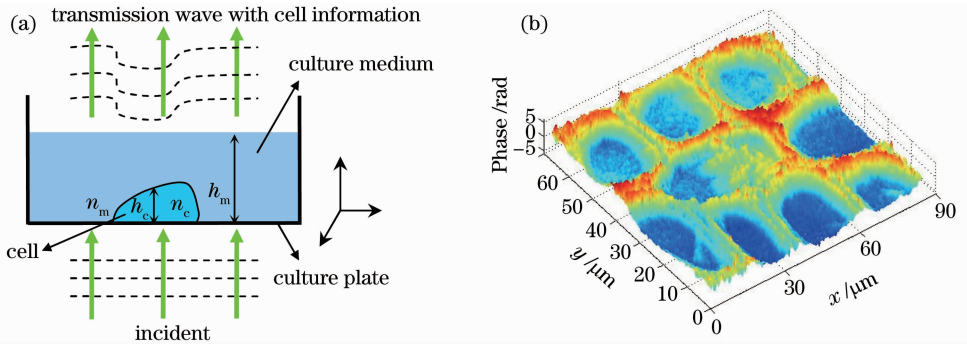

 图1 生物样品的相衬成像原理。(a)入射生物细胞的相位延迟；(b)年轮细胞的相衬像<sup>[16]</sup>

 Fig. 1 Schematic diagram of the phase imaging for the biological sample. (a) Phase delay after propagating through the biological sample; (b) phase image of an annual ring sample<sup>[16]</sup>

相位的超前还是滞后取决于细胞与周围物质的折射率分布。透射生物样品的光波相位延迟为<sup>[17-18]</sup>

$$\phi_{x,y} = \frac{2\pi}{\lambda} \left[ \int_0^{h_{c,x,y}} n_{c,x,y}(z) dz + n_m(h_m - h_{c,x,y}) \right] = \frac{2\pi}{\lambda} [(\bar{n}_{c,x,y} - n_m)h_{c,x,y} + n_m h_m], \quad (1)$$

式中 $\lambda$ 为入射光波波长, $z$ 为轴向坐标, $h_m$ 和 $n_m$ 分别为细胞培养液的高度和折射率, $h_{c,x,y}$ 是细胞内位于 $(x,y)$ 处的细胞厚度, $n_{c,x,y}(z)$ 表示细胞内 $(x,y)$ 处沿着轴向 $z$ 的折射率分布, $\bar{n}_{c,x,y}$ 表示细胞平均折射率,即

$$\bar{n}_{c,x,y} = 1/h_{c,x,y} \int_0^{h_{c,x,y}} n_{c,x,y}(z) dz, \quad (2)$$

因此,由细胞的相位延迟 $\phi_{x,y}$ 可以反推得到细胞的厚度

$$h_{c,x,y} = \frac{[\lambda\phi_{x,y}/(2\pi) - n_m h_m]}{\bar{n}_{c,x,y} - n_m}. \quad (3)$$

数字全息利用光电探测器 CCD 记录参考光波和物光波的干涉图样,即为数字全息图

$$I = |R|^2 + |O|^2 + R^*O + RO^*, \quad (4)$$

式中 $O$ 和 $R$ 分别是传播到 CCD 平面的物光波和参考光波的复振幅分布,“ $*$ ”为共轭运算。

在计算机中首先对全息图进行数值处理,得到全息图的数值再现,实现物光波从全息图平面到物平面或者物体像平面的衍射传播<sup>[19-20]</sup>。由(4)式可知全息图再现像将包含三部分,第一部分是前两项形成的零级像,第二和第三部分是由(4)式的第三和第四项形成的原始像和共轭像,其中第三项携带了物体的全部信息。根据参考光和物光有无夹角可以分为同轴数字全息和离轴数字全息。若数字全息光路为同轴结构,将会存在原始像、零级像和共轭像的

重叠问题,需要采用相移技术或者迭代等算法去除零级像和共轭像<sup>[21-23]</sup>。若数字全息光路为离轴结构,原始像、零级像和共轭像基本不发生混叠,但会引入相位畸变,且往往相位畸变远远大于生物样品的相位信息,因此要获得细胞的准确相位,必须要对数值再现像进行相位畸变校正<sup>[24-25]</sup>。如果细胞的相位信息大于一个光波长,还要对再现像进行解包裹处理才能最终获得细胞的相位信息 $\phi_{x,y}$ <sup>[26]</sup>,如图1(b)中获取的年轮细胞的相位像,从而最终实现细胞相位和形貌信息的检测。

### 3 面向生物医学应用的数字全息成像装置

生物细胞的尺度在亚微米到几十微米量级,根据成像视场和分辨率的要求不同,可采用不同的数字全息成像装置。为了观测单个或少数几个生物细胞的形貌特征,需要较高成像分辨率,往往采用基于显微物镜(MO)的预放大数字全息显微成像装置<sup>[27-34]</sup>。为了分析大量细胞的形态变化和动态特性,需要较大的视场,可以采用无透镜傅里叶变换数字全息成像装置<sup>[35-37]</sup>。下面将介绍这两种典型的面向生物医学应用的数字全息成像装置。

#### 3.1 预放大数字全息显微成像装置

在预放大数字全息系统中,为了提高成像分辨率而在物体和全息图平面之间适当位置放置一个显微物镜,对待测物体进行放大,该放大物光波与参考光干涉后,利用 CCD 即可记录放大物体的全息图。预放大数字全息图的记录原理如图2(a)所示<sup>[10, 34]</sup>, $x_o-y_o$ 平面、 $x_m-y_m$ 平面和 $x-y$ 平面分别是物平面、MO平面和全息图平面。图2(b)为预放大数字全息显微成像装置的结构示意图<sup>[28]</sup>,为了方便放置生物培养皿,成像系统为倒置结构,激光器发出的光被

耦合进光纤,又被光纤分束器分为两束,分别作为物光和参考光;物光经扩束准直后从上往下照在培养皿上,参考光经过扩束准直后与经显微物镜放大后的物光发生干涉,利用 CCD 探测得到全息图,经第

2 节中介绍的后续数值处理,即可再现生物细胞的形貌信息。需要指出的是,在该实验结构中有个特殊情况,即当全息图平面与像平面重合时,此时称为像面预放大数字全息。

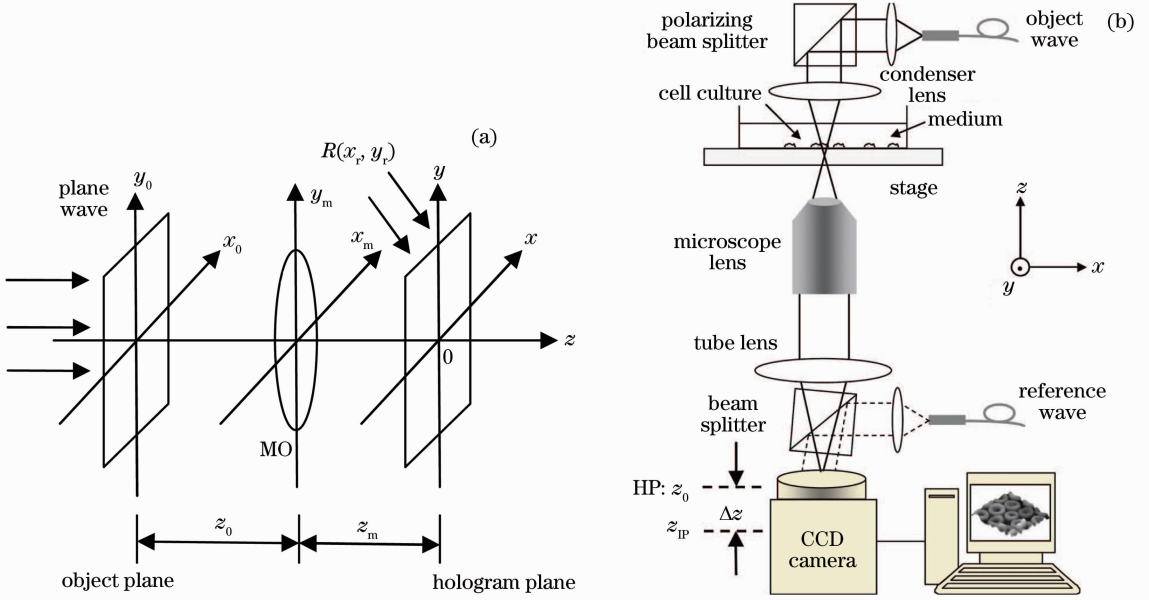


图 2 预放大数字全息显微成像装置。(a)全息图记录原理<sup>[34]</sup>;(b)结构示意图<sup>[28]</sup>

Fig. 2 Pre-magnification digital holographic microscopy. (a) Recording principle<sup>[34]</sup>; (b) recording setup<sup>[28]</sup>

