

## 面向生物样品三维成像的光干涉显微技术研究进展

满天龙, 万玉红\*, 菅孟静, 张文学, 张明华, 马腾, 张沁

北京工业大学理学部, 北京 100124

**摘要** 远场光学显微成像是获取待测样品三维结构信息及其动态变化不可或缺的技术。非接触无损害的快速光学三维显微成像技术在生物细胞、生物组织等生物医学成像领域具有独特的应用优势和巨大的应用需求。受限于目前的光电器件只能实现光强的直接探测, 光学显微三维成像技术往往通过扫描技术、编码技术或数值算法等将光场的相位等信息转换为光强信息, 再通过探测被待测样品调制的光波场强度的变化解析出原始样品的信息, 实现对样品三维形貌、内部结构或折射率分布等多种信息的可视化。利用光波的相干性, 结合适当的分波技巧, 实现两束光的互干涉或自干涉, 将光波场相位信息编码至干涉图样的强度分布中, 然后结合适当的算法对干涉图样进行重建, 是实现光学三维显微成像的一个重要技术。本文对基于光的干涉, 利用干涉条纹的强度提供成像对比度的三维显微成像技术进行综述, 阐明了激光照明的数字全息显微、部分相干光照明的数字全息显微、光学相干断层显微和空间非相干光照明的自干涉数字全息显微成像技术的基本原理、成像特性, 以及该类技术在样品定量相衬成像、三维层析成像、非扫描快速三维显微成像等领域的应用, 同时对该类技术衍生的新技术以及该类技术的未来发展方向进行了详细讨论。

**关键词** 生物光学; 显微; 三维成像; 显微成像; 干涉; 数字全息显微; 光学相干层析; 非相干全息; 荧光自干涉定位

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507202

### 1 引言

远场光学显微成像技术以其易操作和对生物样品无侵害、低损伤的特性, 被广泛应用于生物领域的科学研究和临床医学诊断中。近年来, 随着多种光学和化学操控技术的建立以及光电探测元件的不断发展, 远场光学显微成像的分辨率、速度和信噪比等得到了突破性提升。荧光超分辨三维显微成像技术使细胞内纳米尺度的结构或蛋白质的动态得以可视化, 极大地增强了人们对具体生命过程中生物学或生物物理学机理的理解。在显微成像过程中, 被样品信息调制的物光波的振幅和相位携带了吸收系数和折射率分布等有关样品结构和特性的重要信息。现有的光电探测器件只能实现对光强的直接探测, 不能直接探测光波的相位。光电探测器件的局限, 促使人们发展新的光学显微成像技术, 以实现样品相位信息的获取或三维显微成像。其中, 利用光的干涉将相位信息转化为强度信息是光学显微成像技术发展中的一个重要突破。干涉成像技术的基本原理是实现物光波的相位在干涉图样强度分布中的定量编码。在重建过程中对物光波的振幅和相位信

息进行提取和利用, 便可以利用相位、折射率分布与三维形貌等的对应关系恢复出样品的结构和功能信息。同时, 振幅和相位信息还可以用于描述物光波在三维空间中的传播过程以及获取任一轴向平面上的光强分布, 进而实现对样品的快速非扫描三维成像。

光的干涉一直在不同类型的显微镜中发挥着重要作用<sup>[1-10]</sup>。干涉显微成像是将光干涉和显微结合起来的技术。本文所指的光干涉显微成像技术界定为基于样品的物光(样品被激发出的荧光、被样品散射的照明光等)与相适应的参考光干涉, 利用干涉图提供的成像对比度(强度、相位)实现三维显微成像、定量相衬成像或三维层析成像的技术, 例如数字全息<sup>[2-6]</sup>、光学相干断层成像(OCT)<sup>[7]</sup>、自干涉数字全息<sup>[8]</sup>等。这类技术都是直接利用光干涉对样品的形貌进行测量的显微成像技术。此外, iPALM<sup>[9]</sup>、自干涉荧光显微(SELFI<sup>[10]</sup>)等可以认为是结合光干涉提升成像性能的技术。本文着重阐述了利用光干涉图提供的成像对比度实现三维显微成像的技术, 并依据显微成像机理对光干涉三维显微成像技术进行了简要的梳理和分类, 如表 1 所示。

