

# 生物细胞定量相位测量与恢复方法研究进展

张璐<sup>1</sup>, 赵春晖<sup>1</sup>, 康森柏<sup>1</sup>, 赵宏<sup>1</sup>, 张春伟<sup>1</sup>, 袁莉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>西安交通大学机械学院, 陕西 西安 710049;

<sup>2</sup>西安交通大学第一附属医院检验科, 陕西 西安 710049

**摘要** 细胞定量相位测量与恢复方法采用免标记非干预式的检测手段, 实现静态及动态生物样本空间形态的定量重构, 为细胞动力学过程中复杂生物物理信息的可视化检测提供了实现条件。重点介绍同步相移式、数字全息式和流体聚焦式等新型动态生物细胞相位检测技术, 同时简要综述同轴干涉与离轴干涉式的传统静态细胞相位检测技术的发展。对各种方法的采样速率、成像分辨率、细胞检测精度等关键参数进行比较, 阐明不同测量方法适用的生物信息检测类型及应用领域, 同时介绍动态与静态细胞相位检测中对应各类相位恢复方法的特点与发展。

**关键词** 医用光学; 生物技术; 细胞检测; 定量相位测量; 相位恢复

中图分类号 O438

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207009

## Progress on Methods of Quantitative Phase Measurement and Retrieval for Biological Cells

Zhang Lu<sup>1</sup>, Zhao Chunhui<sup>1</sup>, Kang Senbai<sup>1</sup>, Zhao Hong<sup>1</sup>, Zhang Chunwei<sup>1</sup>, Yuan Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

<sup>2</sup>Clinical Lab, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

**Abstract** The phase measurement methods for label-free cells, as non-invasive methods, are applied to realizing the quantitative reconstruction for spatial morphologies of static and dynamic biological samples. It can provide implementable conditions for visualizing complex biophysical information in the process of cell dynamic detection. The novel phase detection technologies for dynamic cells are mainly described, such as the synchronous phase shift methods, the digital holographic methods, and the methods for focused fluid. The traditional phase detection technologies for static cells are reviewed briefly. Then the key parameters of these technologies are compared, such as sampling rate, imaging resolution, and detection accuracy. Furthermore, we illustrate their application fields considering their various biological information detections. Finally, the basic principles, technical characteristics and recent developments for various phase retrieval technologies are analyzed and summarized.

**Key words** medical optics; biotechnology; cell detection; quantitative phase measurement; phase retrieval

**OCIS codes** 170.0180; 060.5060; 100.5070

## 1 引 言

作为有机体构成及生命活动的基本单位, 细胞一直以来都是生物学界和医学界关注的热点。细胞的大小、形态等结构特征与其功能及活动特性具有密切关系。为深入揭示复杂的生物学过程, 细胞成像技术已发展成为一项重要的检测手段。目前, 常

用的细胞检测方法需要结合标记技术, 虽然该类技术通过标记特异性的靶向特征, 可实现较高的精度与灵敏度, 但都属于接触性、破坏性的检测方法, 会损害细胞生理特征, 甚至灭除细胞活性, 因此不利于活体细胞的跟踪监测。针对细胞标记检测技术的诸多不足, 近年来国内外学者提出了免标记细胞检测技术。该技术无需对细胞进行任何预处理, 采用散

收稿日期: 2017-09-15; 收到修改稿日期: 2017-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(61405155)、中国博士后科学基金(2016M602807)

作者简介: 张璐(1981—), 女, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事生物光学检测方面的研究。

E-mail: gingerluzhang@mail.xjtu.edu.cn

射光学等方法实现细胞的识别与分选,不但避免了标记技术中荧光探针固有的局限性(光毒性、光漂白),而且最大限度地维持了细胞的正常生理特征与其所需的适宜环境。非干预式免标记细胞检测方法研究已成为目前细胞检测领域的重要研究方向。

通常,典型的哺乳类动物细胞为透明体,对光的吸收或散射率低,所以透过细胞的光不会发生明显的波长和振幅变化;然而细胞厚度或胞内折射率的差异却会使透射光产生相位变化,该变化与细胞的大小、形态及结构等特征紧密相关。若将细胞看作相位物体,通过反演相位即可恢复其形态等特征,从而达到细胞空间成像的效果,该类方法被称为生物细胞免标记相位检测技术,可分为定性和定量2类:定性的相位检测通过对细胞成像,继而对其特征进行定性分析;定量的相位检测能够量化地表征细胞光学相位变化与其生物特征之间的关系。根据待测细胞的运动状态,相位检测又可分为动态细胞相位检测和静态细胞相位检测。根据细胞运动状态,动态细胞相位检测又可分为细胞生长过程中的相位检测(即忽略细胞的移动速度),以及细胞移动过程中的相位检测(即忽略细胞的生长变化)。静态细胞相位检测不考虑细胞的生长与移动状态,仅对特定时刻下细胞的相位特征进行测量。

自1932年以来,免标记细胞相位检测方法已从定性相位检测逐渐发展为定量相位检测<sup>[1-2]</sup>。虽然传统的定量相位显微技术不受生物、化学染料或基因改变的影响,能够非侵入、无损地实现细胞形态结构的成像,但大部分只是实现了对活细胞的静态成像。针对功能层面的细胞动力学过程,如细胞增殖、死亡、胞内传输和细胞运动等的相位检测,已成为目前重要的发展趋势。自2012年以来,在原有的静态细胞定量相位检测方法基础上,出现了多种动态细胞定量相位检测新技术。本文以定量相位检测技术的发展为主体,重点介绍近几年(尤其是近5年)出现的动态生物细胞相位检测新技术,以及其相应的相位恢复算法,同时简要综述几类传统静态细胞相位检测技术与相位恢复方法的新进展。

## 2 动态生物细胞相位检测技术

定量相位测量技术主要采用光学干涉原理,将显微成像系统下的样品相位采用光强调制方法记录下来,即相位显微成像,然后从所采集的图像中反演计算出细胞的相位信息,即相位恢复。对动态细胞

的相位进行快速成像是实现定量相位检测的基础。动态细胞快速成像能否成功主要取决于2个因素,即干涉图像的采集速率和相位恢复速率。针对这2个关键因素,结合生物检测的特定需求,近年来出现了多种新型检测方法。在生物检测中,生物信号的变化具有极强的时效性,这对传统的分时相移干涉检测技术提出了巨大的挑战。同步相移干涉定量相位显微成像技术正是为了迎合这一需求而提出的。该技术将传统的分时相移采集转换为同步单次采集多步相移,通过显微成像方法实现细胞相位的定量检测。在同步相移干涉测量基础上,又发展出了单次采集单幅干涉图的离轴干涉数字全息定量相位显微成像技术,采用单幅干涉图实现了多步相移的功能。随着器件的集成化与小型化,结合微流控技术和流体聚焦技术,发展出针对流动状态下高通量细胞的显微相位检测方法。虽然各种显微成像技术已广泛地应用于生物特征检测,然而显微技术中的视场受限问题依然存在。考虑到生物体的透明性、折射率差异等特点,一些全新的显微成像技术相继被提出。

### 2.1 动态生物细胞相位显微成像

#### 2.1.1 动态同步相移干涉定量相位显微成像

传统的干涉定量相位显微成像需要分多次采集多幅相移干涉图,然而同步相移干涉定量相位显微成像技术可以一次同步采集多幅相移干涉图,极大地提高了干涉图像的采集速率。

墨西哥图兰辛戈大学 Toto 教授研究团队,基于剪切干涉的定量相位显微成像技术,实现了对多幅相移干涉图的同步采集。2015年,该团队首先采用偏振耦合横向剪切干涉测量法实现了同步相移的干涉测量<sup>[3]</sup>,光路如图1(a)所示。其中,偏振相移圆剪切干涉仪(CSI)生成一幅剪切图,经 $1/4$ 波片将2束偏振方向互相垂直的线偏振光变为旋向相反的圆偏振光后,消偏振分光棱镜使振动方向相同的光发生干涉,再用单CCD相机同时获得2幅相位差为 $\pi/2$ 的干涉图。该系统参考光路与物光路为共程光路,因此具有较高的稳定性,不易受空气扰动、环境震动等因素的影响,而且所用光学器件较少,一次即可获得2幅相移干涉图。为了减小相位恢复的误差,2015~2017年,该研究团队在原有光路基础上又增加了2个迈克耳孙干涉系统[图1(b)]<sup>[4-5]</sup>,采用单CMOS摄像机捕获同步产生的4幅相移干涉图。目前,该系统已成功实现对活体红细胞,以及微结构变形等的形态

