

模块化全偏振显微镜

黄彤宇^{1,2}, 孟若愚¹, 赵千皓¹, 冷炎¹, 廖然¹, 何宏辉¹, 马辉^{1,2,3*}

¹清华大学深圳国际研究生院, 广东 深圳 518055;

²清华大学生物医学工程系, 北京 100084;

³清华大学物理系, 北京 100084;

摘要 偏振成像可以获得样本丰富的微观结构信息。通过在传统光学显微镜上加装起偏器模块和检偏器模块, 可以将其升级为穆勒矩阵显微镜, 实现生物医学样品的特征结构和偏振性质的全面定量测量。介绍了几种以商业显微镜为基础的模块化穆勒矩阵显微镜, 包括基于双波片旋转的透射式和反射式系统和基于双线偏振 CCD 的透射式系统, 并对其光路结构、测量原理、校准方法和应用演示进行了详细的阐述。

关键词 成像系统; 偏振成像; 微观结构; 穆勒矩阵; 显微镜; 生物医学

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.1517002

1 引言

偏振是光的基本属性之一。作为一种无标记、无损伤的光学检测技术, 偏振光学成像技术在病理诊断^[1-5]领域展示出良好的应用前景。偏振光学成像技术具有无需对样品染色、获取信息量丰富、对样品结构尤其是亚波长微观结构敏感、与传统光学成像技术兼容等优点, 非常适合与现有基于染色方法的显微成像技术结合, 区分病变样品的不同微观结构特征。

传统偏振显微镜是在显微镜光路的照明端与成像端增加偏振片。早在 1953 年, Inoue^[6]就提出了一种包含偏振片和相位延迟器的偏振显微镜, 并将其应用于检测活细胞有丝分裂时产生的纺锤体纤维。1987 年, Mickols 等^[7]在差分偏振显微镜中使用扫描台对精子细胞核样品的各向异性结构进行了研究。但这些显微镜都只能对样品的偏振性质进行定性分析。Oldenburg^[8-9]将电控液晶相位延迟器引入偏振显微镜, 精确获取了样品的双折射性质, 包括相位延迟大小和快轴角度分布, 后来经过不断完善推出了商业化 Abrio 系统^[10-11]。

在所有偏振参数中, 穆勒矩阵可完备表征待测样品改变入射光偏振态的能力, 进而可全面定量地

表征待测样品的偏振光学性质。通过在传统透射式或反射式显微镜中添加起偏器 (polarization state generator, PSG) 模块和检偏器 (polarization state analyzer, PSA) 模块, 可以测量样品的穆勒矩阵, 实现全偏振显微成像。Arteaga 等^[12]设计并实现了一种穆勒矩阵显微成像装置, 连续旋转起偏器和检偏器的波片, 通过数字解调, 实现了样品穆勒矩阵的重建。我们提出在商业显微镜的基础上进行偏振升级以实现穆勒矩阵显微镜的思路, 并实现了一系列穆勒矩阵显微镜样机, 包括基于双波片旋转的正置透射式穆勒矩阵显微镜 (upright transmission Mueller matrix microscope based on dual rotating retarders, DRR-UTMMM)^[13-15]和基于双波片旋转的正背向反射式穆勒矩阵显微镜 (collinear reflection Mueller matrix microscope based on dual rotating retarders, DRR-CRMMM)^[16]。前者可以实现病理组织等薄切片的穆勒矩阵成像, 从而获得样本的特异性微观结构信息; 后者可以实现厚组织样本的穆勒矩阵成像, 相比于斜入射光照明系统, 样品方位角对测量结果的影响被抑制, 样品本身的固有偏振性质得到凸显。

基于双波片旋转的偏振测量系统按照时间顺序串行调制光线的偏振态, 属于非同时性的偏振

收稿日期: 2021-03-25; 修回日期: 2021-05-01; 录用日期: 2021-05-24

基金项目: 国家重大仪器专项 (61527826)

通信作者: *mahui@tsinghua.edu.cn

调制方法,因此测量一幅穆勒矩阵图像所需的时间较长,动态样本的测量结果会包含较明显的偏振伪影。基于焦平面划分 (division of focal plane, DoFP) 的线偏振 CCD 通过在普通成像传感器前增加具有不同通光方向的微偏振片阵列,实现了待测光线线偏振分量的实时测量。近年来有一些研究将线偏振 CCD 应用于显微成像之中,如将单个线偏振 CCD 与荧光显微镜结合^[17],以及我们提出的基于单个线偏振 CCD 的可实现样品 3×4 穆勒矩阵快速测量的偏振显微镜^[18]。当线偏振 CCD 与可旋转的四分之一波片^[19-20]或液晶可变位延迟器 (liquid crystal variable retarder, LCVR)^[21] 搭配使用并进行至少两次图像采集时,可实现全偏振的测量。我们设计并实现了基于双 DoFP 线偏振 CCD 的正置透射式穆勒矩阵显微镜 (upright transmission Mueller matrix microscope based on dual DoFP polarimeters, DoFPs-UTMMM),其测量速度和测量准确度相比基于双波片旋转的系统均有明显的提升^[22]。

本文将对模块化穆勒矩阵显微镜的两类实现方案进行综述。首先介绍基于双波片旋转的穆勒矩阵显微镜,包括透射式和正背向反射式系统。然后介绍基于双线偏振 CCD 的正置透射式穆勒矩阵显微镜。

2 基于双波片旋转的穆勒矩阵显微镜

2.1 基于双波片旋转的透射式穆勒矩阵显微镜

基于双波片旋转的穆勒矩阵测量方法最早于 1978 年由 Azzam^[23] 提出。在基于双波片旋转的穆勒矩阵测量系统中,起偏器和检偏器的四分之一波片以一定的转速或步进角度比例进行旋转,此时光强探测器接收到的一系列光强信号可以视作一个傅里叶周期信号,通过对光强信号序列进行傅里叶分析,可以推导得到样品的 16 个穆勒矩阵阵元与光强信号的傅里叶系数之间的关系,进而实现穆勒矩阵测量。

在商业透射式显微镜中增加基于双波片旋转的起偏器模块和检偏器模块,可以实现透射式穆勒矩阵显微镜,如图 1 所示^[24]。起偏器模块由一个具有固定角度的偏振片 P1 和一个可旋转的四分之一波片 R1 构成,旋转 R1 可以产生具有不同偏振态的入射光线;检偏器模块则与起偏器模块的结构相反,其包含一个可旋转的四分之一波片 R2 和一个具有固定角度的偏振片 P2。偏振片 P1、P2 的通光方向和

四分之一波片 R1、R2 的初始快轴角度均设定为 0° 。单波长 LED 光源产生的准直单色光经过起偏器的偏振调制,照射到固定于载物台的样品上,穿过样品的散射光经过物镜后,被检偏器调制并被 CCD 所接收。

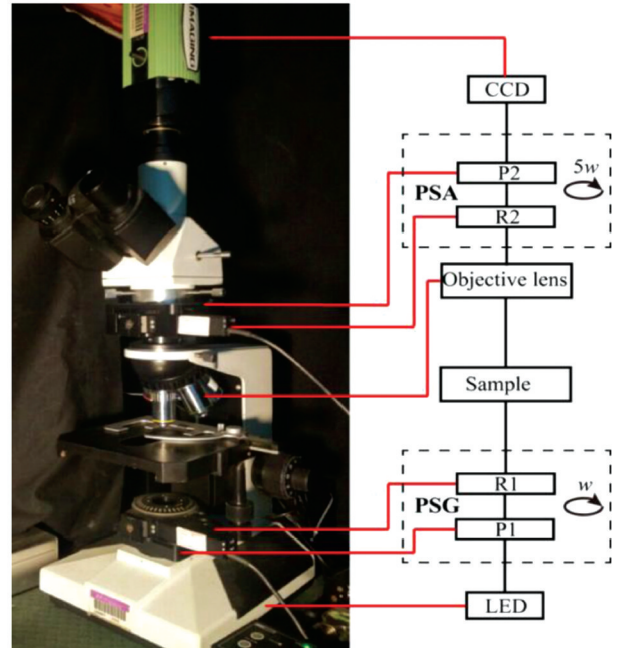


图 1 基于双波片旋转的透射式穆勒矩阵显微镜结构图^[24]
Fig. 1 Schematic of transmission Mueller matrix microscope based on dual rotating retarders^[24]