收稿日期: 2022-01-11; 修回日期: 2022-02-18; 录用日期: 2022-02-28

通信作者: \*yhongw@bjut.edu.cn

表 1 光干涉三维显微成像技术对比

Table 1 Comparisons of different optical interference three-dimensional microscopic imaging techniques

Technique	Illumination	Advantage	Limitation	Spatial imaging resolution	Potential applications
Digital holography	Spatially and temporally coherent	Non-scanning three-dimensional (3D) imaging, quantitative phase contrast imaging	Coherent noise, phase wrapping, hard to access the structures inside the samples	Diffraction limited	Morphology of biological samples
Partially coherent digital holography	Partially coherent	Quantitative phase contrast, low speckle noise	Necessary sample/system scanning, phase wrapping	Diffraction limited	3D phase contrast imaging of biological samples
Optical coherence tomography	Partially coherent	3D tomography, high axial resolution	2D/3D scanning is necessary	Lateral: diffraction limited, axial: on the micrometer order	Ophthalmology imaging, endoscopic tomography
Incoherent digital holography	Spatially incoherent, temporally coherent	Non-scanning 3D imaging for fluorescent/spatial incoherent sample	Limited signal-to-noise ratio	Lateral: $\sim 100$ nm, axial: less than diffraction limited	3D super resolved fluorescence microscopy

利用物光与一束参考光的干涉,可以从所获得的干涉图样强度分布中实现物光振幅和相位的同时定量探测。数字全息技术根据上述原理恢复出完整的物光场,然后通过数值计算实现快速的三维成像。此外,数字全息技术还可实现定量的相衬成像,并可重建样品的折射率分布。结合强度和折射率分布图像,数字全息显微可以更好地建立细胞的结构改变与其内在特性变化之间的联系。因此,数字全息技术在生物医学成像领域具有独特的优势<sup>[11]</sup>。此外,对部分相干光源进行合理的开发和利用,可以很好地解决相干散斑噪声对传统数字全息技术成像质量的影响。利用时间相干性阈值提供的切片效应,可以使基于部分相干光干涉的数字全息显微和 OCT 技术实现样品的层析成像,为样品三维结构的观察提供了一种重要手段。OCT 技术一经提出便得到了快速发展,并已在人眼成像等临床医学检测领域展现出了不可替代的优势<sup>[12]</sup>。

近几年发展的自干涉数字全息技术将数字全息技术的应用扩展至自然光、荧光等空间非相干光领域,使其优势在显微生物成像领域得以展现<sup>[13]</sup>。与传统的荧光显微技术相比,自干涉数字全息显微可以实现非扫描三维成像,在成像速度上更具优势,而且成像分辨率可以突破衍射极限<sup>[14]</sup>。结合数值算法,该技术还可以对系统中的光学像差进行校正,提升该技术在成像应用中的性能<sup>[15]</sup>。因此,自干涉数字全息显微技

术近年来获得了较多关注,并在荧光显微成像领域展现出了独特的应用潜力。除了上述技术外,近年来还出现了其他基于荧光自干涉的超分辨率三维显微成像方法,不断地对现有显微技术的各项性能指标进行优化和提升。

综上所述,基于光干涉的显微成像技术可以实现样品的快速三维成像或定量相衬成像。这些特性使得此类技术能够在生物学成像领域对目标的空间结构或光学特性改变进行动态追踪,有利于揭示具体生命过程中的更多细节和机理。基于光干涉的显微成像技术近年来得到了诸多关注并实现了快速发展。本文对基于物光与相适应的参考光干涉并利用干涉图提供的成像对比度实现三维显微成像或相衬显微成像的数字全息、OCT、自干涉数字全息和荧光自干涉三维显微术的基本原理、实现方法、技术优势和局限、应用领域,以及潜在的发展方向进行综述。