检测。此类同步相移干涉测量技术,不仅可以保证在受到环境等因素干扰下的测量精确度,而且

推进了生物细胞相位测量技术由静态向动态的发展进程。

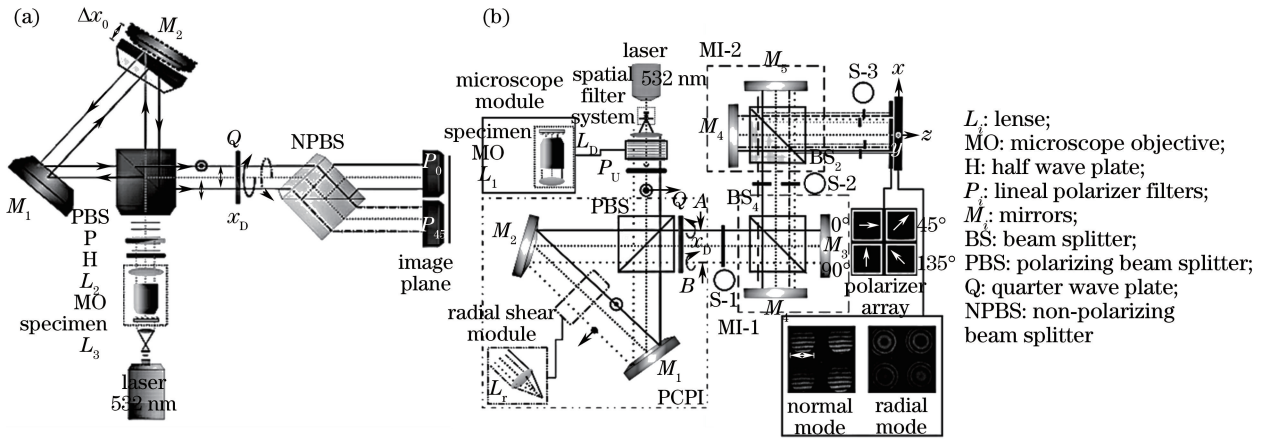


图 1 同步相移剪切干涉光路示意图<sup>[3-4]</sup>

Fig. 1 Experimental setup of simultaneous phase shift shear interference<sup>[3-4]</sup>

美国伊利诺伊大学的 Cintora 等<sup>[6]</sup>于 2017 年提出一种空间光干涉显微(SLIM)与相关色散光谱分析法(DPS)相结合的定量相位测量技术。该技术利用空间光干涉显微装置同时实现 4 步相移,并采用相位对比显微镜定量地对相位结果进行成像。该方法已成功应用于不同神经细胞层密度对神经元细胞生长速率和细胞运输影响的相关研究中。此方法的独特之处在于利用相关色散光谱进行分析,为单细胞运动传输过程的研究提供了必要的检测手段。该类方法具有全景视野、长期成像(29.7 h)和高通量处理细胞的能力,现已广泛应用于神经生物学研究之中。美国伊利诺伊大学的 Kandel 等<sup>[7]</sup>也致力于此类技术的研究,但他们将数据分析方法扩展至 3 个维度空间,在三维范围内进行细胞运输研究,从而实现了细胞水平和垂直流量的双通道分析。

在我国,北京理工大学的王霞教授团队于 2015 年也提出了一种基于同步相移干涉的活体细胞高度测量方法<sup>[8-9]</sup>。该方法采用马赫-曾德尔干涉系统,通过一个固定在 CCD 上的偏振序列,在 CCD 靶面上同时呈现 4 幅空间位置相互分离的相移图片,再通过传统的相位提取和解包裹方法获得样品的形态分布。为获得样品的高度信息,该方法采用正入射和斜入射 2 种光束进行试验。该方法不仅节省图像采集时间,避免了原系统的相移误差和延时误差,而且双角度入射方式能够在细胞折射率未知的前提下测量细胞的高度值,具有较高的测量精度。然而,该方法仅适用于对单个活细胞的研究,不宜处理密集细胞群内的单个细胞。

### 2.1.2 动态离轴干涉数字全息定量相位显微成像

离轴干涉数字全息定量相位显微成像方法的独特之处在于,仅需单次采集单幅干涉图便可实现对动态生物细胞的相位成像。目前该类方法有 2 种光学系统:1)4f 成像系统;2)迈克耳孙或马赫-曾德尔干涉系统。

在采用 4f 光学系统的离轴干涉数字全息显微成像研究中,2017 年美国麻省理工大学激光生物医学研究中心的 Jin 等<sup>[10]</sup>提出了一种基于线聚焦光束照明的干涉定量相位测量技术,利用沿 x-y 方向平移的位移台对贴壁细胞进行成像,工作原理如图 2(a)所示。图中,氦氖激光器发出的激光经分束器分为参考光和物光,物光束通过样品后经过一个 4f 成像系统成像在 CCD 上,采用离轴干涉数字全息方法,仅采集一幅干涉图即可获得待测样品的频谱和相位。该技术采样频率高,可实现统计性的生物检测。在 13 min 内对 10<sup>4</sup> 个海拉细胞进行实验,获得了所有细胞的相位信息,并同时 8000 个相位图转换为细胞的干质量图,计算得到其投影面积、球度等其他形态特征信息。美国哈佛医学院的 Guo 等<sup>[11]</sup>于 2017 年采用离轴干涉数字全息成像技术,实验对比了一组血管生成和非血管生成的人骨肉瘤细胞(KHOS)的基本细胞行为,成功发现了血管生成的 KHOS 细胞(KHOS-a)和非血管增生的细胞(KHOS-n)在运动速度、细胞面积、平均细胞体积、细胞增殖率和细胞周期等方面的差异。数字全息成像的定量相位测量技术由于测量系统简单、测量速度快,有助于持续、有效、非侵入性地实现对不同表型细胞行为特征的检测。

基于马赫-曾德尔干涉和迈克耳孙干涉系统的数字全息显微技术近年来也得到了广泛应用,并在生物研究应用方面取得显著成果。

在活性肿瘤细胞与正常细胞评估方面,2017年,以色列特拉维夫大学的 Roitshtain 等<sup>[12]</sup>提出基于马赫-曾德尔干涉系统的低相干离轴干涉相位测量显微系统,如图 2(b)所示。该系统允许单曝光获取模式,适用于流动细胞定量三维形态与纹理成像。采用此方法,该团队评估了活性肿瘤细胞和正常细胞的 15 个生物物理参数,对健康细胞、癌细胞、转移性癌细胞进行分选,分选精确度可达 81%~99%,初步展现了动态生物细胞定量相位成像技术在临床诊断方面的巨大潜力。

在细胞增殖过程与培养监测研究方面,瑞典的 Janicke 等<sup>[13]</sup>于 2017 年采用基于马赫-曾德尔离轴干涉的数字全息显微技术对细胞增殖过程进行研究,其原理如图 2(c)所示。该技术对多孔板上的大量细胞样品进行持续 36 h 的测量,实时获得细胞数量、细胞融合和平均细胞体积等相关数据。相比单参数细胞增殖分析的传统化学计量法,该技术可以通过测得的多类参数深入研究细胞增殖过程。美国波士顿东北大学的 Luther 等<sup>[14]</sup>采用该类技术实现了细胞的四维(生物物理特性、 $x$ - $y$ 位置和时间)相位全息延时成像。该技术不仅可

以实时监测细胞培养,并且能够免标记追踪罕见细胞,并捕捉细胞的动态变化,同时,可对 2~3 d 的细胞动态行为持续成像,更加精确地检测与细胞周期相关的毒理学效应。德国穆恩斯特大学生物医学技术中心的 Kastl 等<sup>[15]</sup>于 2017 年采用迈克耳孙干涉原理的数字全息显微技术,对细胞培养的质量进行研究,原理如图 2(d)所示。自相干光经数字离轴全息后得到携带样品信息的干涉图,经图像处理获得细胞的体积、折射率和干质量。该方法在折射率测量中的不确定度仅为  $10^{-3}$ ,在平均细胞体积测量方面的灵敏度可达几十微米,证明该类技术可快速、精确地对细胞培养质量进行实时监测,并提供完整的生物物理数据。