在穆勒矩阵测量过程中,起偏器波片 R1 和检偏器波片 R2 分别固定在电动旋转位移台上并以 $1:5$ 的角度比转动。在本系统中,R1 和 R2 每次步进 6° 和 30° ,CCD 对应采集一次光强图像,第 i 次接收到的光强信号可以表示为

$$I_{\text{out}}(i) = c [1 \ 0 \ 0 \ 0] \cdot$$

$$\mathbf{M}_{P_2} \mathbf{M}_{R_2}(i) \mathbf{M}_{\text{sample}} \mathbf{M}_{R_1}(i) \mathbf{M}_{P_1} \mathbf{S}_{\text{LED}}, \quad (1)$$

式中: \mathbf{S}_{LED} 代表照明光的偏振态; \mathbf{M}_{P_1} 和 $\mathbf{M}_{R_1}(i)$ 分别代表起偏器中 P1 和 R1 第 i 次步进对应的穆勒矩阵; \mathbf{M}_{P_2} 和 $\mathbf{M}_{R_2}(i)$ 分别代表检偏器中 P2 和 R2 第 i 次步进对应的穆勒矩阵; $\mathbf{M}_{\text{sample}}$ 代表待测样品的穆勒矩阵; c 代表 CCD 的灵敏度。由于四分之一波片 R1 和 R2 具有不同的转动速率,因此 I_{out} 是一个周期信号,可以表示为傅里叶级数的形式:

$$I_{\text{out}} = a_0 + \sum_{n=1}^{12} (a_n \cos n\omega t + b_n \sin n\omega t), \quad (2)$$

式中: a_0, a_n, b_n 为信号 I_{out} 的傅里叶系数; n 为傅里叶系数的阶数; t 为时间; ω 为信号的基频。经过推导,可知样品的穆勒矩阵阵元是光强信号傅里叶系数 a_n 和 b_n 的函数,因此通过对 CCD 采集的光强信

号进行傅里叶分析,便可以求解样本的所有穆勒矩阵阵元:

$$\mathbf{M}_{\text{sample}} = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} & m_{14} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} & m_{24} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} & m_{34} \\ m_{41} & m_{42} & m_{43} & m_{44} \end{pmatrix}, \quad (3)$$

式中:

$$\begin{cases} m_{11} = a_0 - a_2 - a_{10} + a_8 + a_{12} = \\ a_0 - \frac{1}{2}m_{12} - \frac{1}{2}m_{21} - \frac{1}{4}m_{22} \\ m_{12} = 2a_2 - 2a_8 - 2a_{12} = 2a_2 - \frac{1}{2}m_{22} \\ m_{13} = 2b_2 + 2b_8 - 2b_{12} = 2b_2 - \frac{1}{2}m_{23} \\ m_{14} = b_1 + b_9 - b_{11} = b_1 + 2b_9 = \\ b_1 - 2b_{11} = b_1 - \frac{1}{2}m_{24} \\ m_{21} = -2a_8 + 2a_{10} - 2a_{12} = 2a_{10} - \frac{1}{2}m_{22} \\ m_{22} = 4a_8 + 4a_{12} \\ m_{23} = 4b_{12} - 4b_8 \\ m_{24} = -2b_9 + 2b_{11} = 4b_{11} = -4b_9 \\ m_{31} = -2b_8 + 2b_{10} - 2b_{12} = 2b_{10} - \frac{1}{2}m_{32} \\ m_{32} = 4b_{12} + 4b_8 \\ m_{33} = 4a_8 - 4a_{12} \\ m_{34} = 2a_9 - 2a_{11} = 4a_9 = -4a_{11} \\ m_{41} = b_3 - b_5 + b_7 = 2b_3 - b_5 = \\ 2b_7 - b_5 = -b_5 - \frac{1}{2}m_{42} \\ m_{42} = -2b_3 - 2b_7 = -4b_3 = -4b_7 \\ m_{43} = -2a_3 + 2a_7 = 4a_7 = -4a_3 \\ m_{44} = a_6 - a_4 = 2a_6 = -2a_4 \end{cases}. \quad (4)$$

但以上理论推导是建立在理想起偏器和检偏器基础上的。在实际实验中,系统的偏振元件往往存在误差,此时光强信号 I_{out} 不仅为穆勒矩阵阵元的函数,同时还是各项系统误差的函数,这会影响到穆勒矩阵测量结果的准确度,但可以通过校准方法减小甚至消除这些系统误差。针对基于双波片旋转的透射式穆勒矩阵显微镜对测量结果带来的影响,我们采用解析式校准法 (Analytic Calibration Method, ACM),通过建立系统的误差模型,获取各个系统误差与待测信号之间的解析表达式,进行精确的求解和校准^[25]。假定起偏器的偏振片 P1 的初始通光方

向与 x 轴平行,定义四分之一波片 R1、R2 的真实初始快轴方向与 x 轴之间的角度误差分别为 ϵ_3 和 ϵ_4 ,偏振片 P2 的真实初始通光方向与 x 轴之间的角度误差为 ϵ_5 ,四分之一波片 R1 和 R2 的真实相位延迟为 δ_1 和 δ_2 ,则考虑了系统误差后(1)式变为

$$I_{\text{out}}(i) = c [1 \ 0 \ 0 \ 0] \mathbf{M}_{\text{P2}}(\epsilon_5) \mathbf{M}_{\text{R2}}(i, \delta_2, \epsilon_4) \cdot \mathbf{M}_{\text{sample}} \mathbf{M}_{\text{R1}}(i, \delta_1, \epsilon_3) \mathbf{M}_{\text{P1}} \mathbf{S}_{\text{LED}}. \quad (5)$$

此时,光强信号 I_{out} 不仅为穆勒矩阵阵元的函数,同时还是五项系统误差的函数,通过推导可以得出样品穆勒矩阵阵元与光强信号的傅里叶系数和五项系统误差的解析表达式。在校准时,通常令显微镜进行空测,由于空气的穆勒矩阵可以看作是理想的单位矩阵,则此时穆勒矩阵显微镜的各项系统误差可以利用空气光强信号的傅里叶系数进行精确的标定。在测量真实样品时,只需要在模型中代入系统误差,即可获得经过系统误差校准后的穆勒矩阵。

2.2 基于双波片旋转的正背向反射式穆勒矩阵显微镜

对于厚组织测量和在体临床诊断等应用,反射式成像更为实用。采用斜入射光照明的设计虽然可以降低样本表面正反射光的干扰,但所得到的样本偏振参数会受到样本放置方位角的影响^[26]。

为了克服斜入射照明带来的缺陷,我们设计并开发了基于双波片旋转的正背向反射式穆勒矩阵显微镜,其结构如图 2 所示^[16]。通过在商业化金相显微镜光路中添加起偏器和检偏器模块,实现正背向反射式穆勒矩阵成像。与透射式穆勒矩阵显微镜相似,正背向反射式穆勒矩阵显微镜的起偏器模块同样由一个具有固定角度的偏振片 P1 和一个可以旋转的四分之一波片 R1 构成,检偏器模块则包含一个可旋转的四分之一波片 R2 和一个具有固定角度的偏振片 P2。偏振片 P1、P2 的通光方向和四分之一波片 R1、R2 的初始快轴方向均设定为与 x 轴平行。照明模块由单波长 LED 光源和准直透镜构成,照明模块产生的照明光经过起偏器模块的偏振调制后,被一个 50:50 非偏振分光棱镜向下反射以实现对照样品的照明。在这里非偏振分束棱镜的作用是保证照明光和样品的背向散射光共线。从样品表面发出的背向散射光向上穿过非偏振分束棱镜,经过检偏器的偏振调制后最终被 CCD 接收。在单次穆勒矩阵测量过程中,起偏器和检偏器的波片 R1 和 R2 每次步进 6° 和 30° ,CCD 对应采集一次图像,根据傅里叶分析的方法即可求解样品的 16 个穆勒矩阵阵元。