## 2 光干涉的基本原理以及几种主要的实现机理

光源的相干性可以描述为空间相干性和时间相干性。如果要使两束光发生干涉,则参与干涉的两束光需要满足一定的相干条件。根据照明光源的相干性以及干涉成像机理,设计配置相应的光路,就可以实现物光与参考光的干涉。干涉光场的强度  $I_H(x, y)$  分布可以描述为

$$I_H(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + O^*(x, y)R(x, y) = o^2(x, y) + r^2(x, y) + 2o(x, y)r(x, y) \cdot \cos^2\{j[\phi_o(x, y) - \phi_r(x, y)]\}, \quad (1)$$

式中： $O(x, y) = o(x, y) \exp[j\phi_o(x, y)]$  为物体的透射光波或散射光波在记录平面上的复振幅分布，其中  $o(x, y)$  和  $\phi_o(x, y)$  分别为物光波在记录平面上的振幅和相位分布； $R(x, y) = r(x, y) \exp[j\phi_r(x, y)]$  为相干参考光波，其中  $r(x, y)$  和  $\phi_r(x, y)$  分别为参考光在记录平面上的振幅和相位分布。由式(1)可见，全息记录平面上的干涉图样强度分布中定量地编码了物

光的复振幅信息。当参考光的振幅  $r$  和相位  $\phi_r$  已知，且可通过某一方法(例如离轴记录或同轴相移)将直流项  $o^2(x, y)$  和  $r^2(x, y)$  去除时，便可以通过某种光学方法或数值方法，获取完整的物光波前，即物光波的振幅和相位。图 1 列举了在空间相干、部分空间相干和空间非相干的准单色光照明情形下实现两束光干涉的光路配置示意图。