在与疾病相关的细胞特征研究方面,韩国先进科学技术研究所 Yang 等<sup>[16]</sup>等提出基于马赫-曾德尔干涉系统的光学衍射层析全息扫描技术,实现了对由药物引起的帕金森疾病细胞模型的分析,实验装置如图 2(e)所示。该系统通过改变照明角度来获得多幅全息图,成功重建了神经元细胞的三维图像,定量研究了体外帕金森疾病细胞的形态和生物物理变化。采用该检测方法,研究人员发现了早期帕金森疾病进展中神经元细胞的凋亡特征。该方法为各种神经退行性疾病的病理生理学定量研究提供了新的检测手段。

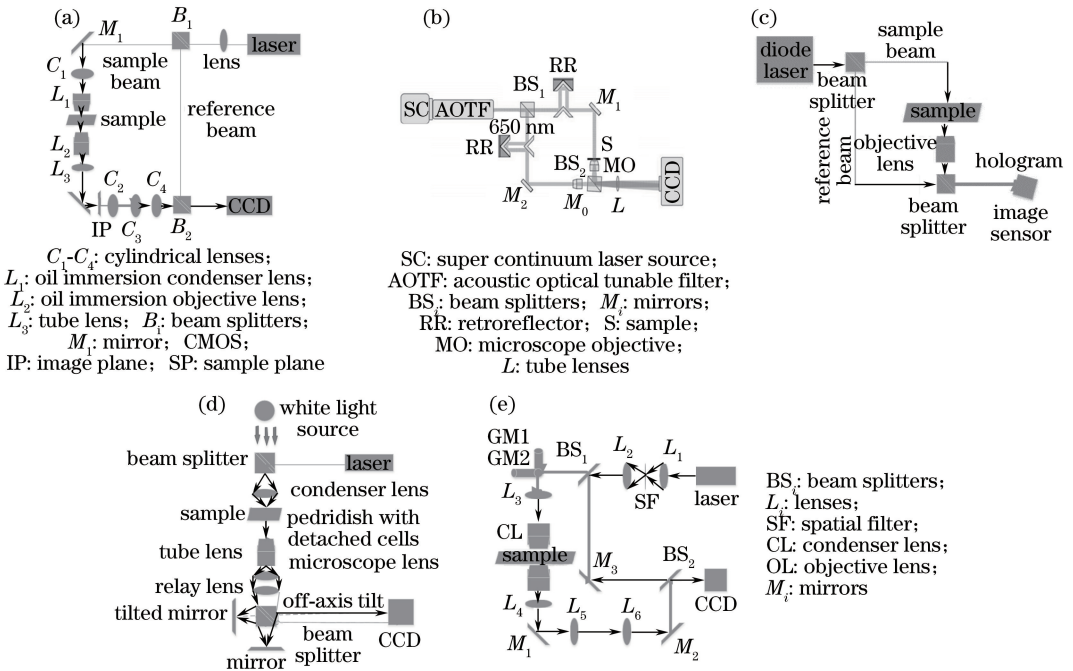


图 2 离轴数字全息光路示意图。(a)文献[10];(b)文献[12];(c)文献[13];(d)文献[15];(e)文献[16]

Fig. 2 Schematic of off-axis digital holographic.

(a) Ref. [10]; (b) Ref. [12]; (c) Ref. [13]; (d) Ref. [15]; (e) Ref. [16]

我国的诸多研究团队也在离轴式干涉数字全息定量显微成像方面进行了深入研究。北京工业大学的王大勇教授团队于2012年研究了预放大(光路中加入显微物镜先对样品进行放大)离轴菲涅耳数字全息光纤耦合倒置式数字全息显微系统,可实现对活细胞的显微成像,该系统用球面参考光代替通常所用的平面参考光,对相位畸变进行实时校正,测量精确度得到显著提高<sup>[17-18]</sup>。北京航空航天大学潘锋等<sup>[19]</sup>和浙江师范大学马利红等<sup>[20]</sup>基于预放大离轴全息原理,设计了可长期观察细胞的检测光路,分别实现了对造骨细胞分裂过程形态变化与草履虫的动态变化观测。

### 2.1.3 基于流体聚焦技术的细胞显微成像

流式细胞仪是根据细胞前向、侧向散射信号,以及激发荧光信号实现细胞计数与分类等,测量速度可达每秒100000个,广泛应用于免疫生物学、基因组学、临床医学等领域。然而,细胞样本的荧光标记处理存在光毒性等问题,同时,测量过程中细胞碎片和细胞团的存在易造成假阳性测量结果的出现。为了解决上述问题,激光扫描细胞计数仪(LSC)被提出并不断发展<sup>[21-25]</sup>,此方法可实现三维成像和突破衍射极限的细胞结构超分辨检测;然而仅适用于复杂粘连细胞团的生物特性研究,测量时间较长(约数分钟)<sup>[26]</sup>。为了满足高处理量的显微成像,一种平行的微流道细胞计数仪(PMC)被提出<sup>[27-28]</sup>。然而,在流体聚焦高流速状态下,由于快门响应速度有限,造成高通量细胞成像模糊,只能以一维的空间分辨率来呈现亚细胞级的生物结构。为了突破临床统计学研究所需的高通量细胞采集与细胞成像分辨率双向要求的瓶颈,2007~2016年间,在上述细胞仪的基础上出现了成像式流式细胞仪(IFC)<sup>[29-30]</sup>。成像式流式细胞仪分为采用CCD或CMOS成像器件和采用光电倍增管或雪崩二极管等检测器件的2类系统,可以实现流体聚焦状态下样品的逐一检测,采样速率约为每秒2000个细胞。该系统结合传统流式细胞仪高处理量和荧光显微镜高分辨率的优势,有效降低了传统流式细胞仪测量中由于细胞碎片和细胞团的存在造成的测量结果假阳性概率<sup>[31-34]</sup>,逐渐发展成为分析单个细胞形态特征的有效手段。

2012年,美国哈佛大学的Schonbrun等<sup>[35]</sup>提出一种多视场成像流式细胞仪(MIFC),通过在CMOS相机上投影多个视场实现了高处理量和曝光时间之间的平衡。但是,由于系统中存在衍射透镜,容易造成视场畸变,从而产生像差,限制了

该类方法的应用。日本东京大学的Goda等<sup>[36-38]</sup>于2009~2012年间提出基于流体聚焦技术与相位检测技术相结合的连续时间编码的显微放大(STEAM)测量系统。该系统通过产生超快的宽带激光脉冲,采用分散器将不同频率的光束在空间上分开,使细胞能同时被不同频率的光照明,从而实现了以光速快门的成像方法。在此系统的基础上,2016~2017年,美国加利福尼亚大学Chen等<sup>[39]</sup>、日本东京大学Jiang等<sup>[40]</sup>,以及中国香港大学<sup>[41]</sup>均提出了各种OTSM测量系统。此类系统可实现高通量免标记细胞的三维测量,细胞采样速率与传统流式细胞仪相当。面对高通量的测量结果,该类方法结合人工智能、支持向量机等机器学习方法<sup>[42-43]</sup>,提取免标记结果中定量的光学相位与光强图像特征,反演出单个细胞的多维生物物理信息,实现了高通量、免标记细胞的精准检测与分类。

2017年,日本东京大学的Guo等<sup>[44]</sup>结合迈克耳孙干涉原理与流体聚焦技术实现了动态细胞的定量相位成像,系统原理如图3所示。信号光路上的衍射光栅使光束形成不同频率的脉冲光束,称为彩虹脉冲光束,该脉冲光束分别通过信号光路和参考光路后,形成一幅时间干涉图,经过数字图像解调处理,分析干涉图样中细胞相位的相关信息,进而获得微通道内细胞的不同生物形态等特征。该技术的成像速度为每秒10000个细胞,应用于氮元素缺乏的微藻细胞分选,分选错误率仅为2.15%。