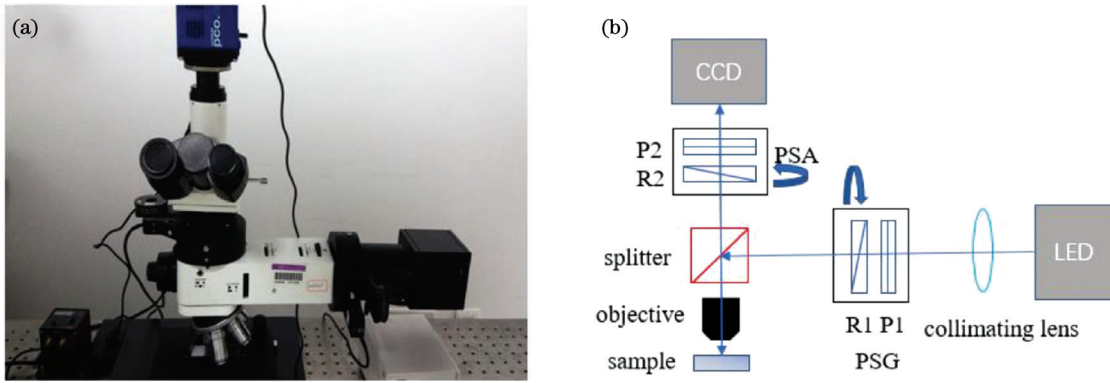


图 2 基于双波片旋转的正背向反射式穆勒矩阵显微镜^[16]。(a)实物图;(b)结构图
Fig. 2 Collinear reflection Mueller matrix microscope based on dual rotating retarders^[16].

(a) Physical map; (b) structural diagram

正背向反射式穆勒矩阵显微镜同样需要校准,特别是非偏振分光棱镜自身也往往具有偏振性质,其可能会在测量结果中引入二向色性和相位延迟误差。主要考虑的系统误差包括:R1 的相位延迟 δ_1 和角度误差 ϵ_3 ,R2 的相位延迟 δ_2 和角度误差 ϵ_4 ,P2 的角度误差 ϵ_5 ,分光棱镜反射端的穆勒矩阵 M_{S1} 和透射端的穆勒矩阵 M_{S2} 。则在穆勒矩阵测量过程中,CCD 接收的第 i 次光强信号可以表示为

$$I_{out}(i) = c [1 \ 0 \ 0 \ 0] M_{P2}(\epsilon_5) M_{R2}(i, \delta_2, \epsilon_4) \cdot M_{S2} M_{sample} M_{S1} M_{R1}(i, \delta_1, \epsilon_3) M_{P1} S_{LED} \quad (6)$$

定义尺寸为 4×30 的起偏器仪器矩阵 G 和尺寸为 30×4 的检偏器的仪器矩阵 A ,将起偏器和检偏器的仪器矩阵进行克罗内克积计算和拉直运算,可得到系统整体的仪器矩阵 F :

$$F^T(i) = \text{vec}[G^T(i) \otimes A^T(i)], \quad (7)$$

则(6)式可以简化为

$$I_{out} = c F \cdot \text{vec}(M_{sample}), \quad (8)$$

式中: $\text{vec}(M_{sample})$ 表示经过拉直运算后的穆勒矩阵。系统仪器矩阵 F 包含了上述系统误差,由于系统误差种类多且关系复杂,往往难以精确推导相关解析表达式。为了对系统误差进行标定与校准,研究者提出了数值求解校准法(Numerical Calibration Method, NCM)^[16,27]。首先使用系统测量多个标准样品,构建由多个非线性方程构成的方程组,其次通过数值求解直接计算误差模型的误差值并重建系统的真实仪器矩阵。相比于解析式校准法,数值求解校准法在适用范围和灵活性方面更有优势。

当求解得到全部的系统误差后,系统的真实仪器矩阵 F 可以被精确重建,则待测样品的穆勒矩阵满足

$$\text{vec}(M_{sample}) = F^{-1} \cdot I_{sample}, \quad (9)$$

式中: I_{sample} 为待测样本的光强信号。

为了比较正背向反射式与斜入射光照明反射式穆勒矩阵成像结果的差异,我们分别利用正背向反射式穆勒矩阵显微镜以及 20° 斜入射光照明反射式穆勒矩阵成像系统对电纺丝纤维样本进行穆勒矩阵成像,并分别测量了样本的方位角为 $0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ 和 270° 时的穆勒矩阵。对于每一组数据,我们都计算了穆勒矩阵旋转不变量参数^[26] $q_L = \sqrt{m_{42}^2 + m_{43}^2}$ 和 $r_L = \sqrt{m_{24}^2 + m_{34}^2}$ 以及对应的频率分布直方图(frequency distribution histogram, FDH),结果如图 3 所示^[16]。结果显示,相比于斜入射光照明反射式穆勒矩阵成像系统的测量结果[图 3(a)、(b)],正背向反射式穆勒矩阵显微镜测量得到的偏振参数的 FDH 几乎不受样品方位角的影响[图 3(c)、(d)],这有助于分离样品固有的偏振性质和样品的方位角取向,更能反映出样品的真实偏振属性。

3 基于双线偏振 CCD 的透射式穆勒矩阵显微镜

采用旋转波片进行偏振态检测属于非同时性偏振调制方法,在对偏振性质快速变化的样品进行测量时,采用同时性偏振调制器件如 DoFP 线偏振 CCD 可以实现待测光偏振态的同时性测量。这种装置在普通 CCD 的每个像素表面覆盖不同角度的微型偏振片,可实现线偏振成像,具有尺寸和体积小、测量速度快的优点,适用于快速偏振显微测量。DoFP 线偏振 CCD 的结构如图 4(a)所示^[18],邻近的像素分别覆盖有 $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 方向的偏振片,每个像素上的偏振片仅检测一种偏振方向,从而可以同时获取 4 个偏振通道的光强图像($I_0, I_{45}, I_{90}, I_{135}$)。通过对每个偏振通道的图像进行双线性插

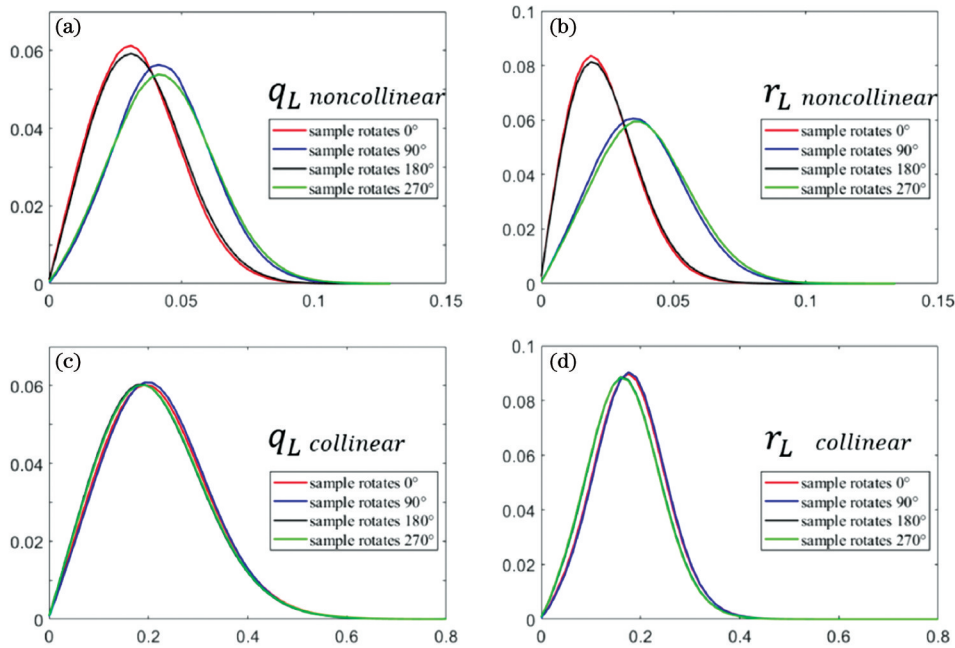


图 3 正背向反射式穆勒矩阵显微镜和斜入射光照明反射式穆勒矩阵成像系统的测量结果^[16]。

(a)(b)斜入射光照明反射式穆勒矩阵成像系统;(c)(d) DRR-CRMMM

Fig. 3 Results measured by DRR-CRMMM and oblique incident illumination reflection Mueller matrix imaging system^[16].