预放大数字全息显微成像的特点是视场较小、分辨率较高。系统分辨率由光波波长  $\lambda$  和显微物镜的数值孔径(NA)决定,系统的理想分辨率为<sup>[38]</sup>

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{NA}. \quad (5)$$

此外,由于生物样本表面相对于照明光波长而言存在随机粗糙,导致成像受到散斑噪声的干扰,特别是当培养液体混浊时散斑噪声显著<sup>[39]</sup>,将会大大降低成像质量。针对这一问题,Dubois 等<sup>[40]</sup>提出了部分相干光预放大数字全息显微成像装置,采用发光二极管(LED)作为光源,通过降低光源的时间相干性提高成像信噪比。

### 3.2 无透镜傅里叶变换数字全息成像装置

无透镜傅里叶变换数字全息的记录过程如图 3(a)所示, $x_0$ - $y_0$  平面、 $x$ - $y$  平面分别是物平面和全息图平面, $P$  为球面参考点源,其坐标位置为  $\delta(x_0 - x_r, y_0 - y_r)$ ,且参考光源与物平面在同一个平面内,记录距离为  $z_0$ 。无透镜傅里叶变换数字全息成像装置的结构如图 3(b)所示<sup>[36]</sup>,从激光器发出的光由偏振分束棱镜(PBS)分成两束光波,两束光波均经过扩束滤波系统(BE),其中一束光波通过待测物体作为物光波,另一束光波通过显微物镜产生点光源作为参考光,实验中调节光路使点光源和待测样品到

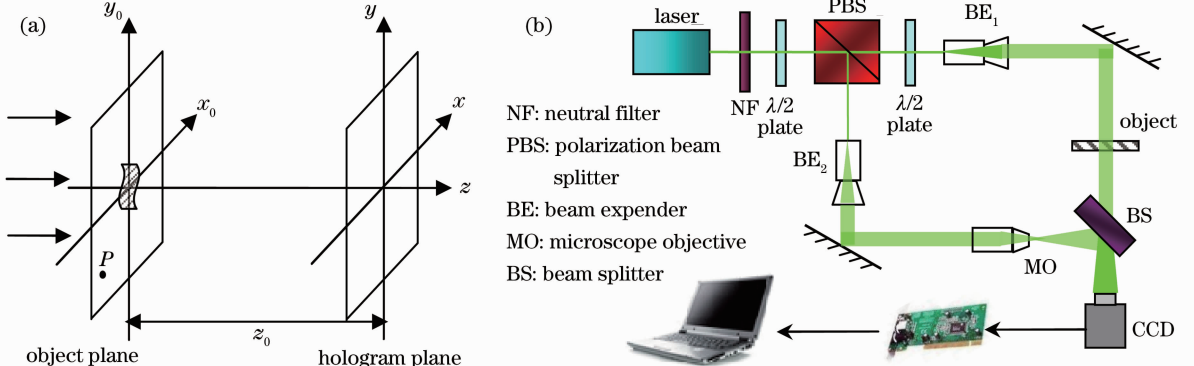


图 3 无透镜傅里叶变换数字全息成像装置。(a)全息图记录原理;(b)结构示意图<sup>[36]</sup>

Fig. 3 Lensless Fourier transform digital holography. (a) Recording principle; (b) recording setup<sup>[36]</sup>

CCD 平面的距离相同,实现物光与参考光共面。

无透镜傅里叶变换数字全息图本质是记录了物体的频谱,通过全息图进行一次快速逆傅里叶变换即可实现数值再现。相对于普通离轴菲涅耳全息系统来说,无透镜傅里叶变换数字全息对被测物体的横向尺寸约束小,具有较大的空间带宽积,能充分利用 CCD 的带宽,降低对 CCD 空间分辨率的要求<sup>[36]</sup>;与预放大数字全息相比,无透镜傅里叶变换数字全息的成像分辨率较低,但成像视场较大。无透镜傅里叶变换数字全息装置的横向分辨率与记录距离  $z_0$ 、CCD 的幅面尺寸  $L_{\text{CCD}}$  的关系为<sup>[41]</sup>

$$\delta = \frac{\lambda}{2} \sqrt{\left(\frac{2z_0}{L_{\text{CCD}}}\right)^2 + 1}. \quad (6)$$

## 4 基于数字全息技术的生物样品成像和分析研究

### 4.1 活体细胞形态检测

1992 年 Haddad 等<sup>[35]</sup>最早将数字全息用于生

物样品成像,实现了无透镜傅里叶变换数字全息图的记录和再现,得到了寄生虫细胞的三维图像。2004 年,Carl 等<sup>[27]</sup>利用预放大数字全息成像(MO:  $20\times$ ,  $NA=0.4$ )装置实现了悬浮活体肿瘤肝细胞的相衬检测,其横向分辨率为  $0.86\ \mu\text{m}$ ,轴向分辨率为  $30\ \text{nm}$ 。此后,随着高分辨率大幅面 CCD 器件、高速 CMOS 器件、计算机运算性能及先进数字图像处理技术的快速发展,利用数字全息进行活体细胞形态、行为和功能检测的研究大量涌现。Rappaz 等<sup>[30-31]</sup>利用预放大数字全息成像(MO:  $60\times$ ,  $NA=0.8$ )对活体小鼠皮层神经元细胞进行了成像<sup>[29]</sup>,结果如图 4(a)所示,其相位测量精度为  $2^\circ\sim 4^\circ$ ,轴向测量精度为  $160\sim 320\ \text{nm}$ ,将实验结果与泽尼克相衬显微镜和微分相衬显微镜进行了对比,结果显示数字全息成像能提供更好的信噪比和清晰度。Rappaz 等<sup>[30]</sup>对人体红血球细胞进行了检测,结果如图 4(b)所示,并据此分析了细胞的体积、面积和高度等信息。

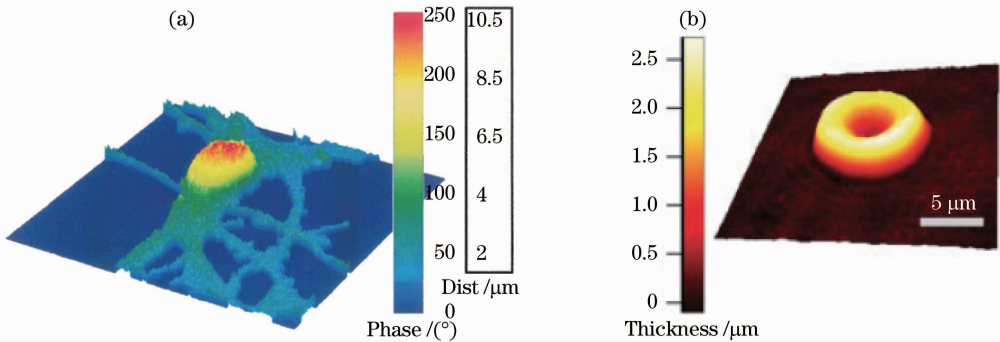


图 4 活体细胞的成像结果。(a)小鼠皮层神经元细胞成像<sup>[29]</sup>; (b)人体红血球细胞成像<sup>[30]</sup>

Fig. 4 Imaging results of living cells. (a) Image of a living mouse cortical neuron<sup>[29]</sup>; (b) image of the human erythrocyte<sup>[30]</sup>