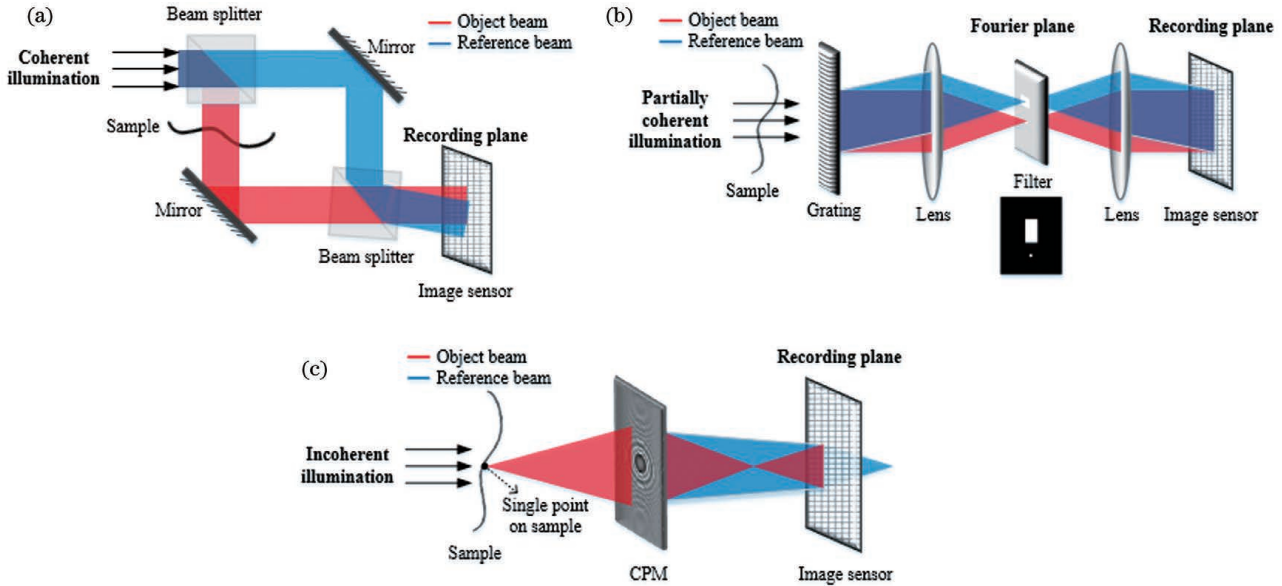


图 1 不同照明情形下实现物光和参考光干涉的几种主要机理。(a)相干照明；(b)部分相干照明；(c)空间非相干照明，其中 CPM 表示通过计算生成的用于分波的相位掩模版

Fig. 1 Several main mechanisms for object- and reference-beam interference under different illumination conditions. (a) Coherent illumination; (b) partially coherent illumination; (c) spatial incoherent illumination, where CPM is the computer-generated phase mask for beam dividing

图 1(a)所示情形对应的是典型数字全息记录光路。相干光源在照射到样品前即被分为两束，一束光被样品调制为物光后继续传播至记录平面，另一束光(参考光)则未经样品调制，而是直接通过系统到达记录平面。物光和参考光中任意两点都是空间互相干的。对于该类系统，在记录平面上，参考光一般是具有复振幅分布已知的平面波或球面波，而物光的复振幅分布与物体的复振幅透过率之间通常具有定量的对应关系，而且可以用菲涅耳衍射和共轭成像等理论描述。基于这种完整记录波前的方式，物光波的相位分布中包含了有关样品深度方向的结构信息，因此可以从二维全息图中实现样品的三维重建。

图 1(b)所示情形对应的是自参考数字全息的记录过程，一般用于部分相干照明系统。考虑到要充分利用光源的相干性，部分相干照明系统在光路配置上需要采用适当的分波方式。其中参考光是通过适当的方式(如低通空间滤波)从照射样品后的物光中获得的。在记录平面上，由于滤除了高频信息，参考光可以近似认为是复振幅分布已知的平面波或球面波，而物光的复振幅与完全相干照明下的传统数字全息系统类似，定量编码了有关物体复振幅透过率的信息。与传统的数字全息系统相似，部分相干照明的数字全息系

统通过记录和恢复物光波完整波前的方式实现样品的三维成像。

在空间非相干准单色光照明或荧光作为光信号的情形下，光场中的任意两点不具有空间互相干性，此时需要针对物体上的某一个点光源进行分析。物光和参考光均来自同一个点光源，参考光是利用特殊的光路配置或光电器件从物光中分离获得的，与物光是空间自相干的。如图 1(c)所示，参考光与物光分别被会聚到不同的轴向平面，在两光束重合区域进行自干涉，形成对应物点的全息图。自干涉全息系统中所记录的全息图可以理解成是由无数点源全息图非相干(光强)叠加形成的。所记录的干涉光场的强度分布可以写成

$$I_H(x, y) = \sum_{z=1}^n O(x, y | z) \otimes \text{PSH}(x, y | z), \quad (2)$$

其中，

$$\text{PSH}(x, y | z) = o_1^2(x, y) + o_2^2(x, y) + 2o_1(x, y)o_2(x, y)\cos^2(\varphi_1 - \varphi_2), \quad (3)$$

式中： $O_1(x, y | z) = o_1(x, y | z) \exp[j\varphi_1(x, y | z)]$  和  $O_2(x, y | z) = o_2(x, y | z) \exp[j\varphi_2(x, y | z)]$  分别表示来自同一物点的参与干涉的两束光波在记录平面上的复振幅分布； $\text{PSH}(x, y | z)$  为物点的全息图，也称为表征系统特性的点扩散函数； $\varphi$  为物点发出光波的相位；