(a)(b) Oblique incident illumination reflection Mueller matrix imaging system;(c)(d) DRR-CRMMM

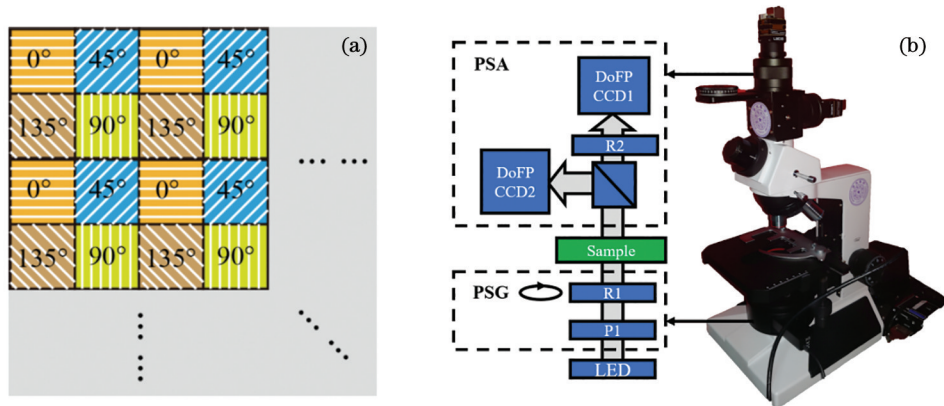


图 4 DoFP 线偏振 CCD 及相应的穆勒矩阵显微镜。(a)DoFP 线偏振 CCD 的微偏振片阵列示意图^[18];

(b)基于双 DoFP 线偏振 CCD 的透射式穆勒矩阵显微镜结构图^[22]

Fig. 4 DoFP linear polarization CCD and corresponding Mueller matrix microscope. (a) Diagram of pixelated micropolarizer array of DoFP linear polarization CCD^[18]; (b) schematic of transmission Mueller matrix microscope based on dual DoFP linear polarization CCDs^[22]

值^[28-30], 得到待测光线的线偏振态:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_0 + I_{90} \\ I_0 - I_{90} \\ I_{45} - I_{135} \end{bmatrix}. \quad (10)$$

为消除各偏振像素的消光比、通光方向和光强响应的不均匀性引入的误差, 在线偏振 CCD 使用之前需要先使用具有特定线偏振态 $[\mathbf{S}_{ref}]$ 的准直入射光进行照明并记录线偏振 CCD 在每一个像素处的光强响应 $[I]$, 则线偏振 CCD 在每一个像素点处的

仪器矩阵^[31]为

$$\mathbf{A}_{DoFP} = [\mathbf{I}][\mathbf{S}_{ref}]^{-1}. \quad (11)$$

为了对动态过程或活体组织进行快速的全偏振穆勒矩阵测量, 本课题组设计并实现了基于双线偏振 CCD 的穆勒矩阵显微镜^[22]。其中一路线偏振 CCD 前加装一个具有固定角度的四分之一波片, 两个线偏振 CCD 共同组成一个全偏振检偏器。通过测量检偏器的仪器矩阵, 并结合两个线偏振 CCD 的多通道偏振数据, 实现信号的实时检偏, 利用两个线偏振

CCD 的数据计算待测信号的全偏振态。这一方法充分利用了线偏振 CCD 可以进行同时性偏振检测的优点,并克服了单一线偏振 CCD 无法测量圆偏振信息的缺点。

基于双线偏振 CCD 的透射式穆勒矩阵显微镜的实物图和结构图如图 4(b) 所示^[22]。其中系统的起偏器模块包括一个具有固定角度的偏振片 P1 和一个可旋转的四分之一波片 R1,检偏器模块则包含两个 DoFP 线偏振 CCD、一个 50:50 非偏振分光棱镜和一个具有固定角度的四分之一波片 R2。两个线偏振 CCD 分别被固定在非偏振分光棱镜的透射端和反射端,其中波片 R2 被固定在 CCD1 和非偏振分光棱镜的透射端之间。初始状态时波片 R1 的快轴方向和起偏器 P1 的通光方向平行,且与两个线偏振 CCD 的 0° 通光方向平行。两个线偏振 CCD 各自的 0° 通光方向相互平行,成像区域完全相同,且基于仿射变换进行了图像配准。光源发出的准直单色光经过起偏器的偏振调制后穿过样品,利用两个线偏振 CCD 分别检测被非偏振分光棱镜分束后的光束。

由于线偏振 CCD 在使用前已经过校准并已计算得到了每个像素处的仪器矩阵 \mathbf{A}_{DoFP} ,根据偏振测量模型,可以计算得到检偏器的整体仪器矩阵:

$$\mathbf{A}_{\text{PSA}} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}_{\text{DoFP}} \mathbf{M}_{\text{R2}}(\theta_{\text{R2}}, \delta_{\text{R2}}) \\ \mathbf{A}_{\text{DoFP}} \end{bmatrix}, \quad (12)$$

式中: $\mathbf{M}_{\text{R2}}(\theta_{\text{R2}}, \delta_{\text{R2}})$ 是相位延迟为 δ_{R2} 、快轴角度为 θ_{R2} 时波片 R2 的穆勒矩阵。

条件数指标可以用于衡量检偏器对测量误差的敏感程度^[32],其计算公式为

$$C_N(\mathbf{A}_{\text{PSA}}) = \|\mathbf{A}_{\text{PSA}}\| \cdot \|\mathbf{A}_{\text{PSA}}^{-1}\|, \quad (13)$$

式中: $\|\mathbf{A}_{\text{PSA}}\|$ 表示检偏器仪器矩阵 \mathbf{A}_{PSA} 的欧几里得范数。通过遍历不同的 δ_{R2} 和 θ_{R2} 并计算检偏器仪器矩阵 \mathbf{A}_{PSA} 的条件数,对检偏器进行系统优化。可以发现,当波片 R2 的相位延迟为 90° 时, \mathbf{A}_{PSA} 的条件数达到最小值 2,且 \mathbf{A}_{PSA} 的条件数与波片 R2 的快轴角度取向无关。即只需要一个任意角度的四分之一波片作为 R2,就可以使得检偏器处于最优化的状态。

此外,为了消除由非偏振分光棱镜引入的残余偏振信息,在实际的测量模型中需要考虑非偏振分束镜透射端和反射端的穆勒矩阵。当结合起偏器并使用显微镜进行空测时,两个线偏振 CCD 可以分别测量得到非偏振分光棱镜透射端和波片 R2 的等效 3×4 穆勒矩阵 $\mathbf{M}_{\text{trans} \& \text{R2}}$ 以及

非偏振分光棱镜反射端的 3×4 穆勒矩阵 $\mathbf{M}_{\text{reflect}}$ 。考虑了分光棱镜的偏振性质后,得到检偏器的仪器矩阵为

$$\mathbf{A}_{\text{PSA}} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}_{\text{DoFP}} \mathbf{M}_{\text{trans} \& \text{R2}} \\ \mathbf{A}_{\text{DoFP}} \mathbf{M}_{\text{reflect}} \end{bmatrix}. \quad (14)$$

将检偏器的仪器矩阵校准后,任意位置处入射光偏振态的检偏结果为

$$\mathbf{S}_{\text{out}} = \mathbf{A}_{\text{PSA}}^{-1} [\mathbf{I}], \quad (15)$$

式中: $[\mathbf{I}]$ 为两路线偏振 CCD 接收的未知入射光的光强信号。

此外,当考虑到显微系统中采用具有大数值孔径的物镜可能引入的退偏和双折射效应时,可以将物镜看作检偏器的一部分,此时物镜的偏振效应会包含在测量得到的检偏器仪器矩阵 \mathbf{A}_{PSA} 中,因而不会对样品的穆勒矩阵测量结果产生干扰。

当搭配起偏器时,可以实现样品全穆勒矩阵测量:

$$\mathbf{M}_{\text{sample}} = [\mathbf{S}_{\text{out}}][\mathbf{S}_{\text{in}}]^{-1}. \quad (16)$$