国内,董可平等<sup>[42]</sup>采用预放大数字全息成像(MO:  $10\times$ ,  $NA=0.25$ )获得了新鲜洋葱表皮细胞的形貌结构。马利红等<sup>[33]</sup>利用显微物镜( $60\times$ ,  $NA=0.85$ )对样品进行放大,实现了活体血红细胞

和草履虫的数字全息显微成像。王华英等<sup>[43-44]</sup>利用数字全息显微成像实现了中药饮片细胞的形貌检测。结合光纤搭建了倒置式预放大像面数字全息显微系统(MO:  $20\times$ ,  $NA=0.4$ ),实验中将 CCD 放置

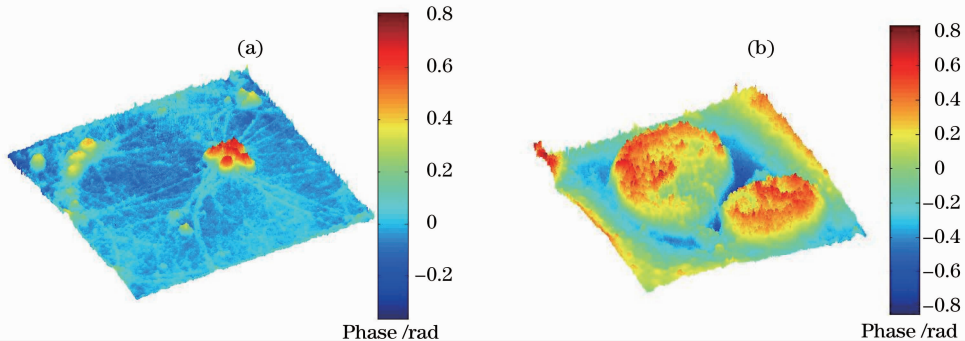


图 5 活体细胞的成像结果。(a)老鼠大脑海马区神经元活细胞成像<sup>[34]</sup>; (b)神经球成像

Fig. 5 Imaging results of living cells. (a) Image of the living hippocampal neuron cells<sup>[34]</sup>; (b) image of the neurospheres



在物方像平面上,系统的横向分辨率为  $0.977 \mu\text{m}$ ,实现了无标定的老鼠大脑海马区神经元活细胞的定量相衬成像,结果如图 5(a)所示,可清晰观察到胞体、树突等形态结构,获得了神经元细胞形态的基本参数,该研究期望为研究海马区神经元细胞的活动对于记忆的运作机制等方面提供基本的生物参数依据<sup>[34]</sup>。神经球是神经干细胞在体外扩增培养过程中的一般表现形式,普遍应用于神经干细胞的体外培养,还基于预放大像面数字全息显微系统(MO:  $10\times$ ,  $NA=0.25$ )获得了神经球的相衬成像,结果如图 5(b)所示。

数字全息还可提供较大的视场,实现大量细胞的显微成像,可用于微生物识别、细胞计数等。Moon 等<sup>[45-46]</sup>分别构建了单次曝光同轴数字全息和部分相干计算全息两套成像系统,结合 Gabor 小波变换和主成分分析等算法对向日葵干细胞进行了微生物成像、形态识别和自动分类,结果表明对于类相位型或者相位型样本来说,基于数字全息三维成像的识别性能远远好于二维成像。基于无透镜傅里叶变换数字全息成像提出了一种自动无损的细胞培养状态监测方法,结合图像分割技术得到了宫颈癌细胞(HeLa)生长的汇合度参数,充分发挥了数字全息全视场和实时检测的优势<sup>[36]</sup>。

#### 4.2 生物学参数测量

细胞折射率是活体细胞的重要生物参数之一,可以反映细胞的内部结构和生物特征变化。由(1)式可以看出,细胞的相位信息取决于细胞的折射率

和厚度,因此细胞的相位信息也携带了细胞的折射率信息。目前主要采用如下两种方法获取细胞的折射率参数。

##### 4.2.1 双波长数字全息成像方法

细胞培养液对不同的波长具有不同的折射率,导致双波长光路下细胞的光程差不同,因此可利用双波长照明实现细胞折射率的二维测量。细胞折射率与细胞光程差的关系为<sup>[47-48]</sup>

$$\bar{n}_c(x, y) = \frac{l_{\lambda_1}(x, y) \cdot n_{s\lambda_2} - l_{\lambda_2}(x, y) \cdot n_{s\lambda_1}}{l_{\lambda_1}(x, y) - l_{\lambda_2}(x, y)}, \quad (7)$$

式中  $\bar{n}_c(x, y)$  为细胞的平均折射率,  $n_{s\lambda_1}$ 、 $n_{s\lambda_2}$  为细胞培养液在波长  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  下的折射率,  $l_{\lambda_1}$  和  $l_{\lambda_2}$  分别为在波长  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  下获得细胞的光程差。

Rappaz 等<sup>[48]</sup>利用双波长预放大数字全息成像方法,借助灌注介质逐渐增强的色散特性,分别测量了细胞的折射率和厚度。双波长预放大数字全息成像装置的结构与图 2(b)类似,采用数值孔径为 0.85 的  $63\times$  显微物镜,不同之处是将可调谐激光器作为光源。由于灌注介质的吸收系数是波长的函数,在不同的波长下可分别测量生物样品的相位信息。图 6(a)为在 490 nm 光源照射下获得的两个酵母细胞的相位图,图 6(b)为分别在 490、500、600、625、663 nm 五个波长照明下获得的右侧酵母细胞的光程差,可见不同的波长照射下就可以得到不同的光程差,在染料吸收峰的附近选择两个波长,通过(7)式即可求得生物样品的折射率分布<sup>[48]</sup>。

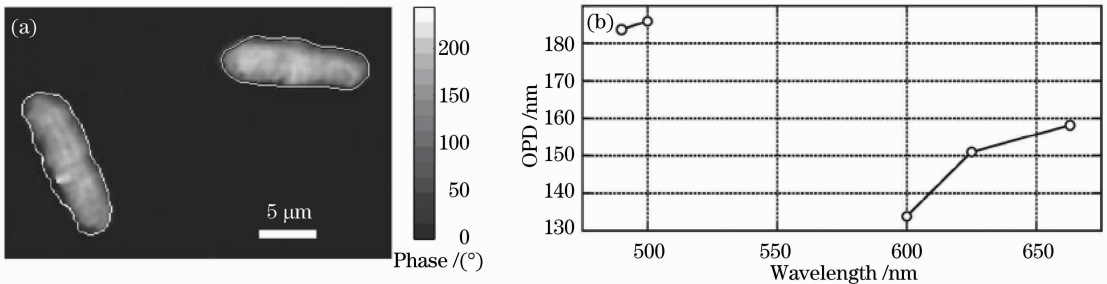


图 6 (a)在 490 nm 光源照射下获得的两个酵母细胞的相位图;(b)图 6(a)中右侧酵母细胞的光程差与五个入射光波长的关系  
Fig. 6 (a) Phase image of two yeast cells at 490 nm; (b) variation of the optical-path difference for the right monitored cell in Fig. 6(a) as a function of the wavelengths

##### 4.2.2 数字全息衍射层析成像方法

基于数字全息显微术的光学衍射层析成像方法首先记录物体的多角度衍射信息,然后再通过相移技术或相位复原算法获取物体的复振幅分布,最后利用 Radon 变换计算定量的三维折射率分布。在预放大数字全息装置的基础上,采用多角度照明位

置固定的物体,或者用一束固定方向的光波照明旋转的物体这两种方式,均可获取物体的多角度衍射信息<sup>[49-50]</sup>。Charriere 等<sup>[49]</sup>构建了预放大数字全息装置(MO:  $63\times$ ,  $NA=0.85$ ),将红豆杉花粉粒置于小型微量吸管中,利用电动旋转台控制小型微量吸管的旋转,记录多幅全息图,获取了红豆杉花粉的