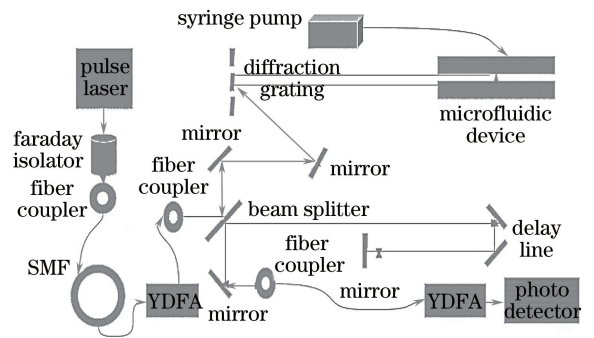


图3 基于流体聚焦技术的光路示意图<sup>[44]</sup>

Fig. 3 Experimental setup of optofluidic time-stretch quantitative phase microscope<sup>[44]</sup>

### 2.1.4 其他新型细胞显微成像技术

虽然采用经典光学方法对生物样品进行显微成像已经历了长足的发展,但解决经典光学成像方法中的视场受限问题依然是一个具有突破性意义的研究方向。针对视场受限问题,无透镜显微成像技

术<sup>[45-46]</sup>逐渐兴起。其视场的宽度和深度适于对有一定体积的样品进行三维路径跟踪监测,可用于大量生物样品的高精度检测。南京理工大学的薛亮<sup>[47]</sup>提出一种无透镜全息显微成像系统,全息分辨率可以达到  $4\ \mu\text{m}$ 。江苏大学的陈映洲等<sup>[48]</sup>提出一种免显微物镜的共光路相位显微成像方法,装置示意图如图 4(a)所示。利用共光路系统稳定性强的特点,用反射镜将光束一分为二,然后重叠产生共光路干涉,采用光束几何放大原理,无需加载显微物镜即可实现干涉图像放大,同时通过调节反射镜的角度,实现同轴、离轴和轻微离轴相位显微成像。该系统结构简单、成本低廉、实验操作方便,适用于细胞等一般相位体的相位显微成像,为新型相位成像技术的开发提供了良好的理论依据和实验基础。法国格勒诺贝尔大学 Allier 等<sup>[49]</sup>于 2017 年提出了一种多波长免透镜成像显微技术,装置如图 4(b)所示。该技术利用可分离出红色、绿色和蓝色光束的 LED 照明装置,然后用一个紧贴样品的 CMOS 传感器捕捉全息图,采用全息重构算法得到待测相位图像。该技

术可以快速有效地重建密集细胞(最多可达  $700\ \text{mm}^{-2}$ )的形态和大小,并能持续数天高通量地监测单个细胞的形态、干质量、有丝分裂和生长特性,已应用于间叶细胞、内皮细胞和上皮细胞的相关测量。

意大利的 Merola 等<sup>[50]</sup>于 2017 年提出一个全新的研究思路:认为红细胞内充满了均匀的液体,可等效为一种光学透镜,具有光学聚焦特性,采用如图 4(c)所示的装置,结合数字全息(DHM)和全息光镊(HOT)技术实现显微成像:一束光( $1064\ \text{nm}$ )通过空间光调制器作为参考光,另一束光( $532\ \text{nm}$ )通过红细胞样品作为物光,2 光束汇合后发生离轴干涉,采用相机记录离轴数字全息干涉图。该研究首次利用红细胞这种透镜效应,通过对产生变形透镜的完全成像,分析健康与病变红细胞的全息干涉波前差异,精确量化红细胞病变状态与畸形波前的相互关系,评估不同细胞的弹性和形状变化。该技术有助于检测与血液储存相关的病变,检索细胞年龄,评估储存血液的质量。

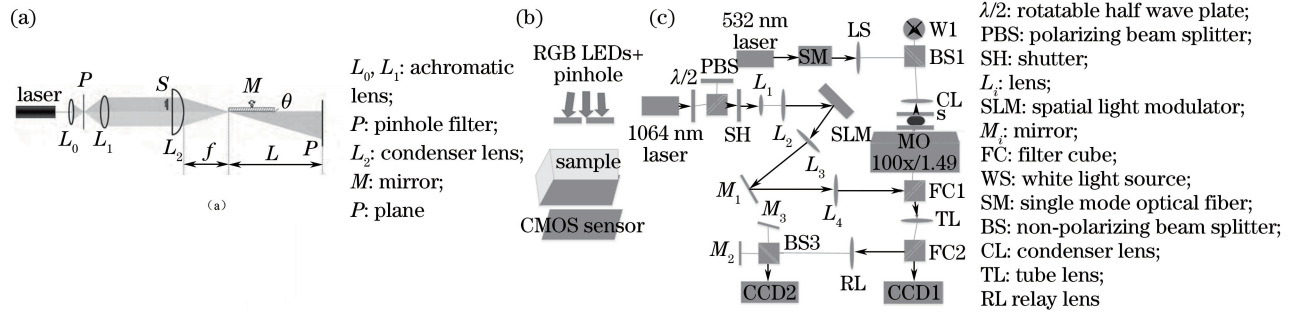


图 4 (a) 免显微透镜的共光路相位显微装置<sup>[48]</sup>; (b) 多波长免透镜成像显微装置<sup>[49]</sup>; (c) 数字全息与全息光镊相结合的光路示意图<sup>[50]</sup>

Fig. 4 (a) Experimental setup of phase microscopy imaging based on common-path without micro-objective<sup>[48]</sup>; (b) multi-wavelength lens-free video microscopy<sup>[49]</sup>; (c) schematic of the combined DHM and HOT workstation using holographic optical stretching and quantitative phase imaging of RBCs<sup>[50]</sup>

各种动态生物细胞相位测量技术的相关特征参数归纳如表 1 所示。

## 2.2 相位恢复方法

在动态细胞高速成像研究中,快速的相位恢复方法是另一项重要因素。在传统的多步相移技术中,相位恢复耗时较长,频域傅里叶变换和希尔伯特变换法虽然较之具有更高的相位获取速率,但经过多次积分变换容易累积误差。为更准确、更高效地恢复相位信息,近年来研究者提出了几种新的相位恢复方法。

2012 年,西班牙国家生物技术中心的 Vargas 等<sup>[51]</sup>提出基于格兰姆-施密特(GS)标准正交两步相

移解调相位恢复方法。由于任何相移干涉序列都可以用一个二维向量空间描述,且正交信号可以组成一个基本的干涉序列,因此首先滤除干涉图像的直流分量,将 2 幅相移干涉图分解成正交信号进行运算,即可恢复样品的相位分布。该方法运算简单、速度快,尤其适用于相位测量有时间限制的研究。在 GS 分析算法的基础上,华南师范大学的钟丽云教授团队于 2015 年提出一种基于施密特正交化两步相移算法的改进方法<sup>[52-53]</sup>。该方法不仅可以通过 2 幅干涉图准确地提取相移量,而且在恢复相位方面省去了一个向量的归一化过程,减少了计算量,在保持高精度的同时,提高了运算速度。