起偏器采用了固定偏振片 P1 和旋转四分之一波片 R1 的结构,在此基础上讨论了两种不同的起偏方式:1) 根据文献[18]的结果,令 R1 旋转到 4 个特定的角度 ($\pm 45^\circ$ 和 $\pm 19.6^\circ$) 进行起偏,每转动到一个角度时两个线偏振 CCD 进行数据采集,共进行了 4 次采集;2) 令 R1 从 -45° 开始连续旋转 180° 进行起偏,与此同时两个线偏振 CCD 连续采集。在此过程中每个 CCD 分别采集 37 frame 图像,由于 R1 的转动可看作是匀速旋转过程且两个 CCD 均匀采样,因此相邻两帧图像对应的 R1 的转动角度间隔为 5° 。采用起偏方式 2) 时,由于电动旋转位移台不需要在起偏过程中多次加速或减速,且 CCD 的采集和波片 R1 的转动同步进行,因此起偏方式 2) 具有更快的起偏速度。此外,起偏方式 2) 的条件数为 3.537,相比于起偏方式 1) 更小。

为了验证系统进行穆勒矩阵测量的性能,使用系统对标准偏振样品进行穆勒矩阵成像,包括偏振片和实际相位延迟为 92.62° 的波片,以步长 10° 采集了两个标准样品方位角在 $0^\circ \sim 180^\circ$ 区间变化时的数据。共采取了两种不同的起偏方式用于成像,分别记录了各自所需的平均采集时间以评价测量速度,并使用测量得到的各个穆勒矩阵阵元的均值计算平均均方根误差 (root mean squared error, RMSE) 指标以评价测量准确度。此外,还将实验结果与基于双波片旋转的透射式穆勒显微镜得到的结果进行了比较。三种穆勒矩阵成像方法得到的实验

结果如表 1 所示。结果显示,基于双线偏振 CCD 的两种起偏方式均可以取得较高的测量准确度(平均 RMSE 小于 0.01),且起偏方式 2) 相比于起偏方式 1) 在测量准确度上有了进一步的提升。此外,相比于基于双波片旋转的透射式穆勒矩阵显微镜,基于

双线偏振 CCD 的透射式穆勒矩阵显微镜不仅测量时间大大缩短,测量准确度也有所提升,这可能是由于后者整体系统的条件数更小,且后者的检偏器中不包含运动部件,因此波片 R2 的不均匀性引入的误差可以通过逐像素校准被很好地消除。

表 1 三种穆勒矩阵成像方法的平均采集时间、平均 RMSE 和仪器矩阵的条件数^[22]

Table 1 Average acquisition time, average RMSE and condition number of three different Mueller matrix imaging methods^[22]

Imaging method	Acquisition time / s	Average RMSE		Conditional number	
		Linear polarizer	Wave plate	PSG	PSA
DRR-UTMMM	192	0.0126	0.0208	3.612	3.612
DoFPs-UTMMM+ scheme 1	14	0.0070	0.0062	3.677	2.217
DoFPs-UTMMM+ scheme 2	9	0.0069	0.0049	3.537	2.217

4 全偏振显微成像技术应用

使用穆勒矩阵显微镜对样品进行穆勒矩阵显微成像并计算具有明确物理意义的特异性偏振参数,如穆勒矩阵分解(Mueller matrix decomposition, MMD)参数^[33]以及穆勒矩阵变换(Mueller matrix transformation, MMT)参数^[34]等,这些参数可以提供更加丰富的样品特异性微观结构信息。肝癌组织中常伴随有肝纤维化导致的组织炎症反应,根据肝纤维化程度的不同,可以对肝癌阶段进行分期(F1~F4)。

使用基于双波片旋转的透射式穆勒矩阵显微镜分别测量并计算未染色的 F1~F4 期肝癌组织切片的偏振参数显微图像,包括 MMD 参数中的线性相位延迟参数 δ 及其角度参数 θ 、MMT 参数中的 t 参数和 x 参数,其中 F4 期肝癌组织的偏振参数显微图像如图 5 所示^[14]。可以发现,F4 期肝癌组织的偏振参数 δ 和 t 清晰显示组织中纤维结构的分布,而偏振参数 θ 和 x 则显示了肝纤维的不同取向。这意味着偏振参数可以作为肝组织癌变过程中纤维化程度的表征指标。

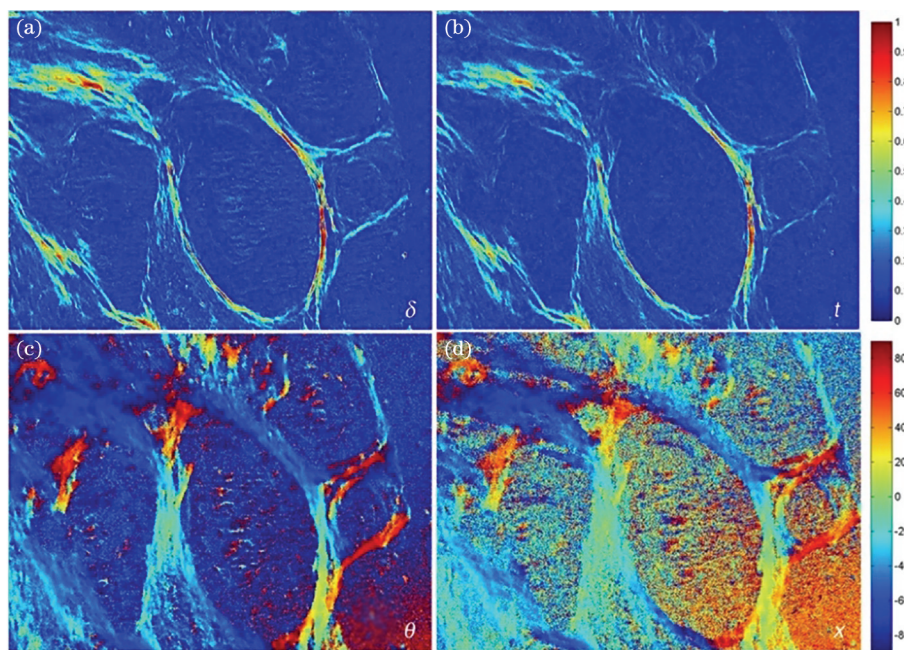


图 5 具有肝纤维化特征的 F4 期肝癌组织的未染色脱蜡切片的偏振参数图像^[14]。(a) δ ; (b) t ; (c) θ ; (d) x

Fig. 5 Polarization parameter images of nonstained dewaxing slice of cancerous liver tissue with fibrosis in F4 stage^[14].

(a) δ ; (b) t ; (c) θ ; (d) x

为了定量分析偏振参数对不同肝癌组织分期的表征作用,计算了 F1~F4 期肝癌组织切片偏振参数图像 δ 和 t 的平均值,如图 6 所示^[14]。可以看到,随着肝癌的发展,两个偏振参数的平均值逐渐增大,

这主要是其表征的样本纤维化程度的增加所导致的。此外,图 7 显示了 F1~F4 期肝癌组织切片偏振参数图像 θ 的分布直方图^[14],结果显示,随着肝癌的发展,参数的分布由相对均匀逐渐收敛到特定

角度,这表明纤维结构的取向主要分布在较窄的范围内。以上结果显示,偏振显微成像技术能够表征非染色病理切片中的纤维取向和分布,有利于辅助

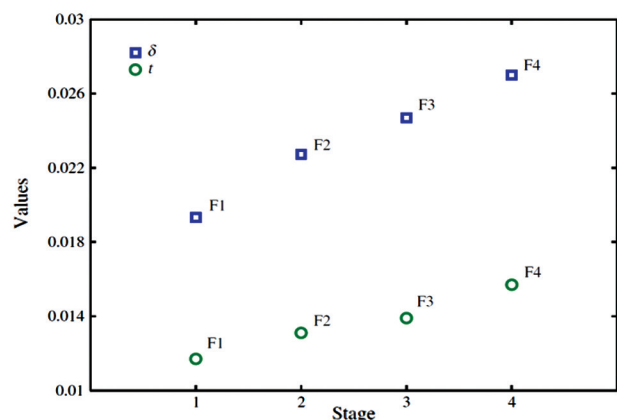


图 6 不同分期肝癌组织切片偏振参数图像 δ 和 t 的均值^[14]

Fig. 6 Average values of δ and t for cancerous liver tissue slice polarization parameter images in different stages^[14]