折射率分布,然而在相位复原中采用了相移技术,因此获取单一方向的相位信息也需要采集多幅全息图,这就降低了系统的稳定性和效率。为了进一步优化上述装置,实验中将样品放置在一个专门设计的腔内,这个腔主要是由两个正交于光轴的显微镜盖玻片组成,从腔的一边使用微量移液器操作样品,将微量移液器固定在一个机械旋转台上,通过微型

平台调整它的位置,使样品细节部位准确地放置在旋转轴上,系统的横向和轴向分辨率均优于  $3\ \mu\text{m}$ ,折射率测量精度优于  $0.01$ <sup>[50]</sup>。利用该成像系统获得了两种凤蝶茄壳虫的折射率层析分布,结果如图7所示。数字全息衍射层析成像方法的优势是无需改变生物样品的生长环境,即可实现折射率的三维分布。

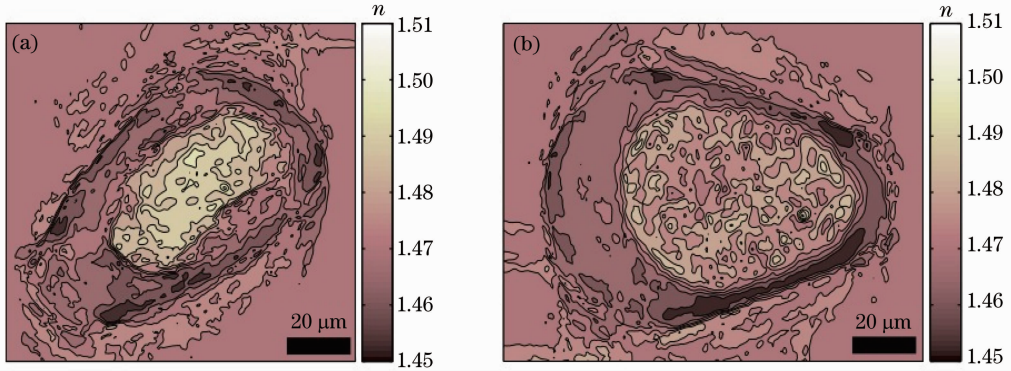


图7 两种凤蝶茄壳虫的折射率层析重建图像<sup>[50]</sup>

Fig. 7 Tomographic reconstructions of refractive index from two different *Hyalosphenia papillosa*<sup>[50]</sup>

此外,Rappaz等<sup>[17]</sup>通过渗透方法获取了正常状态下和不同膨胀状态下活体小鼠皮层神经元细胞的折射率,但是这种方法需要改变细胞的培养环境。Lue等<sup>[51]</sup>为了从相位信息中解耦出细胞的折射率和厚度,将细胞局限在微流控芯片中,通过分别测量只有培养基和水、以及在培养基中培养了细胞这两种状态下的相衬像,实现了折射率的测量,但这种方法需要将细胞注入到微流控芯片中进行检测。

### 4.3 细胞生理状态分析

#### 4.3.1 细胞分化

细胞分化是胚胎细胞分裂后未定型的细胞,在形态和生化组成上向专一性或特异性方向分化,或由原来较简单具有可塑性的状态向异样化稳定状态进行分化的过程。机体一切组织细胞分化时的主要特征是细胞出现不同的形态结构和合成组织特异性的蛋白质,演变为特定表型的细胞类型<sup>[52]</sup>。Alm等<sup>[53]</sup>利用数字全息成像观测贴壁3T3L1成纤维细胞的分化过程,对贴壁3T3L1成纤维细胞利用  $0.5\ \text{mM}$  (M表示单位  $\text{mol/L}$ ) 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX),质量浓度为  $10\ \mu\text{g/mL}$  的胰岛素和  $1\ \mu\text{M}$  地塞米松处理3天后,该细胞分化为脂肪细胞,利用数字全息成像可以明显看到脂肪细胞中的脂质颗粒,而其他相衬显微镜无法清晰分辨这一信息。Chalut等<sup>[54]</sup>利用预放大数字全息系统 ( $NA=1.4$ ) 对人早幼白血病 HL60 细胞进行相衬成像,发现在

细胞分化过程中会有重要的物理变化。实验给出了诱导中性粒细胞和单核细胞在不同时刻的平均折射率分布,可以看到显著的核分叶特征结构,且在中性粒细胞和单核细胞分化过程中,随着时间的推移折射率均有明显下降。

#### 4.3.2 细胞分裂研究

在单细胞生物中细胞分裂就是个体的繁殖,在多细胞生物中细胞分裂是个体生长、发育和繁殖的基础。从细胞分裂产生的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束,所经历的过程称为细胞周期,细胞的生长和分裂的速度决定于细胞周期。细胞为了保持自身体积恒定,在一个细胞周期内需要使自身物质翻倍,因此可利用干物质(非水物质)表征生物大分子,干物质是指脱水细胞的质量,主要取决于蛋白浓度。因此检测干物质生产可以动态评估细胞周期。Rappaz等<sup>[55]</sup>利用预放大数字全息显微成像在单细胞水平对野生型或突变型的裂殖酵母进行了干物质生产速率和干物质表面密度检测,为细胞周期分析提供了无损、定量、动态的测定方法,也使高通量药物筛选的应用成为可能。此外,他们还测定了正常红细胞和乙醇固定的红细胞全细胞表面上红细胞膜波动(CMF)的丰度。在计算CMF时考虑到了膜的方向、折射率等<sup>[56]</sup>。Pan等<sup>[57]</sup>设计了一种能够适用于细胞培养环境的光纤-空间光混合的预放大数字全息成像系统,研究了超磁场失重状

态下造骨细胞的细胞分裂和形态变化。Kemper 等<sup>[58]</sup>利用预放大数字全息成像装置(MO: 40×, NA=0.65)对人脑微血管内皮细胞(HBMECs)的细胞分裂过程进行了长时间的实时监测,结果如图 8 所示,图中箭头指示了细胞分裂的位置。细胞 A、

B 和 D 分别在 19.7, 32.5, 37.7 h 发生分裂,在整个过程中细胞 C 没有发生分裂。实验观察到在细胞分离前相位明显增加,在细胞贴附于支持物上的阶段,那些比细胞核、核膜及核仁周围密度高的亚细胞区域逐渐变得清晰可见。