表 1 动态生物细胞相位测量技术

Table 1 Phase measurement methods for dynamic biological cells

Technology	Year	Sample	Phase shift	Digital holographic	Characteristic	Status of sample and application
Polarizing coupled interferometers	2015	Acetate sheet; red cells	✓			Dynamic
Spatial light interference microscopy	2017	Neuronal cells	✓			3D dynamic
Simultaneous phase-shift interference microscopy	2015		✓		Resolution: 0.4868 $\mu\text{m}$	Dynamic
Quantitative phase cytometry line-focused beam illumination	2017	Hela cells		✓	Imaging speed: 1000/13 $\text{min}^{-1}$ ; classification accuracy: 96.5%	Dynamic
Holographic imaging cytometry	2017	Human osteosarcoma cells		✓	Duration: 2 d	Dynamic
Low-coherence off-axis interference phase microscopy	2017	Melanoma cells; normal cells		✓	Classification accuracy: 81%-99%	3D dynamic
Digital holographic microscopy	2017	Hela cells		✓	Duration: 2-3 d	4D dynamic
Michelson interference-based self-interference phase microscopy	2017	Pancreatic		✓	Imaging speed: 1000/15 $\text{h}^{-1}$ ; duration: 1.5 h	Dynamic; cell culture quality
Digital holographic microscopy	2017	Jimt-1 cells; SK-MEL-5 cells		✓	Duration: 36 h	Dynamic; cell proliferation assays
Optical diffraction tomography	2017	Sh-SY5Y cells		✓		Dynamic; diagnosis for parkinson's disease
Digital holographic microscopy apparatus with pre-magnification	2012	Osteoblasts and bone cells, paramecia, red cells, cervical cancer cells		✓	Duration: 8 h	Dynamic
Laser scanning cytometer	1999	Cells	✓		Imaging speed: several hundreds of cells per second	Dynamic
Parallel microfluidic flow cytometer	2011	Cells	✓			Dynamic; diagnosis for protein-misfolding diseases
Microfabricated multiple field of view imaging flow cytometer	2012	Red blood cells, acute myeloid leukemia cells	✓		Imaging speed: 2000-20000 $\text{s}^{-1}$	Dynamic; cells morphology and characterized
Serial time encoded amplified microscopy	2012	White blood t-cells; colon cancer cells	✓		Imaging speed: 100000 $\text{s}^{-1}$ ; classification accuracy: 95.5%	Dynamic; early detection and diagnosis for blood diseases
Optofluidic time stretch microscopy	2017	Blood cells	✓		Imaging speed: 100000 $\text{s}^{-1}$ ; classification accuracy: 96.6%	Dynamic; therapeutic monitoring for thrombotic

Technology	Year	Sample	Phase shift	Digital holographic	Characteristic	Status of sample and application
Machine-learning optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy	2017	Microalgae cells	✓		Imaging speed; 10000 s <sup>-1</sup> ; classification accuracy; 97%	Dynamic
Common-path without micro-objective phase microscopy	2015	Blood cells	✓		Resolution; <4 μm	Dynamic
Multiwavelength lens-free video microscopy	2017	Mesenchymal, endothelial, epithelial cells		✓	Duration; several days	Dynamic; dense cells
Digital holographic microscopy	2017	Red cells		✓		Dynamic; early detection and diagnosis for blood diseases

为改善频域积分法累积误差的缺点, Bhaduri 等<sup>[54]</sup>提出离轴干涉条纹微分法。该方法仅需要对采集的干涉图样计算横向一阶偏导和二阶偏导便可实现相位恢复, 其数学原理如下。离轴干涉图样的灰度值为

$$I(x, y) = I_0(x, y) + \gamma(x, y) \cos[\varphi(x, y) + kx], \quad (1)$$

式中  $I_0(x, y)$  为背景光强,  $\gamma(x, y)$  为强度调制因子。对(1)式求横向一阶偏导:

$$I^{(1)}(x, y) = \frac{\partial I(x, y)}{\partial x} = \frac{\partial I_0(x, y)}{\partial x} + \frac{\partial \gamma(x, y)}{\partial x} + \cos[\varphi(x, y) + kx] + \gamma(x, y) \times \{-\sin[\varphi(x, y) + kx]\} \left[ \frac{\partial \varphi(x, y)}{\partial x} + k \right]. \quad (2)$$

在实验过程中, 背景光强和强度调制因子近似认为是常数, 只有样品相位会缓慢变化, 且其变化量远小于载波条纹相位  $kx$ 。则(2)式可简化为

$$I^{(1)} = -\gamma k \sin[\varphi(x, y) + kx], \quad (3)$$

对简化后的干涉强度求一阶偏导可得

$$I^{(2)} = -\gamma k^2 \cos[\varphi(x, y) + kx], \quad (4)$$

则样品相位为

$$\varphi(x, y) = \arctan \left[ \frac{kI^{(1)}}{I^{(2)}} \right] - kx. \quad (5)$$

该方法比传统傅里叶变换和希尔伯特积分变换法的处理速度快, 且避免了多次积分带来的误差, 可用于高速运动样品的测量。江苏大学王亚伟教授团队于 2013 年提出一种新型的微分相位恢复算法<sup>[55]</sup>: 将采集的干涉图样先经高通滤波器消除背景光强, 分离出干涉项  $I^{(0)} = \gamma \cos[\varphi(x, y) + kx]$ , 然后对其计算横向一阶偏导  $I^{(1)}$  和二阶偏导  $I^{(2)}$ , 得到

的相位结果可表示为

$$\varphi(x, y) = \begin{cases} \arctan \left\{ - \left[ - \frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right]^{1/2} \right\} - kx & [I^{(1)} \cdot I^{(2)} < 0] \\ \arctan \left\{ \left[ - \frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right]^{1/2} \right\} - kx & [I^{(1)} \cdot I^{(2)} \geq 0] \end{cases}. \quad (6)$$

该相位恢复方法速度较快, 可用于生物动态过程研究。

在相位恢复方法中, 最具挑战性的环节是将图像中密集的细胞精确分割成单个细胞, 从而准确恢复单个细胞的相位, 避免因计算无效区域相位耗费计算时间。俄罗斯爱达荷州大学的 Alanazi 等<sup>[56]</sup>于 2017 年提出一种创新性的相位恢复过程中的图像分割方法。该方法采用光学相位阈值模式的相关算法, 将入射光波的相位作为度量准则, 无须大量计算, 从而大大降低了处理要求, 提高了信噪比, 有助于实现单细胞级成像分辨率的要求。经酵母细胞和细菌实验证实, 该方法的分割成功率达 98% 以上。表 2 对比了各种相位恢复方法的特点。

### 3 传统静态生物细胞相位检测技术

#### 3.1 静态生物细胞相位显微成像

##### 3.1.1 静态同轴干涉相位显微成像

传统细胞相位测量技术主要针对静态生物样本进行定量相位检测, 常用方法为基于全息显微成像的测量方法, 以及干涉显微相移成像的测量方法。根据测量光路不同, 可分为静态同轴干涉相位显微成像和静态离轴干涉相位显微成像。同轴干涉是指物光和参考光在相同的传播方向上发生干涉。基于



表 2 相位恢复方法的特点  
Table 2 Characteristics of phase retrieval methods

Technology	Phase shift steps	One shot	Status of sample
Coaxial interference phase shift	$\geq 3$	×	Static
Phase extraction in wavelength tuning interferometry	$\geq 3$	×	Static
Off-axis interference phase shift	2	✓	Static
Fourier transform	1	✓	Static
Hilbert transform	1	✓	Static
Gram-Schmidt orthonormalization and improved	2	✓	Dynamic
Gram-Schmidt orthonormalization	1	✓	Dynamic
Interference fringe differentiation	$\geq 1$	✓	Dynamic
New image segmentation	$\geq 1$	✓	Dynamic

同轴干涉的传统生物细胞定量相位显微技术大部分是采用干涉显微相移成像方法记录样品的振幅信息和相位信息,纵向分辨率已达纳米量级,采样速率可达每秒帧十几帧,并且部分技术已实现细胞的全场三维成像。

美国 Popescu 等<sup>[57]</sup>于 2004 年提出傅里叶相位显微技术(FPM),该技术基于干涉显微相移成像方法,通过分时 4 步相移采集 4 幅干涉图,处理得被测样品的相位图,但其采样速率仅为  $4 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 。为提高采样速率,该团队于 2007 年提出了改进的快速傅里叶相位显微技术(f-FPM)<sup>[58]</sup>,该技术同样基于干涉显微相移成像方法,但采用帧频高达千兆赫兹的液晶相位对比滤波器,控制交流分量与直流分量的相位差,将采样速率提高到  $10 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$  以上,且横向分辨率达到衍射极限,纵向分辨率达 2 nm。2011 年 Wang 等<sup>[59-61]</sup>提出空间光干涉显微技术(SLIM),分辨精度与原子力显微镜相当,且采样速率达到每秒十几帧。Bhaduri 等<sup>[62]</sup>研究团队于 2013 年提出白光傅里叶相位显微技术(wFPM),采样速率达  $12.5 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ ,可用于细胞动力学的相关检测。