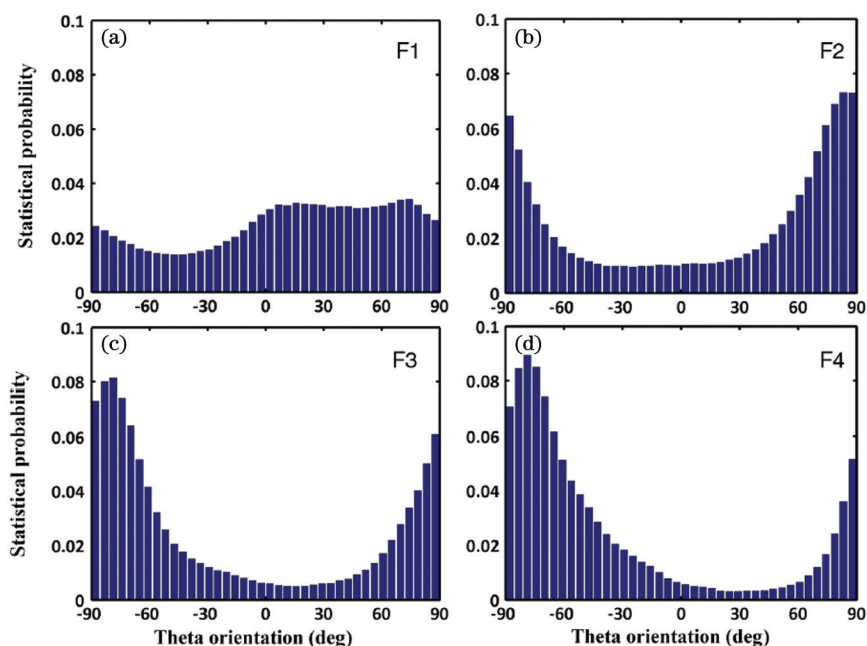


图 7 不同分期肝癌组织切片偏振参数图像 θ 的分布直方图^[14]

Fig. 7 Statistical distribution histograms of θ for cancerous liver tissue slice polarization parameter images in different stages^[14]

为了对活细胞等偏振性质微弱的动态样品进行准确偏振测量,实现采集快速、测量准确的偏振显微成像技术具有重要的意义。利用基于双线偏振 CCD 的透射式穆勒矩阵显微镜测量的血细胞涂片的穆勒矩阵,计算得到二向色性参数 D 以及 m_{12} 和 m_{13} 的方位角 α_D 两个偏振参数图像^[22],结果如图 9 所示。结果显示,即使针对血细胞这样的微弱偏振

肝癌快速诊断。

偏振显微成像具有数据维度大、信息量丰富且结构化强的特点,因此可以通过结合机器学习方法等,将具有已知物理意义的偏振参数作为基底 (polarimetry basis parameter, PBP) 进行训练和组合,有望找到各种样品的微观结构信息和偏振参数之间的联系,从而构建可以定量表征生物组织微观结构的新的特异性偏振特征参数 (polarimetry feature parameter, PFP),扩展偏振显微成像的表征能力,达到准确区分不同病理结构的目标。利用线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 方法提取的偏振特征参数,对四种乳腺组织 (乳腺正常组织、乳腺纤维瘤、乳腺导管癌和乳腺粘液癌) 中的三种典型病理结构 (细胞核、增生纤维和正常纤维) 进行定量表征,结果如图 8 所示。结果显示,偏振特征参数能够定量精准地识别癌变组织中病理结构的种类与分布,可以作为病理组织特定微观结构自动和定量识别的有力工具^[35]。

性质的样品,系统仍然能够以较高的信噪比表征样品的偏振性。相比于背景,血细胞的二向色性被凸显出来,且二向色性参数的方向围绕着血细胞的形状发生连续变化,证明测量的偏振参数具有较高的灵敏度。测量结果证明,当结合更快速的起偏器模块时,系统未来有潜力对活细胞的动态过程进行实时准确的偏振监测。

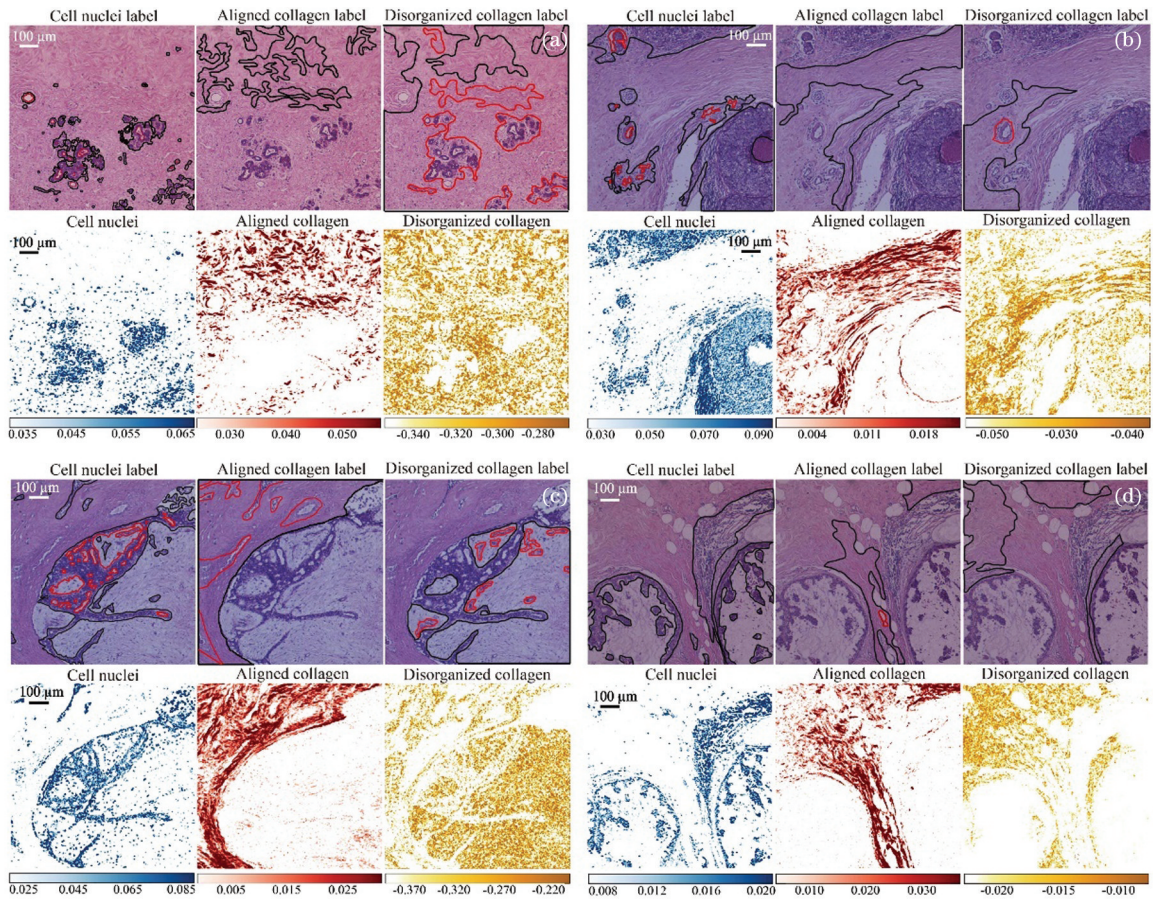


图 8 特异性偏振参数对四种乳腺组织中三种典型病理结构(细胞核、增生纤维以及正常纤维)的定量表征^[35]。

(a) 乳腺正常组织; (b) 乳腺纤维瘤; (c) 乳腺导管癌; (d) 乳腺粘液癌

Fig. 8 Quantitative characterization for three distinctive pathological features (cell nuclei, aligned collagen, and disorganized collagen) in 4 different breast tissues using PFPs^[35]. (a) Healthy breast tissue; (b) breast fibroma; (c) breast ductal carcinoma; (d) breast mucinous carcinoma