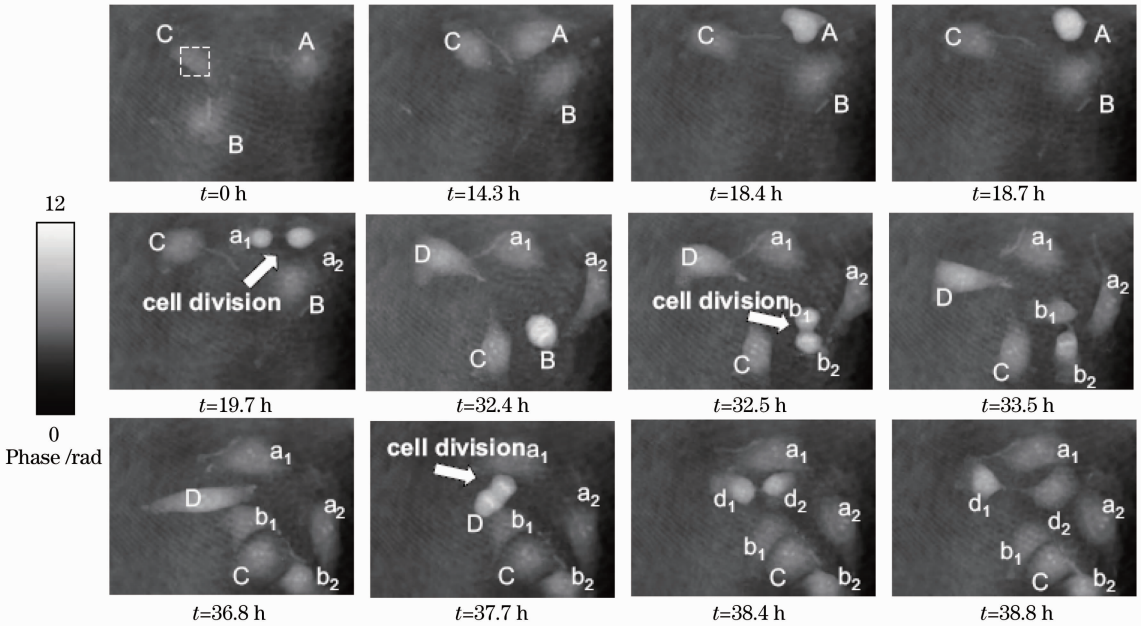


图 8 活体人脑微血管内皮细胞(HBMECs)的数字全息相衬成像结果<sup>[58]</sup>

Fig. 8 Quantitative DHM phase contrast images of living HBMECs<sup>[58]</sup>

#### 4.3.3 细胞死亡分析

细胞因受严重损伤而累及胞核时,呈现代谢停止、结构破坏和功能丧失等不可逆性变化,导致细胞死亡。细胞死亡包括坏死和凋亡两类。细胞坏死为被动死亡,它是指细胞受到环境因素的影响,导致细胞死亡的病理过程。细胞凋亡又称为程序性死亡,属于主动死亡,为了维持机体内环境的稳定,细胞发生主动的,由基因控制的自我消亡过程<sup>[52]</sup>。细胞凋亡过程的紊乱与许多疾病的发生有直接或间接的关系,而细胞凋亡与细胞形态具有密切联系。凋亡性体积减小是细胞凋亡早期阶段中的显著特点之一。Khmaladze 等<sup>[18, 59]</sup>利用预放大数字全息显微成像实时观测了大量口腔癌(KB)上皮细胞的凋亡性体积减小情况,在 1~2 μM 的孢菌素作用下,在 4 h 内人体上皮 KB 细胞凋亡性体积减小至 40%,且将实验结果与原子力显微镜的结果进行了对比,误差在 5%以内。

#### 4.4 药效反应

利用数字全息显微成像辅助分析药物对癌细胞的作用是目前的研究热点之一。Carl 等<sup>[27-28, 60]</sup>采用数字全息显微镜研究了胰腺癌细胞的侵袭机制及

抗癌药的作用机理。现有研究表明胰腺癌预后差的原因之一是在临床症状出现前及癌症诊断前就易形成微转移灶,但是目前对于决定其高度恶性生长及播散模式的分子机制尚不清晰。参与肌动蛋白骨架组成的 E-钙粘着蛋白及其相关连环蛋白参与了胰腺癌的进展,这些蛋白决定了细胞的形状。研究显示加入 Latrunculin B(可破坏肌动蛋白细胞骨架的毒素)后,高分化胰腺癌细胞 Patu8988S(侵袭力低)在短时间内细胞肿胀,随之崩解。而低分化胰腺癌细胞 Patu8988T(侵袭力高、易转移)则呈现细胞高度肿胀,但在观察期间未见到细胞崩解。表明与高侵袭力的胰腺癌细胞相比,非侵袭性胰腺癌细胞肌动蛋白细胞骨架的稳定性差。另外,Patu8988T 细胞的肿胀也提示 Latrunculin B 不仅影响了肌动蛋白纤丝,而且也影响了调控信号转导的细胞环境。此外胰腺癌细胞(Patu8988T)加入抗癌药 Taxol 后,采用倒置数字全息显微镜每隔 120 s 记录一次,持续记录 16 h,表明 Taxol 首先诱发 Patu8988T 细胞圆化、细胞厚度增加,随后诱导细胞崩解。

部分药物的有效成分难溶于水,只能溶于极性较高的有机溶剂,药物溶剂本身对癌细胞的影响会



直接干扰药效评价的准确性,有必要评价有机溶剂自身对癌细胞的作用。利用预放大数字全息显微成像系统对正常对照组、甲醇体积分数分别为12.5%、25%和50%条件下生长的 HeLa 细胞进行了形态检测,结果如图 9 所示<sup>[61]</sup>。利用图像分割方法提取了活体细胞的形态信息,采用细胞面积,细胞光学平均厚度和细胞最大平均光学厚度三个参数定量评价细胞的形态变化。结果显示与正常对照组相比,甲醇体积分数为 12.5%和 25% 的细胞面积降低显著( $P < 0.01$ ),表明低体积分数甲醇具有毒性,会导致细胞收缩;甲醇体积分数为 50%的细胞面积没有显著变化( $P > 0.05$ ),表明高体积分数甲醇对活体细胞具有固定作用。甲醇作用下的细胞平均厚度与正

常对照组相比均有明显差异,且细胞的最大平均光学厚度均比正常对照组要高。甲醇体积分数为 50%条件下,虽然细胞面积没有显著变化,但细胞的光学厚度具有显著的变化。此外,Pavillon 等<sup>[62]</sup>利用数字全息对谷氨酸盐作用下的老鼠大脑皮层神经元进行了形貌和细胞体积检测,实验结果表明不可避免的相位下降是谷氨酸盐导致神经元细胞早期死亡的标志特征之一,基于细胞体积分析可评价药物毒性,预测后续是否会有一系列的细胞死亡发生。数字全息成像可以提供定量的相位信息,且其检测灵敏度可以用于区分健康细胞和不具有活性的细胞。

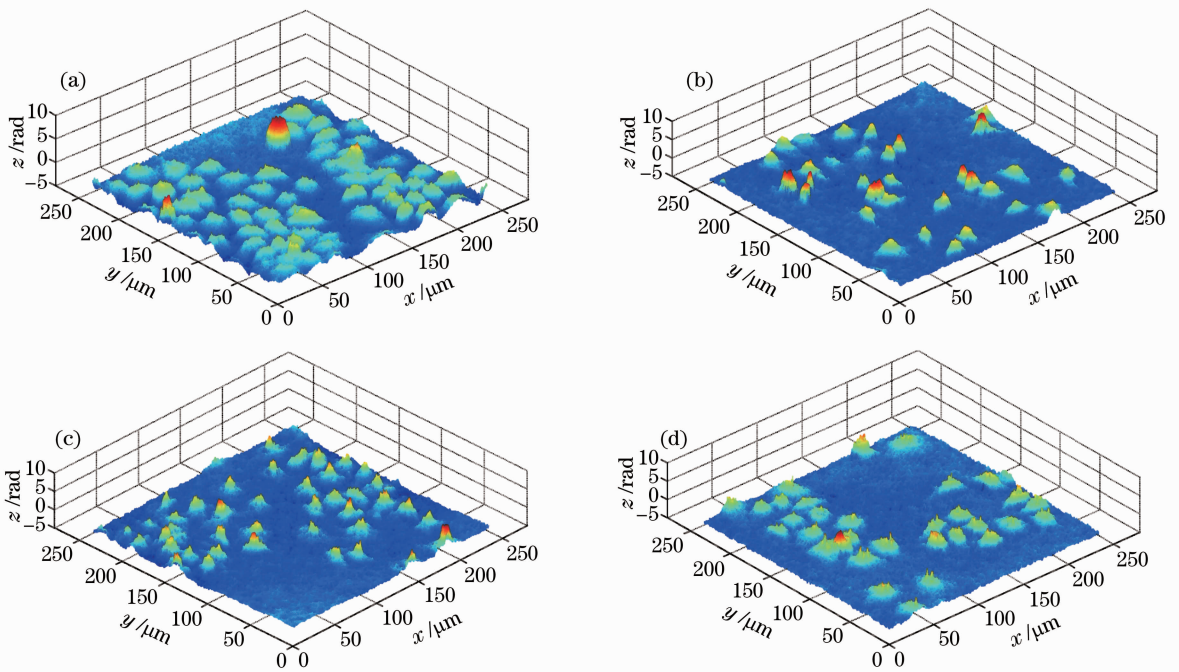


图 9 HeLa 细胞的相衬成像结果。(a)对照组;(b)甲醇体积分数为 12.5%;(c)甲醇体积分数为 25%;(d)甲醇体积分数为 50%<sup>[61]</sup>