以上相位显微成像技术中均采用相移器获得 3 幅及以上的相移干涉图来完成相位成像,故具有耗时长、误差大的缺点。美国杜克大学 Shaked 团队于 2010 年提出基于马赫-曾德尔干涉原理的平行二步相移显微成像技术<sup>[63]</sup>。该技术仅需要采集 2 幅干涉相移图即可实现相位恢复,有利于被测样品的实时检测。此外,由于大部分相位显微成像技术只能实现被测样品的二维成像,韩国 Choi 等<sup>[64]</sup>于 2010 年基于 Linik 干涉原理提出全场光学层析技术,采用并行探测方法实现对单细胞样品的三维重构,并获得了细胞的物理厚度和光学厚度。

### 3.1.2 静态离轴干涉相位显微成像

与同轴干涉不同,离轴干涉是指具有一定夹角

的物光和参考光发生的干涉。该类光路得到的干涉图由于带有载频,因此仅需采集 1 幅干涉图就能获得被测样品的相位分布。离轴干涉定量相位显微技术大部分基于数字全息显微成像方法实现。基于数字全息的离轴干涉定量相位显微成像技术,包括通过分析衍射信息的相位图像重建方法和分析非衍射信息的相位图像重建方法。

2005 年,Marquet 等<sup>[65]</sup>提出一种依靠菲涅耳衍射数值再现的离轴干涉相位显微成像技术。该技术对获取的干涉图采用菲涅尔衍射数值,再现得到细胞的相位显微图像,其纵向分辨率达到亚波长量级。2006 年,美国 Popescu 等<sup>[66]</sup>提出衍射相位显微技术(DPM),采用共程光路,具有对环境扰动不敏感的优点。在此基础上,该团队又提出了白光衍射相位显微技术(wDPM)<sup>[67-69]</sup>,不仅保留了衍射相位显微技术的优势,而且其位于成像屏上的相位光栅可以产生包含样品完整空间信息的多个衍射级,光程稳定性高达亚纳米量级,且采样时间仅为毫秒级,为活细胞的定量研究和实时检测提供了新型的研究方法。在国内,江苏大学的王亚伟团队在衍射相位显微成像的基础上提出一种两步衍射相位显微成像技术<sup>[70]</sup>,该方法主要基于光栅衍射特性和空间滤波原理,将滤波系统后的 0 级衍射光分别和  $\pm 1$  级衍射光发生干涉,在 CCD 上形成 2 幅干涉图样,相位恢复后得到样品相位。该方法具有更高的精确度,不仅适用于倾斜角较大的离轴干涉,也适用于倾斜角较小的微离轴干涉。

采用非衍射信息重建相位图像的离轴式数字全息显微技术,在过去十几年中也取得了一定成果。Ikeda 等<sup>[71]</sup>于 2005 年提出采用希尔伯特变换在全息图中提取相位信息的方法,可在毫秒级或更短的时间内精确测量纳米级光程变化,为生物细胞的快速动态研究奠定了基础。德国 Kemper 等<sup>[72]</sup>于 2006 年提出一种非衍射重建离轴干涉相位显微技

术,成功得到细胞的三维结构图,纵向分辨率可达 5 nm,但在相位稳定性上存在一定局限性,且物光和参考光之间的比率需要精确调整。为进一步解决上述问题,2011 年该研究团队又提出基于迈克耳孙干涉原理的数字全息显微技术<sup>[73]</sup>,装置结构更为简单,且相位稳定性显著提高,分辨率达亚细胞级。

在基于数字全息的离轴干涉定量相位显微技术中,还有部分技术结合了干涉显微相移方法。2007 年,美国 Chalut 等<sup>[74]</sup>和 Shaked 等<sup>[75]</sup>基于马赫-曾

德尔干涉原理先后提出基于两步相移的离轴干涉异步数字全息技术和双通道干涉显微技术,经单次曝光同时获得 2 幅相移图,提高了采集速率。中国科学院上海光学精密机械研究所 Gao 等<sup>[76-77]</sup>于 2011 年提出基于离轴干涉的同步相移共光路干涉显微技术,利用 2 幅干涉相移图实现对活细胞的实时测量,具有较好的稳定性。

将上述各项同轴与离轴定量相位显微技术归纳、对比,如表 3 所示。

表 3 静态生物细胞相位测量技术的主要特征

Table 3 Characteristics of phase measurement methods for static biological cells

Technology	Year	Coaxial	Off-axis	Steps of phase shift	Digital holographic	Characteristic	Imaging dimension
Fourier phase microscopy	2004	✓		4		Sampling rate: 4 frame•min <sup>-1</sup>	2D
Fast-Fourier phase microscopy	2007	✓		4		Lateral resolution: diffraction limit; vertical resolution: 2 nm; sampling rate≥10 frame•s <sup>-1</sup>	2D
Space light interference microscopy	2011	✓		4		Resolution: the same as atomic force microscope; sampling rate≥10 frame•s <sup>-1</sup>	2D
White light-Fourier phase microscopy	2013	✓		4		Sampling rate: 12.5 frame•s <sup>-1</sup>	2D
Parallel two-step phase shift microscopy	2010	✓		2			2D
Full-field optical tomography technology	2010	✓		4			3D
Fresnel diffraction numerical representation	2005		✓		✓	Vertical resolution: sub-wavelength	2D
Diffraction phase microscopy	2006		✓		✓		2D
White light-diffraction phase microscopy	2013		✓		✓	Sampling rate: ms	2D
Non-diffraction reconstruction	2006		✓		✓	Vertical resolution: 5 nm; sampling rate: ms	2D
Digital holographic microscopy based on Michelson interference	2011		✓		✓	Lateral resolution: sub-cellular	2D
Off-axis interference asynchronous digital holography	2007		✓	2	✓	Sampling rate: ms	2D
Dual channel interference microscopy	2009		✓	2	✓	Sampling rate: ms	3D

### 3.2 静态生物细胞相位恢复

静态生物细胞相位恢复方法,既可在时域中进行相位解调,也可以采用频域相位解调方法。时域

相位解调技术通常应用于传统定量相位测量中,既适用于同轴干涉相位显微成像,也可用于离轴干涉相位成像。

同轴干涉相位显微成像技术<sup>[58,60-63]</sup>通常分时采集 3 幅以上的相移干涉图,再通过相移算法得到样品的相位信息。采集的干涉图样灰度值可表示为

$$I(x, y, n) = a(x, y) + b(x, y) \cos[\varphi(x, y) + 2n\pi], n = 1, 2, 3, 4, (7)$$

式中  $I(x, y, n)$  代表第  $n$  次相移得到的图像灰度值,  $a(x, y)$  代表背景光强,  $b(x, y)$  代表样品调制光强,  $\varphi(x, y)$  代表待测样品的相位。根据 4 步相移运算可以得到待测样品的相位信息

$$\tan \varphi = \frac{I(x, y, 2) - I(x, y, 4)}{I(x, y, 1) - I(x, y, 3)}. (8)$$

关于此技术,西安工业大学的田爱玲团队于 2014 年提出一种变频相移干涉测量的相位提取算法<sup>[78]</sup>,运用一种基于迭代的相位求解方法,无须对测试系统进行相位标定,可在被测相位和相移量均未知的情况下,通过交替迭代求解出被测相位。与传统的多步相移算法相比,该方法通过差值干涉图迭代求解相位,可以抑制噪声和背景对测量精度的影响,操作简单,精度更高。

离轴干涉相位显微成像通常采用两步相移法<sup>[74-75,79]</sup>,通过改变参考光相位获得 2 幅离轴相移干涉图,然后经变换求解出样品相位。设实验得到 2 幅干涉图的干涉强度分别为

$$I_1 = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos(\varphi + kx), (9)$$

$$I_2 = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos(\varphi + kx + \alpha), (10)$$