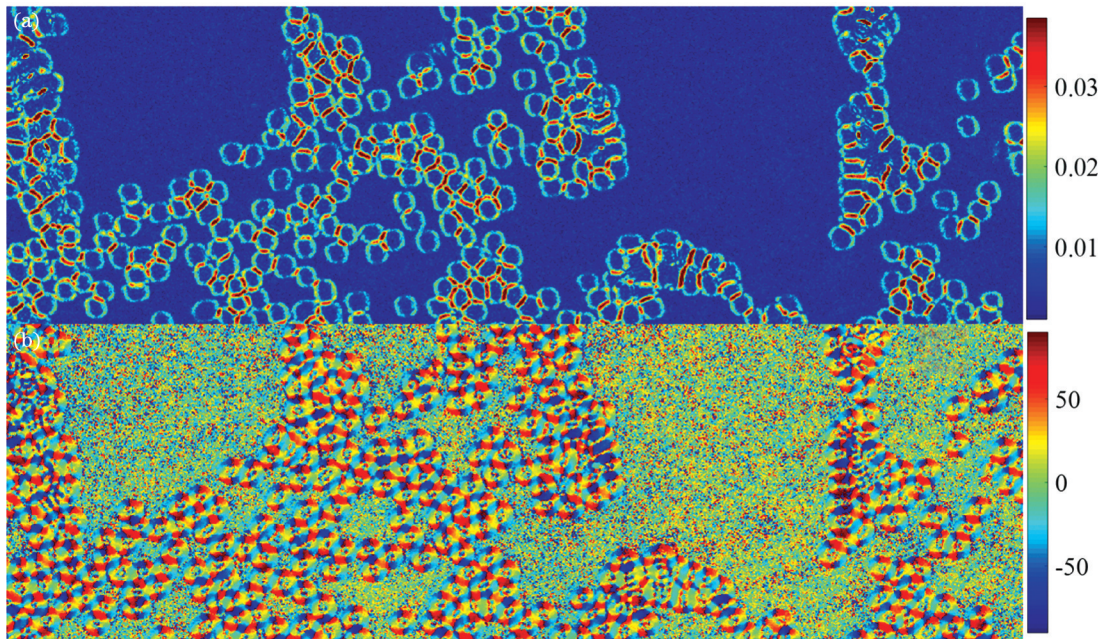


图 9 血细胞涂片的偏振参数图像^[22]。(a) D ; (b) α_D

Fig. 9 Polarization parameter images of red blood cell smear^[22]. (a) D ; (b) α_D

5 总结与展望

作为显微成像和偏振光学技术的结合,穆勒矩阵显微镜可以获取样品丰富的微观结构信息和偏振性质,在生物医学相关领域中发挥重要的作用。本文对基于双波片旋转和基于双线偏振 CCD 的穆勒矩阵显微镜进行了综述,并分别介绍了两类技术各自的特点。

基于偏振光散射的穆勒矩阵显微成像技术具有无标记、无损伤、定量测量的特点,十分适用于针对活体生物体系和动态生物过程的研究。穆勒矩阵显微成像能够获得亚波长光学超分辨尺度下的微观散射颗粒(细胞器等)信息,也能够获得介观和宏观尺度的图像信息,是一种跨尺度成像技术。偏振方法是非偏振光学方法的直接升级,包含非偏振光学所得到的光强信息,这些信息易于被人接受,同时偏振方法能够获得更加丰富的微观结构信息。此外,偏振显微成像还可以与机器学习等数据科学相结合,为研究生物样本的微观结构提供强有力的实验手段。基于以上优点,除生物医学领域之外,穆勒矩阵显微成像技术还在材料识别、纤维含量检测、产品缺陷检测等多个方面具有潜在的应用价值。

现有的穆勒矩阵显微成像技术还有待改进。一是受显微成像原理的限制,成像区域较小,难以直接获取整个样本的偏振信息。在穆勒矩阵显微镜上加装电动扫描位移台并实现全玻片扫描穆勒矩阵成像(Whole slide Mueller matrix imaging, WSMMI)可以解决这个问题。二是相比普通光强显微成像技术,穆勒矩阵显微镜往往包含较多的偏振光学元件和运动部件,这对系统的稳定性和便携性提出了挑战。采取同时性偏振调制技术进行偏振态检测并减少或避免运动部件的使用,有助于提升系统测量的稳定性和准确度,方便技术的推广应用。三是穆勒矩阵显微成像技术如果是在现有传统商业显微镜上升级改造实现的,则偏振测量的准确度会在很大程度上受成像系统内部光学元件的偏振残差的影响。发展有针对性的系统误差校准方法,或者在光路设计上进行优化,可以减小甚至去除成像系统引入的偏振误差。

未来穆勒矩阵显微镜的发展趋势是实现更快的测量速度和更高的测量准确度。更快的测量速度依赖于更加快速可靠的起偏器和基于同时性偏振调制元件的检偏器,而更高的测量准确度则不仅与系统中各个元件的质量和稳定性紧密相关,更取决于以“优化、降噪、校准”为核心的偏振测量系统设计和校

准方法。随着偏振调制与测量技术的不断发展与完善,未来穆勒矩阵显微镜有望实现对活体组织或细胞的动态过程进行实时准确的偏振测量,从而成为推动生物医学领域研究的重要工具。

参 考 文 献

- [1] Antonelli M R, Pierangelo A, Novikova T, et al. Mueller matrix imaging of human colon tissue for cancer diagnostics: how Monte Carlo modeling can help in the interpretation of experimental data [J]. Optics Express, 2010, 18(10): 10200-10208.
- [2] Pierangelo A, Benali A, Antonelli M R, et al. *Ex-vivo* characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging [J]. Optics Express, 2011, 19(2): 1582-1593.
- [3] Pierangelo A, Manhas S, Benali A, et al. Multispectral Mueller polarimetric imaging detecting residual cancer and cancer regression after neoadjuvant treatment for colorectal carcinomas [J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(4): 046014.
- [4] Du E, He H H, Zeng N, et al. Mueller matrix polarimetry for differentiating characteristic features of cancerous tissues [J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(7): 076013.
- [5] Shen Y X, Yao Y, He H H, et al. Mueller matrix polarimetry: a label-free, quantitative optical method for clinical diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207001.
沈元星, 姚悦, 何宏辉, 等. 非标记、量化穆勒矩阵偏振成像在辅助临床诊断中的应用 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207001.
- [6] Inoué S. Polarization optical studies of the mitotic spindle I. The demonstration of spindle fibers in living cells [J]. Chromosoma, 1953, 5(1): 487-500.
- [7] Mickols W, Maestre M F, Tinoco I, Jr. Differential polarization microscopy of changes in structure in spermatocyte nuclei [J]. Nature, 1987, 328(6129): 452-454.
- [8] Oldenbourg R. Analysis of edge birefringence [J]. Biophysical Journal, 1991, 60(3): 629-641.
- [9] Oldenbourg R. A new view on polarization microscopy [J]. Nature, 1996, 381(6585): 811-812.
- [10] Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi J R, et al. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(2): 223-225.
- [11] Wang W H, Meng L, Hackett R J, et al. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination [J]. Human Reproduction, 2001,