$z$  代表轴向空间位置;  $\otimes$  表示二维卷积操作。点源全息图的强度分布通常与菲涅耳波带片类似, 但其所编码的信息的物理意义与传统数字全息记录的情形不同。类菲涅耳波带片的点源全息图的条纹中心位置编码了该点源的横向位置, 疏密条纹编码了点源的深度位置。与传统的数字全息相比, 自干涉全息可以实现针对点光源的波前探测。因此, 自干涉全息术可以实现样品的非扫描三维重建。但是, 由于光源的空间非相干性, 全息图的复振幅分布中不含有关于样品相位或折射率分布的定量信息。另外, 点源全息图的相位分布  $\varphi_1 - \varphi_2$  会受到光学像差的影响, 并且包含了与系统光学像差相位分布有关的信息。需要注意的是, 由于物光和参考光中均携带有相位信息, 点源全息图中包含的有关光学像差的信息是物光与参考光的差分信号, 一般不能与系统光瞳的相位分布直接对应。

在全息图的重建方面, 基于相干光照明的传统全息术通常使用一束相干光波照射全息图, 在全息图后某一距离处可以接收到样品清晰的聚焦重建像; 而数字全息术采用数码相机记录全息图, 并通过计算机中模拟的光波菲涅耳衍射和传播过程进行全息重建。假设全息图的强度分布为  $H(x, y)$ , 则全息重建像的复振幅分布  $U$  可以描述为

$$U(x, y) = H(x, y) \otimes \exp\left[-\frac{j\pi}{\lambda z_r}(x^2 + y^2)\right], \quad (4)$$

式中:  $\lambda$  代表光波长;  $z_r$  表示重建距离。通过改变  $z_r$  的值可以重建不同深度处样品的二维结构分布。图 1 所示的三种全息记录情形均可利用式(4)重建, 设置不同的重建距离便可以对样品进行三维重建。需要注意的是, 由于照明光源和记录光路的区别, 基于单幅全息图重建样品强度分布时, 采用激光或部分相干光照明的数字全息系统可以得到不同深度平面的清晰的聚焦重建像。自干涉全息也可以实现类似的三维重建。基于单幅全息图重建样品相位分布时, 采用激光或部分相干光照明的数字全息系统可以实现定量重建, 但只能反映出样品的形貌而不能重建样品的内部信息。自干涉全息由于光源相位的随机分布而不能重建样品的相位分布。此外, 其他干涉成像技术也可以利用不同的方式进行重建, 例如, 频域 OCT 直接对所记录的干涉图样进行离散傅里叶逆变换便可以重建样品沿轴向的层析结构分布。值得注意的是, 由于轴向的欠采样问题(是由二维全息图恢复三维信息导致的), 数字全息技术本身并不能实现真正的三维层析成像, 还要结合多角度照明、波长复用等其他技术。

### 3 数字全息显微及其在生物样品三维成像领域的应用

Gabor<sup>[16]</sup> 提出的全息成像技术, 可以实现从物光和参考光干涉产生的强度图中恢复物光的完整波前(振幅和相位), 从而得到物体的三维像。数字全息利

用现代电荷耦合器件(CCD)或半导体金属互补氧化物(CMOS)器件实现全息图的高信噪比记录, 进而可以在计算机中对所获得的数字全息图进行处理。与传统的光学显微成像方法相比, 数字全息显微在全息图的后处理上具有显著优势。例如, 在数值算法中可以首先模拟一束光波照明到所记录的全息图上, 而后通过衍射传播计算光波的复振幅被全息图调制后在自由空间或给定光学系统中传播的过程, 并获得任意平面上的复振幅分布, 从而仅需单幅全息图便可以实现样品中任意深度处空间结构的三维重建。在生物样品显微成像领域, 数字全息显微作为一种全场、非侵入、无需标记样品的三维成像技术, 得到了广泛关注并实现了快速发展。接下来, 本文分别对使用高度相干激光照明的数字全息显微技术以及使用部分相干光源照明的短相干数字全息显微技术及其在生物医学成像领域的应用进行介绍。