式中  $\alpha$  为相移量,  $k$  为引入的空间载波条纹的空间频率。

$$\varphi = \arctan \left[ \frac{\text{Im}(F)}{\text{Re}(F)} \right], (11)$$

式中

$$F = \frac{\exp(-jkx)}{1 - \exp(j\alpha)} [(I_1 - I_2) + jH(I_1 - I_2)]. (12)$$

干涉相移法虽然原理简单,但需多步相移,不易保证单步相移的准确性,且离轴干涉中运算过程涉及复杂的积分变换,耗时较长,因此,仅适用于静态生物细胞样品测量。

频域相位解调技术通常用于基于数字全息干涉定量相位显微技术,主要适用于离轴干涉相位显微成像。

1982 年,日本 Ina 等<sup>[80]</sup>提出频域傅里叶变换法,原理如下。设离轴干涉光强分布为

$$I(x, y) = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos[\varphi(x, y) + 2\pi f_x x] + a(x, y) + b(x, y) \exp[j2\pi f_x x] +$$

$$b(x, y) \exp[-j2\pi f_x x], (13)$$

式中  $f_x$  为引入的空间载频,  $a(x, y)$  为背景光强。

对(13)式进行傅里叶变换,得

$$I(f, x) = A(f, y) + B(f - f_x, y) + B(f + f_x, y), (14)$$

式中  $A$  为背景光强  $a$  的傅里叶变换,  $B$  为调制光强  $b$  的傅里叶变换,  $f$  为条纹频率。采用中心频率为  $f_x$  的滤波器,通过频移可将背景光强和共轭像消除,求得  $B(f, y)$ , 然后进行傅里叶逆变换得  $b(x, y)$ , 从而解出被测样品的相位:

$$\varphi(x, y) = \arctan \frac{\text{Im}[b(x, y)]}{\text{Re}[b(x, y)]}. (15)$$

相关学者在此基础上又提出希尔伯特变换法<sup>[67-69,71,81]</sup>。与傅里叶变换法相比,希尔伯特变换法仅需经过高通滤波消除背景光强,不必消除共轭像的干扰。这 2 种频域积分变换法充分利用了离轴干涉频谱分离的特点,具有较高的相位恢复速率,只需一幅干涉图就能定量提取物体的相位分布信息。

## 4 结束语

生物细胞定量相位显微技术通过细胞干涉图与相位恢复,实现生物细胞复杂空间形态的定量重构,是一种免标记、无损伤、非干预式的细胞检测手段,已成为临床细胞分类、病变诊断等研究的有力工具。近十几年来,生物细胞定量相位测量技术,尤其是动态生物细胞相位测量技术,得到迅速发展。纵观 2013 年至今的动态细胞相位测量技术,国内外团队就其干涉图样的采集速率、相位恢复速率、空间分辨率、处理量,以及成像时间等诸多方面进行了深入的研究。面对细胞动力学过程中的复杂生物物理信息检测研究,该技术提供了定量、可视化、空间形态的快速检测方法。动态细胞定量相位测量技术有望促进临床细胞诊断领域的深入发展,早日实现对人体重大疾病免标记非干预式早期诊断等的重大突破。

## 参 考 文 献

- [1] Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II [J]. Physica, 1942, 9(10): 974-980.
- [2] Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects [J]. Physica, 1942, 9(7): 686-698.
- [3] Munoz V H F, Ortiz B L, Toto-Arellano N I, et al. Single-shot phase shifting interferometry for

- microscopic measurements of non-birefringent transmissive phase samples [C]//Emerging Challenges for Experimental Mechanics in Energy and Environmental Applications, Proceedings of the 5th International Symposium on Experimental Mechanics and 9th Symposium on Optics in Industry (ISEM-SOI), 2015. Springer International Publishing, 2017: 221-225.
- [4] Lechuga L G, Toto-Arellano N I, Munoz V H F, *et al.* Phase shifting interferometry using a coupled cyclic path interferometers[C]//Emerging Challenges for Experimental Mechanics in Energy and Environmental Applications, Proceedings of the 5th International Symposium on Experimental Mechanics and 9th Symposium on Optics in Industry (ISEM-SOI), 2015. Springer International Publishing, 2017: 65-69.
- [5] Toto-Arellano N I. 4D measurements of biological and synthetic structures using a dynamic interferometer[J]. *Journal of Modern Optics*, 2017: 1-10.
- [6] Cintora P, Arikath J, Kandel M, *et al.* Cell density modulates intracellular mass transport in neural networks[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 503-509.
- [7] Kandel M E, Fernandes D, Taylor A M, *et al.* Three-dimensional intracellular transport in neuron bodies and neurites investigated by label-free dispersion-relation phase spectroscopy[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 519-526.
- [8] Li S S. Study and system optimization of simultaneous phase-shifting interferometer for measurement of the height of living cells [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2015.  
李帅帅. 基于同步相移干涉的活体细胞高度测量方法研究及系统优化[D]. 北京: 北京理工大学, 2015.
- [9] Wang M. Height measurement of living cells based on multi-phase interference microscopy[D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2011.  
王萌. 基于多相位干涉显微技术的活体细胞高度测量[D]. 北京: 北京理工大学, 2011.
- [10] Jin D, Sung Y, Lue N, *et al.* Large population cell characterization using quantitative phase cytometer [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 450-459.
- [11] Guo P, Huang J, Moses M A. Characterization of dormant and active human cancer cells by quantitative phase imaging[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 424-432.
- [12] Roitshtain D, Wolbromsky L, Bal E, *et al.* Quantitative phase microscopy spatial signatures of cancer cells [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 482-493.
- [13] Janicke B, Kärnsnäs A, Egelberg P, *et al.* Label-free high temporal resolution assessment of cell proliferation using digital holographic microscopy[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 460-469.
- [14] Luther E, Mendes L P, Pan J, *et al.* Applications of label-free, quantitative phase holographic imaging cytometry to the development of multi-specific nanoscale pharmaceutical formulations [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 412-423.
- [15] Kastl L, Isbach M, Dirksen D, *et al.* Quantitative phase imaging for cell culture quality control [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 470-481.
- [16] Yang S A, Yoon J, Kim K, *et al.* Measurements of morphological and biophysical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson's disease[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 510-518.
- [17] Zhang Y Z. Phase-contrast imaging in digital holographic microscopy for biological samples [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2012.  
张亦卓. 生物样品的数字全息显微相衬成像技术研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2012.
- [18] Cui H K. Phase aberration compensation in digital holographic microscopy for biological cells [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2011.  
崔华坤. 生物细胞数字全息显微成像的相位畸变校正[D]. 北京: 北京工业大学, 2011.
- [19] Pan F, Xiao W, Liu S. Digital holographic microscopy for long-term quantitative phase-contrast imaging of living cells[J]. *Chinese Journal of 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体细胞的数字全息显微方法[J]. *中国激光*, 2011, 38(5): 0509001.
- [20] Ma L H, Wang H, Jin H Z, *et al.* Experimental study on quantitative phase imaging by digital holographic microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2012, 39(5): 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(5): 0309002.
- [21] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, *et al.* Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications [J]. *Experimental Cell Research*, 1999, 249(1): 1-12.
- [22] Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications— an update[M]// *Cell Imaging Techniques*. Totowa: Humana Press, 2012: 187-212.
- [23] Harnett M M. Laser scanning cytometry:

- understanding the immune system *in situ* [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(11): 897-904.
- [24] Henriksen M. Quantitative imaging cytometry: instrumentation of choice for automated cellular and tissue analysis [J]. *Nature Methods*, 2010, 7: 1449-1450.
- [25] Hutcheson J A, Khan F Z, Powless A J, *et al.* A light sheet confocal microscope for image cytometry with a variable linear slit detector [C]. *SPIE Bios*, 2016, 9720: 97200U.
- [26] Oheim M. Advances and challenges in high-throughput microscopy for live-cell subcellular imaging [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2011, 6(12): 1299-1315.
- [27] Cheung M C, McKenna B, Wang S S, *et al.* Image-based cell-resolved screening assays in flow [J]. *Cytometry Part A*, 2015, 87(6): 541-548.
- [28] McKenna B K, Evans J G, Cheung M C, *et al.* A parallel microfluidic flow cytometer for high content screening [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(5): 401-403.
- [29] Basiji D A, Ortyn W E, Liang L, *et al.* Cellular image analysis and imaging by flow cytometry [J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2007, 27(3): 653-670.
- [30] McGrath K E, Bushnell T P, Palis J. Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 336(2): 91-97.
- [31] Vorobjev I A, Barteneva N S. *Imaging flow cytometry methods and protocols* [M]. New York: Springer Science+Business Media, 2016.
- [32] Schmid L, Weitz D A, Franke T. Sorting drops and cells with acoustics: acoustic microfluidic fluorescence-activated cell sorter [J]. *Lab on A Chip*, 2014, 14(19): 3710-3718.
- [33] Ren L Q, Chen Y C, Li P, *et al.* A high-throughput acoustic cell sorter [J]. *Lab on A Chip*, 2015, 15(19): 3870-3879.
- [34] Shields IV C W, Reyes C D, López G P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation [J]. *Lab on A Chip*, 2015, 15(5): 1230-1249.
- [35] Schonbrun E, Gorthi S S, Schaak D. Microfabricated multiple field of view imaging flow cytometry [J]. *Lab on A Chip*, 2012, 12(2): 268-273.
- [36] Goda K, Tsia K K, Jalali B. Serial time-encoded amplified imaging for real-time observation of fast dynamic phenomena [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1145-1149.
- [37] Goda K, Motafakker-Fard A, Tsia K K, *et al.* Serial time encoded amplified microscopy (STEAM) for high-throughput detection of rare cells [C]. *Photonics Society Winter Topicals Meeting Series*, IEEE, 2010: 64-65.
- [38] Goda K, Ayazi A, Gossett D R, *et al.* High-throughput single-microparticle imaging flow analyzer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(29): 11630-11635.
- [39] Chen C L, Mahjoubfar A, Tai L C, *et al.* Deep learning in label-free cell classification [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21471.
- [40] Jiang Y, Lei C, Yasumoto A, *et al.* Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy [J]. *Lab on A Chip*, 2017, 17(14): 2426-2434.
- [41] Huang E, Ma Q, Liu Z W. Ultrafast imaging using spectral resonance modulation [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25240.
- [42] Goda K, Jalali B. Dispersive Fourier transformation for fast continuous single-shot measurements [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(2): 102-112.
- [43] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning [J]. *Nature*, 2015, 521(7553): 436-444.
- [44] Guo B, Lei C, Kobayashi H, *et al.* High-throughput, label-free, single-cell, microalgal lipid screening by machine-learning-equipped optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 494-502.
- [45] Isikman S O, Bishara W, Ozcan A. Partially coherent lens-free tomographic microscopy [J]. *Applied Optics*, 2011, 50(34): H253-H264.
- [46] Mudanyali O, Tseng D, Oh C, *et al.* Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications [J]. *Lab on A Chip*, 2010, 10(11): 1417-1428.
- [47] Xue L. *Optical microscopy imaging and its application in bio-sample display and measurement* [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2013.  
薛亮. 光学显微成像及在生物样品显示与测量中的应用 [D]. 南京: 南京理工大学, 2013.
- [48] Chen Y Z, Ji Y, Xie M, *et al.* Phase microscopy imaging method based on common-path without micro-objective [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(12): 121702.  
陈映洲, 季颖, 谢铭, 等. 免显微物镜的共光路相位显微成像方法 [J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(12): 121702.
- [49] Allier C, Morel S, Vincent R, *et al.* Imaging of

- dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 433-442.
- [50] Merola F, Barroso Á, Miccio L, *et al.* Biolens behavior of RBCs under optically-induced mechanical stress [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 527-533.
- [51] Vargas J, Quiroga J A, Sorzano C O S, *et al.* Two-step demodulation based on the Gram-Schmidt orthonormalization method [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(3): 443-445.
- [52] Niu W H, Zhong L Y, Sun P, *et al.* An improved two-step phase-shifting algorithm based on Gram-Schmidt orthonormalization [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2015, 42(6): 0608002.  
牛文虎, 钟丽云, 孙鹏, 等. 一种改进的施密特正交化两步相移算法 [J]. *中国激光*, 2015, 42(6): 0608002.
- [53] Cui J H, Wang H L, Lü X X, *et al.* The application of an improved phase unwrapping method in measurement the phase of cells [J]. *Laser Journal*, 2015, 36(10): 62-65.  
崔俊宏, 王翰林, 吕晓旭, 等. 一种改进的解包算法在细胞相位测量上的应用 [J]. *激光杂志*, 2015, 36(10): 62-65.
- [54] Bhaduri B, Popescu G. Derivative method for phase retrieval in off-axis quantitative phase imaging [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(11): 1868-1870.
- [55] Xu Y Y, Wang Y W, Jin W F, *et al.* A new method of phase derivative extracting for off-axis quantitative phase imaging [J]. *Optics Communications*, 2013, 305: 13-16.
- [56] Alanazi H, Canul A J, Garman A, *et al.* Robust microbial cell segmentation by optical-phase thresholding with minimal processing requirements [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 443-449.
- [57] Popescu G, Deflores L P, Vaughan J C, *et al.* Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics [J]. *Optics Letters*, 2004, 29(21): 2503-2505.
- [58] Popescu G, Badizadegan K, Feld M S, *et al.* Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy [J]. *Applied Optics*, 2007, 46(10): 1836-1842.
- [59] Wang Z, Millet L, Mir M, *et al.* Spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [60] Bhaduri B, Wickland D, Wang R, *et al.* Cardiac myocyte imaging using real-time spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e56930.
- [61] Tan H N, Popescu G. Spatial light interference microscopy (SLIM) using twisted-nematic liquid-crystal modulation [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(9): 1571-1583.
- [62] Bhaduri B, Tangella K, Popescu G. Fourier phase microscopy with white light [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(8): 1434-1441.
- [63] Wax A, Ehlers M D, Shaked N T, *et al.* Parallel on-axis holographic phase microscopy of biological cells and unicellular microorganism dynamics [J]. *Applied Optics*, 2010, 49(15): 2872-2878.
- [64] Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, *et al.* Tomographic phase microscopy [J]. *Nature methods*, 2007, 4(9): 717-719.
- [65] Marquet P, Rappaz B, Magistretti P J, *et al.* Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy [J]. *Optics Letters*, 2005, 30(5): 468-470.
- [66] Popescu G, Ikeda T, Dasari R R, *et al.* Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(6): 775-778.
- [67] Pham H V, Bhaduri B, Tangella K, *et al.* Real time blood testing using quantitative phase imaging [J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e55676.
- [68] Bhaduri B, Pham H, Mir M, *et al.* Diffraction phase microscopy with white light [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(6): 1094-1096.
- [69] Pham H V, Edwards C, Goddard L L, *et al.* Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy [J]. *Applied Optics*, 2013, 52(1): A97-A101.
- [70] Xu Y Y. Fast phase retrieval method and imaging technology of cells based on interference microscopy [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017.  
徐媛媛. 干涉显微细胞相位快速恢复方法及成像技术的研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [71] Ikeda T, Popescu G, Dasari R R, *et al.* Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems [J]. *Optics letters*, 2005, 30(10): 1165-1167.
- [72] Kemper B, Carl D, Schnekenburger J, *et al.* Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(3): 034005.
- [73] Kemper B, Vollmer A, Rommel C E, *et al.* Simplified approach for quantitative digital holographic phase contrast imaging of living cells [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(2): 026014.
- [74] Chalut K J, Brown W J, Wax A. Quantitative phase

- microscopy with asynchronous digital holography[J]. *Optics Express*, 2007, 15(6): 3047-3052.
- [75] Shaked N T, Rinehart M T, Wax A. Dual-interference-channel quantitative-phase microscopy of live cell dynamics[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(6): 767-769.
- [76] Gao P, Yao B, Harder I, *et al.* Parallel two-step phase-shifting digital holograph microscopy based on a grating pair[J]. *Journal of the Optical Society of America A Optics Image Science & Vision*, 2011, 28(3): 434-440.
- [77] Gao P, Yao B L, Min J, *et al.* Parallel two-step phase-shifting point-diffraction interferometry for microscopy based on a pair of cube beamsplitters[J]. *Optics Express*, 2011, 19(3): 1930-1935.
- [78] Liu J, Tian A L, Liu B C, *et al.* A phase extraction algorithm in wavelength tuning interferometry [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(3): 0312001.
- 刘剑, 田爱玲, 刘丙才, 等. 一种变频相移干涉测量的相位提取算法 [J]. *光学学报*, 2014, 34(3): 0312001.
- [79] Shaked N T, Zhu Y, Rinehart M T, *et al.* Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells [J]. *Optics Express*, 2009, 17(18): 15585-15591.
- [80] Ina H, Takeda M, Kobayashi S. Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2015, 72(12): 156-160.
- [81] Ding H, Berl E, Wang Z, *et al.* Fourier transform light scattering of biological structure and dynamics [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2010, 16(4): 909-918.