- 16(7): 1464-1468.
- [12] Arteaga O, Baldrís M, Antó J, et al. Mueller matrix microscope with a dual continuous rotating compensator setup and digital demodulation [J]. *Applied Optics*, 2014, 53(10): 2236-2245.
- [13] Wang Y, He H H, Chang J T, et al. Differentiating characteristic microstructural features of cancerous tissues using Mueller matrix microscope[J]. *Micron*, 2015, 79: 8-15.
- [14] Wang Y, He H H, Chang J T, et al. Mueller matrix microscope: a quantitative tool to facilitate detections and fibrosis scorings of liver cirrhosis and cancer tissues[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(7): 071112.
- [15] Zhou J L, He H H, Chen Z H, et al. Modulus design multiwavelength polarization microscope for transmission Mueller matrix imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23(1): 016007.
- [16] Chen Z H, Meng R Y, Zhu Y H, et al. A collinear reflection Mueller matrix microscope for backscattering Mueller matrix imaging [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 129: 106055.
- [17] Liu Y, York T, Akers W J, et al. Complementary fluorescence-polarization microscopy using division-of-focal-plane polarization imaging sensor[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(11): 116001.
- [18] Chang J T, He H H, Wang Y, et al. Division of focal plane polarimeter-based 3×4 Mueller matrix microscope: a potential tool for quick diagnosis of human carcinoma tissues[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(5): 056002.
- [19] Roussel S, Boffety M, Goudail F. On the optimal ways to perform full Stokes measurements with a linear division-of-focal-plane polarimetric imager and a retarder [J]. *Optics Letters*, 2019, 44 (11): 2927-2930.
- [20] Li H Y, Li C, Li X B, et al. Optimization of polarization-camera-based full stokes polarimeter[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(3): 0326001.
黎海育, 李抄, 李校博, 等. 基于偏振相机的全斯托克斯偏振仪优化研究 [J]. *光学学报*, 2020, 40(3): 0326001.
- [21] Qi J, He C, Elson D S. Real time complete Stokes polarimetric imager based on a linear polarizer array camera for tissue polarimetric imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8 (11): 4933-4946.
- [22] Huang T Y, Meng R Y, Qi J, et al. Fast Mueller matrix microscope based on dual DoFP polarimeters [J]. *Optics Letters*, 2021, 46(7): 1676-1679.
- [23] Azzam R M. Photopolarimetric measurement of the Mueller matrix by Fourier analysis of a single detected signal[J]. *Optics Letters*, 1978, 2(6): 148-150.
- [24] Dong Y, Qi J, He H H, et al. Quantitatively characterizing the microstructural features of breast ductal carcinoma tissues in different progression stages by Mueller matrix microscope[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(8): 3643-3655.
- [25] Goldstein D H, Chipman R A. Error analysis of a Mueller matrix polarimeter[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1990, 7(4): 693-700.
- [26] Li P C, Lü D H, He H H, et al. Separating azimuthal orientation dependence in polarization measurements of anisotropic media [J]. *Optics Express*, 2018, 26(4): 3791-3800.
- [27] Chen Z H, Yao Y, Zhu Y H, et al. Removing the dichroism and retardance artifacts in a collinear backscattering Mueller matrix imaging system [J]. *Optics Express*, 2018, 26(22): 28288-28301.
- [28] Chen Z Y, Wang X, Liang R G. Calibration method of microgrid polarimeters with image interpolation [J]. *Applied Optics*, 2015, 54(5): 995-1001.
- [29] Zhao F, Cheng X M, Feng B, et al. Comparison research of interpolation algorithms for division of focal plane polarization image [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(16): 161014.
赵峰, 程喜萌, 冯斌, 等. 分焦平面偏振图像插值算法的比较研究 [J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(16): 161014.
- [30] Ratliff B M, LaCasse C F, Tyo J S. Interpolation strategies for reducing IFOV artifacts in microgrid polarimeter imagery [J]. *Optics Express*, 2009, 17(11): 9112-9125.
- [31] Chipman R A. *Handbook of optics* [M]. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 2009.
- [32] Tyo J S. Design of optimal polarimeters: maximization of signal-to-noise ratio and minimization of systematic error[J]. *Applied Optics*, 2002, 41(4): 619-630.
- [33] Lu S Y, Chipman R A. Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1996, 13(5): 1106-1113.
- [34] Li P C, Lü D H, He H H, et al. Separating azimuthal orientation dependence in polarization measurements of anisotropic media [J]. *Optics Express*, 2018, 26(4): 3791-3800.
- [35] Dong Y, Wan J C, Si L, et al. Deriving polarimetry feature parameters to characterize microstructural features in histological sections of breast tissues[J]. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 2021, 68(3): 881-892.

Modular Full-Polarization Microscope

Huang Tongyu^{1,2}, Meng Ruoyu¹, Zhao Qianhao¹, Leng Yan¹, Liao Ran¹,
He Honghui¹, Ma Hui^{1,2,3*}

¹ Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

² Department of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

³ Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract

Significance Polarization imaging technology has the advantages of non-invasive detection, rich information, sensitivity to the microstructure of the sample, and compatibility with traditional optical imaging technology, which makes it suitable for combining with microscopy technology based on staining methods to distinguish the characteristics of different microstructures of pathological tissues. By adding the polarization state analyzer (PSA) and polarization state generator (PSG) modules to the commercial transmission and collinear reflection optical microscopes, the Mueller matrix microscopic imaging can be performed. The Mueller matrix can realize the complete characterization of the polarization properties of the sample.

Progress We have established the upright transmission Mueller matrix microscope (Fig. 1, DRR-UTMMM) and collinear reflection Mueller matrix microscope (Fig. 2, DRR-CRMMM) based on dual rotating retarders in which PSA and PSG modules consist of a fixed linear polarizer and a rotatable quarter-wave plate, respectively. The working principles are based on Fourier coefficient analysis. During each measurement process, two quarter-wave plates rotate with a fixed step angle ratio, and 30 images with different polarization states are collected to reconstruct the Mueller matrix of the sample. In order to eliminate the possible systematic errors and improve the measurement accuracy, the calibration of the Mueller matrix measurement system is necessary. For the transmission system, the analytic calibration method (ACM) is adopted. The systematic errors can be accurately solved by establishing the error model between each systematic error and the measurement signal. For the collinear reflection system, due to the complex relationship between the measurement signal and errors, it is difficult to derive the expression directly, so the numerical calibration method (NCM) is used to calculate the systematic errors and rebuild the system instrument matrix, which has a higher applicable scope and flexibility. In order to perform the fast Mueller matrix imaging, linear polarization CCD based on division of focal plane (DoFP) is used, which is capable of measuring the linear polarization states of light by equipping micro-polarizer array in front of the ordinary imaging sensor. We designed and implemented the upright transmission Mueller matrix microscope based on dual DoFP linear polarization CCDs (Fig. 4, DoFPs-UTMMM). Two linear polarization CCDs are fixed in the transmission and reflection ends of a non-polarized beam splitter, respectively, one of which is equipped with a fixed angle quarter-wave plate. The real-time polarization state analyzer is realized by combining the multi-channel polarization data from two linear polarization CCDs. In order to eliminate the parasitic polarization artifacts introduced by the beam splitter, the Mueller matrix of the beam splitter is considered in PSA instrument matrix after calibration. Two different schemes of PSG are also discussed. The performance of DoFPs-UTMMM is validated by conducting Mueller matrix imaging on standard polarization samples with different azimuths. The results show that DoFPs-UTMMM has a higher measurement accuracy and faster measurement speed compared to DRR-UTMMM, which make it suitable for monitoring dynamic processes or living tissues.

In this article, we also introduce some biomedical applications of the Mueller matrix microscope. By performing Mueller matrix imaging of cancerous liver tissues in different stages and calculating polarization parameters, it can realize the characterization of the degree of liver fibrosis in the cancerous liver tissue (Figs. 5–7). By combining with data technologies including machine learning, new polarization parameters used to quantitatively characterize the microstructure of biological tissues can be derived, which can accurately distinguish specific pathological structures (Fig. 8). Through the fast and accurate polarization measurement of blood cells (Fig. 9), it can be tested that the system has the potential for real time and accurate polarization monitoring of the dynamic process of living cells in the future.

Conclusions and Prospects In this article, we summarize several modular polarization microscopes implemented

in our previous studies, including the transmission Mueller matrix microscope and the collinear reflection Mueller matrix microscope based on dual rotating retarders, as well as the transmission Mueller matrix microscope based on dual linear polarization CCDs. Then we introduce some applications of modular polarization microscope in the biomedicine field. With the combination of microscopy and polarization imaging technology, Mueller matrix microscope can be directly upgraded from ordinary optical microscopy methods. It has the following advantages: suitable for the studies of biological living systems, capable of obtaining cross-scale image information, and easy to be combined with data science technologies. Besides biomedicine, the Mueller matrix microscope can be also applied to many fields including material science, defect detection, etc. There also exist some aspects that need to be improved: relatively small imaging area, and high requirement for system stability and residual polarization artifacts of the optics inside the system. This article puts forward specific suggestions for the above problems. In the future, the development trend of Mueller matrix microscope is faster measurement speed and higher measurement accuracy. With the improvements of polarization modulation and measurement technology, the Mueller matrix microscope is expected to perform real-time and accurate full-polarization measurement of living cells and *in-vivo* tissues, and becomes an important tool to promote biomedical applications.

Key words imaging systems; polarization imaging; microstructure; Mueller matrix; microscope; biomedicine

OCIS codes 110.5405; 120.5410; 110.0180