#### 3.1 激光照明的数字全息显微成像

激光器的发明为全息术提供了良好的高度相干光源, 离轴全息<sup>[17-18]</sup>、反射全息、白光再现照明全息、数字全息等一系列技术的提出和发展, 使全息术焕发出蓬勃的生命力, 并被应用到各个领域。数字全息技术的出现使样品的定量相衬成像成为可能, 并引领了 20 世纪 90 年代末离轴数字全息显微成像技术的快速发展。图 2 给出了典型离轴数字全息显微系统的光路结构<sup>[2]</sup>。激光器发出的光经过扩束后, 被分束棱镜 BS1 分为两束: 物光透射照明样品 S 并被显微物镜 MO1 收集, 之后经分束棱镜 BS2 反射后到达 CCD 探测器; 参考光直接通过另一个显微物镜 MO2 后透过分束棱镜 BS2 到达相机, 并与物光产生干涉。调节 BS2 的角度, 可在物光与参考光的传播方向之间引入一个夹角, 形成离轴记录配置。因为物光和参考光经过不同的传播路径, 并以一定的夹角入射到探测器平面, 所以这类系统可以称为非共路离轴系统。离轴全息显微系统中不一定要布置单独的参考光路径, 参考光还可以通过在空域或频域内进行空间滤波或使用特殊光学元件的方式, 从物光中分离得到<sup>[19-23]</sup>, 如图 3 所示。

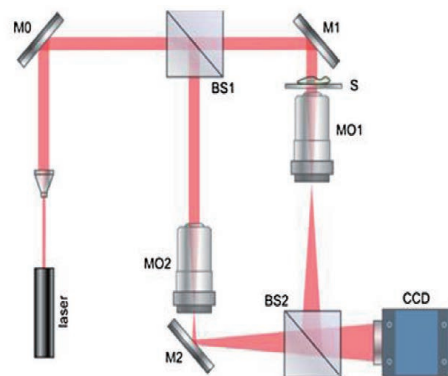
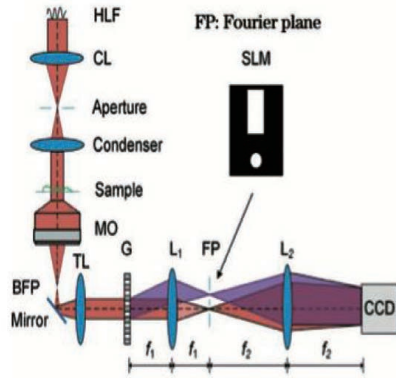


图 2 典型离轴数字全息显微系统的光路结构<sup>[2]</sup>

Fig. 2 Optical path structure of conventional off-axis digital holographic microscopy system<sup>[2]</sup>

图 3 共路离轴数字全息显微系统的光路图<sup>[23]</sup>Fig. 3 Optical path of common-path off-axis digital holographic microscopy system<sup>[23]</sup>

利用图 2 或图 3 所示的系统获取样品的全息图, 然后在计算机中对单幅全息图进行重建, 便可快速恢复出包含样品光学厚度和折射率分布的相位信息<sup>[24-33]</sup>, 而且定量获取的相位信息还能与其他物理量相联系。结合自动聚焦算法, 在数字全息重建过程中寻找重建图像质量评价参数极值对应的重建距离, 可以实现样品的三维成像<sup>[2, 34-44]</sup>。基于数字全息显微技术的成像特性, 该技术已在样品力学特性的动态测量<sup>[26, 45]</sup>、液体中悬浮微粒三维位置的快速定位、生物细胞的三维形貌检测、定量相衬成像领域得以持续推进<sup>[2, 44]</sup>。