Fig. 9 Phase-contrast imaging results of living HeLa cells. (a) Cell control; (b) treated with 12.5% methanol; (c) treated with 25% methanol; (d) treated with 50% methanol<sup>[61]</sup>

#### 4.5 细胞迁移和动力学研究

主动的运动是一切生命体最显著的特征之一。作为生物体基本单位的细胞,其多种多样的生理活动,如细胞形态的改变和维持、细胞内物质的运输、内吞外排、免疫行为和细胞分裂等,无不伴随着各种形式的运动。细胞的迁移运动是依赖于细胞和附着基质之间所产生的力,以及收缩系统能够把细胞的某一部分从一点推或拉到另一点去的功能<sup>[52]</sup>。

目前大部分细胞运动学研究都是基于二维成像数据,然而在许多情况下细胞的三维运动与二维运

动有重要区别,并且往往三维运动比二维运动包含了更加丰富的信息。荧光显微镜、霍夫曼显微镜等可实现细胞的三维运动检测,但是这些显微镜只能检测速度较慢的细胞迁移,不适于快速运动细胞的监测。此外,当细胞以一定速度运动到显微镜的离焦面上时,现有显微镜将无法获得准确的三维成像结果。而数字全息可对全息图进行数值再现和自动聚焦,利用这一灵活处理优势,使数字全息成像可以准确地获得高速和离焦平面上的物体信息。潘锋等<sup>[63]</sup>长时间定量监测了骨细胞 MLO-Y4 的迁移过

程。Dubois 等<sup>[40]</sup>基于 LED 光源构建了部分空间相干光预放大数字全息成像系统,该成像系统可以大大降低相干噪声,直接记录在基质凝胶这种散射十分严重的物质中培养的细胞信息,系统的横向分辨率为  $1.3\ \mu\text{m}$ ,轴向分辨率为  $2\ \text{nm}$ 。利用该系统对在特制保温培养皿中的 22 个纤维肉瘤 HT1080 细胞进行了 13 h 的三维运动轨迹检测,并给出了每个细胞的平均运动速度和运动的最大距离。Sun 等<sup>[64]</sup>将同轴预放大数字全息和视频技术结合起来,构建了数字全息视频显微镜(DHVM),该系统可以视频记录细胞的快速运动,并利用血管中的在体血细胞进行了实验验证。Langehanenberg 等<sup>[65]</sup>采用倒置预放大数字全息成像系统对红细胞的沉淀过程和胶原组织模型中的 HT1080 细胞进行了实时观

测,利用基于图像锐度的自聚焦算法获得了清晰的三维成像,定量给出了细胞迁移和运动过程中的转移量。图 10 给出了球形红细胞在重力作用下的沉淀过程,图 10(a)为红细胞轴向位移  $\Delta g$  随时间  $t$  的变化曲线,图 10(b)为红细胞的三维运动曲线。可见,重力作用下红细胞在 30 s 内不断下落,下沉速度为  $(3.23 \pm 0.07)\ \text{mm/h}$ ,可以清晰看到红细胞沉淀过程中的聚合物涂覆表面效应。当细胞靠近盖玻片时( $t > 30\ \text{s}$ ),表面涂料阻止其贴敷,导致运动轨迹有一个小的跳变,并在沉淀过程完成后趋于稳定。整个沉淀过程中,细胞的轴向偏移超出了系统的焦深,因此自动聚焦在细胞的快速跟踪成像中起到了关键作用。

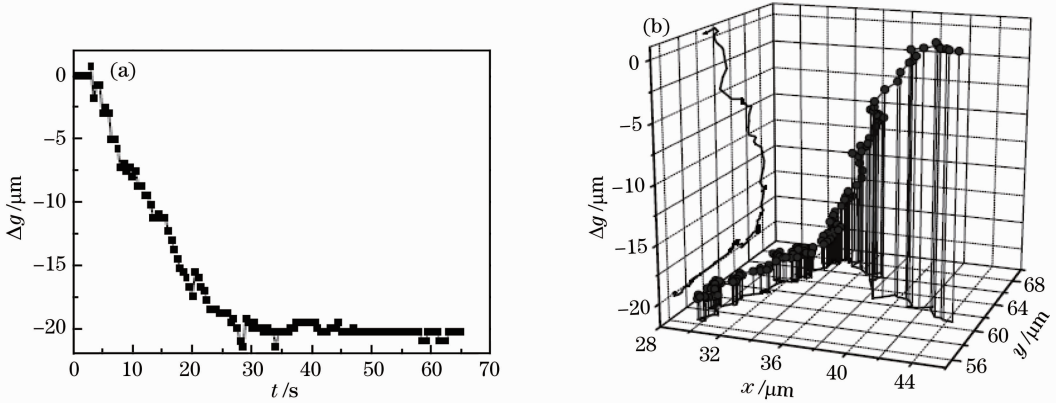


图 10 球形红细胞沉淀过程的三维跟踪结果;(a)红细胞的轴向位移与时间的关系曲线;(b)红细胞的三维运动曲线<sup>[65]</sup>  
Fig. 10 Three-dimensional tracking results of a sedimenting human red blood cell. (a) Relationship between the axial position and time; (b) curve of three-dimensional trajectories<sup>[65]</sup>

## 5 应用前景及存在的问题

### 5.1 应用前景

随着数字全息技术的快速发展,数字全息显微成像已经成功用于静态细胞形貌检测、生物学参数测量和细胞动力学等生物医学研究中。在目前研究工作的基础上,数字全息技术可进一步与内窥镜技术和芯片技术结合,用于早期恶性肿瘤的诊断和其它病理学根源探究,例如病毒感染、神经变性和炎症等,使得临床诊断成为可能<sup>[66]</sup>。数字全息技术与荧光显微镜和波前整形技术相结合,有望观察更多生物样品蛋白质的表达,可实现在各向异性介质中的成像和细胞的在体观测,进而实现多功能显微系统<sup>[67-68]</sup>。数字全息技术还可与生物光子学结合,观察分子水平的细胞功能和结构,实现用光子及其技术对生物系统的检测、加工和改造等<sup>[64]</sup>。此外,近几年数字全息与太赫兹成像的结合得到了广泛的关

注<sup>[69-71]</sup>。太赫兹成像的优势在于其对不透明的非金属和非极性物质(如肿瘤组织等)有较高穿透能力,这对于可见光和近红外光波段等是无法实现的,并且由于太赫兹辐射没有 X 射线的电离特性,因此不会对材料和人体造成伤害,使其在诸多应用方面比 X 射线有更大的应用优势,在医学检查、安全检测、环境监测和空间遥感等方面展现出巨大的前景。

### 5.2 存在的问题

数字全息显微成像的实际应用仍然存在诸多问题,主要体现在以下两方面:

#### 1) 成像分辨率

受限于光电探测器的靶面尺寸和像素间隔,数字全息的分辨率远远小于传统光学全息的分辨率。数字全息采用光电探测器记录全息图,目前 CCD 的光敏面尺寸(小于  $50\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ )远远达不到银盐干板等记录介质的尺寸( $100\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$  以上),且 CCD 的分辨率( $100\ \text{line/mm}$ )比传统光学全息中

使用的银盐干板的分辨率(5000 line/mm)要低得多,这就严重限制了数字全息成像系统的数值孔径和再现像的分辨率,决定了数字全息只能直接记录物体的中低频信息。为了充分利用 CCD 靶面记录物体的更多高频信息,人们已经提出了多角度照明、空间复用和光栅等多种超分辨数字全息成像方法<sup>[72-74]</sup>。