生物细胞的形态变化往往与其生理特性有着紧密联系。然而, 细胞属于相位型物体, 对可见光的吸收系数往往较小, 相当于透明样品, 对其进行直接成像时, 对比度较低。数字全息技术利用光的干涉将相位信息编码于干涉条纹的强度中, 能够从单幅全息图中快速地重建样品的相位分布, 实现细胞的高对比度观察。采用快速的定量相衬显微成像技术, 可以在细胞培养过程中对其形貌或内部折射率变化进行实时观测, 有利于揭示其结构与功能之间的联系或及时发现病变等。采用数字全息显微技术对活生物细胞进行定量相衬成像, 不仅可以对细胞形貌和折射率变化进行高对比度观察<sup>[45-49]</sup>, 还可以对血管形貌与视网膜层光学厚度之间的联系进行研究<sup>[49]</sup>, 也可以对活造骨细胞进行长期定量观察, 以分析细胞在不同环境下的时空形态改变<sup>[50]</sup>。图 4 给出了利用数字全息显微定量相衬成像技术对不同形状血红细胞进行区分并分别计算单个细胞体积的实验结果<sup>[51]</sup>。根据全息图重建获取的细胞生物学参数与形貌信息, 可以分析其与各类病理学变化之间的联系。此外, 数字全息显微技术可被应用于神经科学的具体研究中。除了可以对神经细胞进行相衬成像外, 还可以利用细胞的神经活动与其内部光学特性之间的联系进行更为具体的研究。将数字全息相衬显微与电生理学探测相结合, 可以对跨膜离子电流强度与细胞脱水量之间的关系进行精确研究。如