## 2) 细胞折射率和细胞形貌的解耦

透明细胞的相位正比于细胞的折射率和厚度,因此在检测细胞信息时涉及到细胞折射率和细胞形貌的解耦问题,这也是目前生物细胞数字全息成像中的研究热点<sup>[47-49]</sup>。针对这一问题,近几年国内外许多研究组尝试通过对数字全息层析技术的研究来解决,数字全息层析技术可实现生物组织成分检测、细胞内部多层折射率三维重建或与折射率变化相关的物理量测量及重建误差分析等,但目前这一技术尚不成熟,有待进一步研究。此外,生物细胞的在体成像、大视场成像等方面也是目前需要研究的方向。

## 6 结 论

数字全息成像作为一种新型的实时、非破坏性的全场三维定量相衬成像方法,特别适于无染色剂标记生物活细胞的定量相衬成像和实时动态监测,是目前国内外光学与生物医学交叉学科领域的研究热点。目前数字全息显微成像已经成功应用于活体细胞的形貌检测、生物学参数和生理状态分析等。发挥数字全息可进行数值处理和自动聚焦的灵活优势,可对快速变化和离焦样品进行实时清晰成像,已经将数字全息推广应用到药效反应、细胞动力学分析等领域,它所提供的定量生物信息可为生物医学研究提供更加丰富的基础数据,有利于发现新的生物现象,推动和辅助药物筛选和临床诊断的快速发展。然而,当前数字全息显微技术仍然面临许多具有挑战性的科学问题,如成像分辨率受限、折射率与厚度信息的解耦问题等,这些问题的解决将使数字全息显微技术更具实用性,将大力推动其在生物医学和生命科学等领域的应用。

## 参 考 文 献

- 1 L J Kricka, P Fortina. Analytical ancestry: "firsts" in fluorescent labeling of nucleosides, nucleotides, and nucleic acids [J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 670-683.
- 2 C G Rylander, D P Davé, T Akkin, *et al.*. Quantitative phase-contrast imaging of cells with phase-sensitive optical coherence microscopy[J]. *Opt Lett*, 2004, 29(13): 1509-1511.
- 3 S Yoshida, S Tanaka, M Hirata, *et al.*. Optical biopsy of GI

- lesions by reflectance-type laser-scanning confocal microscopy [J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2007, 66(1): 144-149.
- 4 T Ikeda, G Popescu, R R Dasari, *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems [J]. *Opt Lett*, 2005, 30(10): 1165-1168.
- 5 N Lue, W Choi, G Popescu, *et al.*. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy[J]. *Appl Opt*, 2007, 46(10): 1836-1842.
- 6 P J Rodrigo, D Palima, J Glückstad. Accurate quantitative phase imaging using generalized phase contrast[J]. *Opt Express*, 2008, 16(4): 2740-2751.
- 7 G Popescu, T Ikeda, R R Dasari, *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Opt Lett*, 2009, 31(6): 775-777.
- 8 R Liu, D K Dey, D Boss, *et al.*. Recognition and classification of red blood cells using digital holographic microscopy and data clustering with discriminant analysis[J]. *J Opt Soc Am A*, 2011, 28(6): 1204-1210.
- 9 Li Guangyong, Yang Yan. Digital holography particle image velocimetry applied for measurement of the rotating flow fields [J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(6): 0609001.  
李光勇, 杨 岩. 数字全息粒子图像测速技术应用于旋转流场测量的研究[J]. *中国激光*, 2012, 39(6): 0609001.
- 10 T Colomb, E Cuhe, F Charriere, *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.
- 11 Wang Yujia, Jiang Zhuqing, Gao Zhirui, *et al.*. Investigation on phase unwrapping in digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(10): 1009001.  
王羽佳, 江竹青, 高志瑞, 等. 双波长数字全息相位解包裹方法研究[J]. *光学学报*, 2012, 32(10): 1009001.
- 12 J Di, J Zhao, W Sun, *et al.*. Phase aberration compensation of digital holographic microscopy based on least squares surface fitting[J]. *Opt Commun*, 2009, 282(19): 3873-3877.
- 13 T Colomb, J Kuhn, F Charriere, *et al.*. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram[J]. *Opt Express*, 2006, 14(10): 4300-4306.
- 14 K Dev, V R Singh, A Asundi. Full-field phase modulation characterization of liquid-crystal spatial light modulator using digital holography[J]. *Appl Opt*, 2011, 50(11): 1593-1600.
- 15 A Khmaladze, M K Kim, C M Lo. Phase imaging of cells by simultaneous dual-wavelength reflection digital holography[J]. *Opt Express*, 2008, 16(15): 10900-10911.
- 16 Zhao Jie. Study on Phase Contrast Imaging for Micro Object by Digital Holographic Microscopy[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2011. 50-60.  
赵 洁. 微结构相衬成像的数字全息方法研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2011. 50-60.
- 17 B Rappaz, P Marquet, E Cuhe. 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.
- 18 A Khmaladze, R L Matz, T Epstein, *et al.*. Cell volume changes during apoptosis monitored in real time using digital holographic microscopy[J]. *J Struct Biol*, 2012, 178(3): 270-278.
- 19 C Liu, D Wang, Y Zhang. Comparison and verification of numerical reconstruction methods in digital holography[J]. *Opt Eng*, 2009, 48(10): 105802.
- 20 U Schnar, W Jüptner. Digital recording and numerical reconstruction of holograms[J]. *Meas Sci & Technol*, 2002, 13(9): R85-R101.
- 21 I Yamaguchi, T Zhang. Phase-shifting digital holography[J]. *Opt Lett*, 1997, 22(16): 1268-1270.

- 22 T Latychevskaia, H W Fink. Solution to the twin image problem in holography[J]. *Phys Rev Lett*, 2007, 98(23): 233901.
- 23 G Koren, F Polack, D Joyeux. Iterative algorithms for twin-image elimination in in-line holography using finite-support constraints[J]. *J Opt Soc Am A*, 1993, 10(3): 423-433.
- 24 W Qu, Y Yu, C O Choo, *et al.*. Digital holographic microscopy with physical phase compensation[J]. *Opt Lett*, 2009, 34(8): 1276-1278.
- 25 E Sanchez-Ortiga, P Ferraro, M Martinez-Corral, *et al.*. Digital holographic microscopy with pure-optical spherical phase compensation[J]. *J Opt Soc Am A*, 2011, 28(7): 1410-1417.
- 26 D C Ghiglia, M D Pritt. Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms, and Software[M]. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- 27 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.
- 28 B Kemper, G Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection [J]. *Appl Opt*, 2008, 47(4): A52-A61.
- 29 P Marquet, B Rappaz, P J Magistretti. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy[J]. *Opt Lett*, 2005, 30(5): 468-470.
- 30 B Rappaz, A. Barbul, Y Emery, *et al.*. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer[J]. *Cytometry Part A*, 2008, 73A(10): 895-903.
- 31 I Bernhardt, L Ivanova, P Langehanenberg, *et al.*. Application of digital holographic microscopy to investigate the sedimentation of intact red blood cells and their interaction with artificial surfaces[J]. *Bioelectrochemistry*, 2008, 73(2): 92-96.
- 32 C J Mann, L F Yu, C M Lo, *et al.*. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography [J]. *Opt Express*, 2005, 13(22): 8693-8698.
- 33 Ma Lihong, Wang Hui, Jin Hongzhen, *et al.*. Experimental study on quantitative phase imaging by digital holographic microscopy[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(3): 0309002.  
马利红, 王 辉, 金洪震, 等. 数字全息显微定量相位成像的实验研究[J]. *中国激光*, 2012, 39(3): 0309002.
- 34 Ouyang Liting, Wang Dayong, Zhao Jie, *et al.*. Experimental study on the phase-contrast imaging of the living hippocampal neuron cells by digital holographic microscopy [J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(9): 0909001.  
欧阳丽婷, 王大勇, 赵 洁, 等. 老鼠大脑海马区神经元活细胞的数字全息相衬成像实验研究[J]. *中国激光*, 2013, 40(9): 0909001.
- 35 W S Haddad, D Cullen, J C Solem, *et al.*. Fourier-transform holographic microscope[J]. *Appl Opt*, 1992, 31(24): 4973-4978.
- 36 Wang Yunxin, Wang Dayong, Zhao Jie, *et al.*. Non-invasive monitoring of living cell culture by lensless digital holography imaging[J]. *Chin Opt Lett*, 2011, 9(3): 030901.
- 37 J P Ryle, K M Molony, S McDonnell, *et al.*. Multispectral lensless digital holographic microscope; imaging MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell cultures [C]. *SPIE*, 2009, 7442: 744206.
- 38 F Zhang, G Pedurini, W Osten. Aberration free reconstruction algorithm for high numerical aperture digital hologram [C]. *SPIE*, 2006, 6188: 618814.
- 39 A E Desjardins, B J Vakoc, G J Tearney, *et al.*. Speckle reduction in OCT using massively-parallel detection and frequency-domain ranging [J]. *Opt Express*, 2006 14(11): 4736-4745.
- 40 F Dubois, C Yourassowsky, O Monnom, *et al.*. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration[J]. *J Biomed Opt*, 2006, 11(5): 054032.
- 41 Fan Qi, Zhao Jianlin, Xiang Qiang, *et al.*. Methods of improving resolution of digital holographic microscopy[J]. *J Optoelectronics • Laser*, 2005, 16(2): 226-230.  
范 琦, 赵建林, 向 强, 等. 改善数字全息显微术分辨率的几种方法[J]. *光电子 • 激光*, 2005, 16(2): 226-230.
- 42 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.
- 43 Wang Huaying, Guo Zhongjia, Zhang Zhihui, *et al.*. Image-plane digital holography for quantitative imaging of cells of Chinese medicine detection pieces[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(2): 0209002.  
王华英, 郭中甲, 张志会, 等. 基于像面数字全息术的中药饮片细胞定量成像技术研究 [J]. *中国激光*, 2012, 39(2): 0209002.
- 44 Liu Feifei, Liao Wei, Huang Min, *et al.*. Morphological image of chinese herbal medicine cell by digital image-plane holographic microscopy with spherical reference wave [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(2): 020904.  
刘飞飞, 廖 微, 黄 敏, 等. 球面参考光像面数字全息显微术及对中药饮片细胞形貌的表征[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(2): 020904.
- 45 I Moon, B Javidi. Three-dimensional identification of stem cells by computational holographic imaging[J]. *J R Soc Interface*, 2007, 4(13): 305-313.
- 46 I Moon, B Javidi. 3-D visualization and identification of biological microorganisms using partially temporal incoherent light in-line computational holographic imaging [J]. *IEEE Trans Med Imaging*, 2008, 27(12): 1782-1790.
- 47 D Boss, J Kuehn, C Depeursinge, *et al.*. Dual-wavelength digital holography for quantification of cell volume and integral refractive index (RI)[C]. *SPIE*, 2011, 8086: 808608.
- 48 B Rappaz, F Charrière, C Depeursinge. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium[J]. *Opt Lett*, 2008, 33(7): 744-746.
- 49 F Charriere, A Mariani, F Montfort, *et al.*. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(2): 178-180.
- 50 F Charriere, N Pavillon, T Colomb, *et al.*. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba[J]. *Opt Express*, 2006, 14(16): 7005-7013.
- 51 N Lue, G Popescu. Live cell refractometry using microfluidic devices[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(18): 2759-2761.
- 52 Wang Kunren, Xue Shaobai, Liu Huitu. *Cell Biology* [M]. Beijing: Beijing Normal University Press, 2001.  
汪堃仁, 薛绍白, 柳慧图. *细胞生物学* [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2001.
- 53 K Alm, H Cirenajwis, L Gisselsson, *et al.*. Holography, Reaserch and Technologies[M]. In *Tech*, 2011. 238-252.
- 54 K J Chalut, A E Ekpenyong, W L Warren Clegg, *et al.*. Quantifying cellular differentiation by physical phenotype using digital holographic microscopy[J]. *Integr Biol*, 2012, 4(3): 280-284.
- 55 B Rappaz, E Cano, T Colomb, *et al.*. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy [J]. *J Biomed Opt*, 2009, 14(3): 034049.
- 56 B Rappaz, A Barbul, A Hoffmann, *et al.*. Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic



- microscopy[J]. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2009, 42(3): 228–232.
- 57 F Pan, S Liu, Z Wang. Digital holographic microscopy long-term and real-time monitoring of cell division and changes under simulated zero gravity[J]. *Opt Express*, 2012, 20(10): 11496–11505.
- 58 B Kemper, A Bauwens, A Vollmer, *et al.*. Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy [J]. *J Biomed Opt*, 2010, 15(3): 036009.
- 59 N Pavillon, J Kühn, P Jourdain, *et al.*. Cell death and ionic regulation detection with digital holographic microscopy [C]. *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*, Optical Society of America, 2011.
- 60 B Kemper, D D Carl, J Schnekenburger, *et al.*. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy[J]. *Biomed Opt*, 2006, 11(3): 034005.
- 61 Y Wang, Y Yang, D Wang, *et al.*. Morphological measurement of living cells in methanol with digital holographic microscopy[J]. *Computational and Mathematical Method in Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/715843.
- 62 N Pavillon, J Kühn, C Morata, *et al.*. Early cell death detection with digital holographic microscopy[J]. *Plos One*, 2012, 7(1): e30912.
- 63 Pan Feng, Xiao Wen, Liu Shuo. Digital holographic microscopy for long-term quantitative phase-contrast imaging of living cells [J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(5): 0509001.  
潘锋, 肖文, 刘烁. 一种适用于长期定量观察生物活细胞的数字全息显微方法[J]. *中国激光*, 2011, 38(5): 0509001.
- 64 H Sun, B Song, H Dong, *et al.*. Visualization of fast-moving cells in vivo using digital holographic video microscopy [J]. *J Biomed Opt*, 2008, 13(1): 014007.
- 65 P Langehanenberg, L Ivanova, I Bernhardt, *et al.*. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy[J]. *J Biomed Opt*, 2009, 14(1): 014018.
- 66 D Tseng, O Mudanyali, C Oztoprak, *et al.*. Lensfree microscopy on a cellphone[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(14): 1787–1792.
- 67 A P Mosk, A Lagendijk, G Leroosey, *et al.*. Controlling waves in space and time for imaging and focusing in complex media[J]. *Nat Photon*, 2012, 6(5): 283–292.
- 68 J Jang, J Lim, H Yu, *et al.*. Complex wavefront shaping for optimal depth-selective focusing in optical coherence tomography [J]. *Opt Express*, 2013, 21(3): 2890–2902.
- 69 G von Bally, B Kemper, D Carl, *et al.*. New methods for marker-free live cell and tumor analysis (MIKROSO) [M]. *Biophotonics: Visions for Better Health Care*, 2006. 301–359.
- 70 X Wang, W Sun, Y Cui, *et al.*. Complete presentation of the Gouy phase shift with the THz digital holography [J]. *Opt Express*, 2013, 21(2): 2337–2346.
- 71 X Gao, C Li, G Fang. Study of image reconstruction for terahertz indirect holography with quasi-optics receiver[J]. *Opt Express*, 2013, 30(6): 1291–1296.
- 72 J H Massig. Digital off-axis holography with a synthetic aperture [J]. *Opt Lett*, 2002, 27(24): 2179–2181.
- 73 C Yuan, H Zhai, H Liu. Angular multiplexing in pulsed digital holography for aperture synthesis[J]. *Opt Lett*, 2008, 33(20): 2356–2358.
- 74 C Liu, Z G Liu, F Bo, *et al.*. Super-resolution digital holographic imaging method[J]. *Appl Opt*, 2002, 41(17): 3143–3145.

栏目编辑: 何卓铭