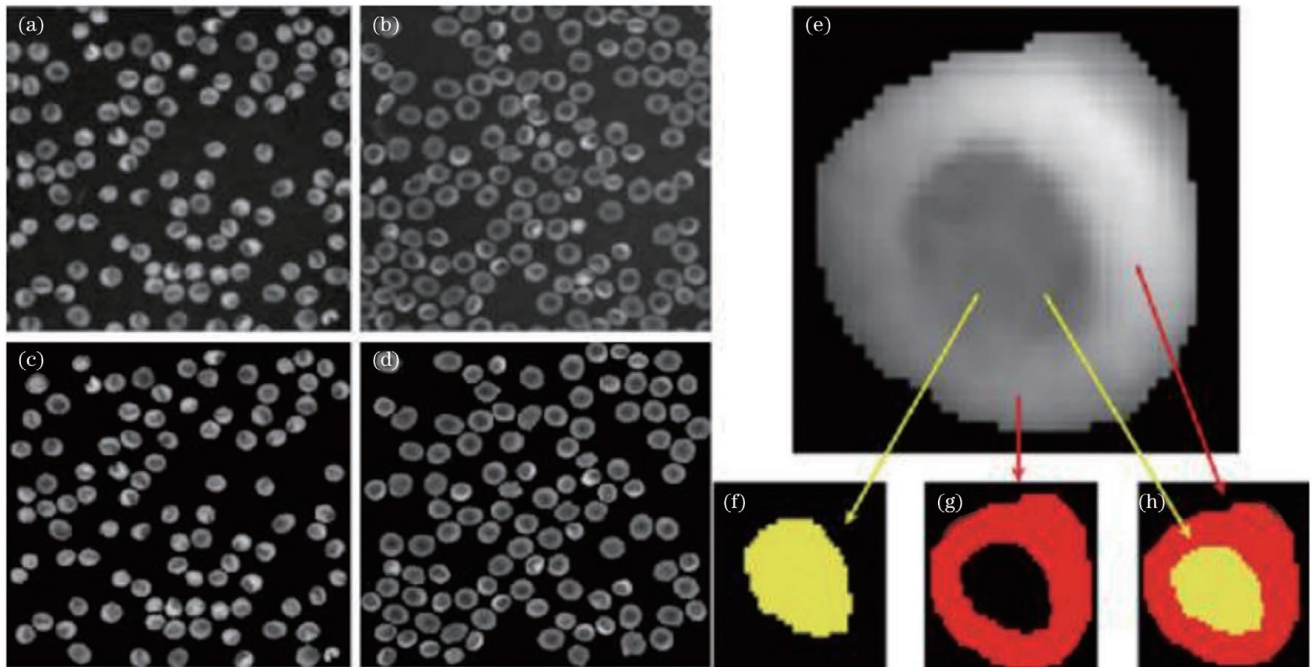


图 4 血红细胞的相位重建图像<sup>[51]</sup>。(a) 口形血红细胞的相位重建图; (b) 盘状血红细胞的相位重建图; (c) 经分水岭算法处理后的口形血红细胞的相位图; (d) 经分水岭算法处理后的盘状血红细胞的相位图; (e) 分割后得到的单个血红细胞的相位图像; (f)(g)(h) 经标记分水岭算法进一步分割得到的图像

Fig. 4 Reconstructed red blood cells (RBCs) phase images<sup>[51]</sup>. (a) Reconstructed phase image of stomatocyte; (b) reconstructed phase image of discocyte; (c) reconstructed phase image of stomatocyte after processing by watershed segmentation algorithm; (d) reconstructed phase image of discocyte after processing by watershed segmentation algorithm; (e) phase image of individual RBC obtained after segmentation; (f)(g)(h) images obtained by further segmentation of phase image of individual RBC with labeled watershed segmentation algorithm

图 5(b)所示,用谷氨酸盐(500  $\mu\text{mol/L}$ , 200 ms)刺激神经细胞后引起了与细胞内向电流(灰色曲线)相互关联的相位信号曲线[黑色曲线,提取自图 5(a)中黑色

圆圈所示区域]的短暂下降。研究结果表明,渗透作用下细胞含水量的改变伴随着离子电流强度的变化<sup>[52]</sup>。这一研究结果可用于对神经细胞凋亡的早期探测。

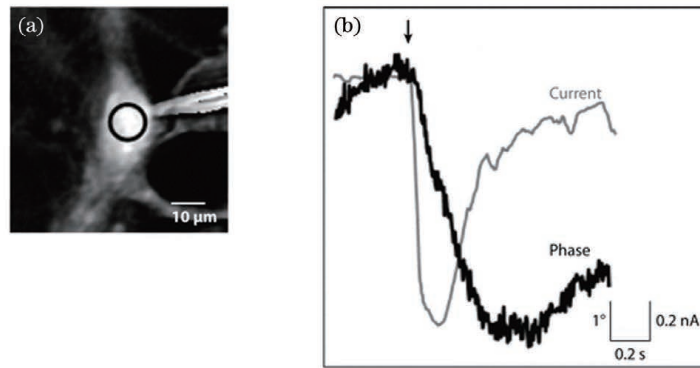


图 5 数字全息相衬显微用于监测神经细胞活动<sup>[52]</sup>。(a)鼠皮层神经细胞的定量相衬显微成像结果;(b)刺激神经细胞后引起相位急剧短暂下降

Fig. 5 Monitoring of neural cell dynamics using digital holographic phase contrast microscopy<sup>[52]</sup>. (a) Quantitative phase contrast image of a patched mouse cortical neuron; (b) local excitation on the neuron triggered a strong transient decrease of phase signal

数字全息显微术的另一个独特优势是可以在样品或显微物镜不进行轴向移动的前提下,快速地从所获取的全息图中实现样品的三维重建,即可以实现非扫描三维成像。例如,利用数字全息显微系统可以对微

球以及硅藻、黑腹果蝇等生物样品进行非扫描三维显微成像<sup>[53]</sup>。对乳胶微球以及悬浮在明胶中的亚铁磁珠进行的实验和分析,证明了全息三维重建的分辨率可以达到亚微米级<sup>[54]</sup>。如图 6 所示,利用数字全息显

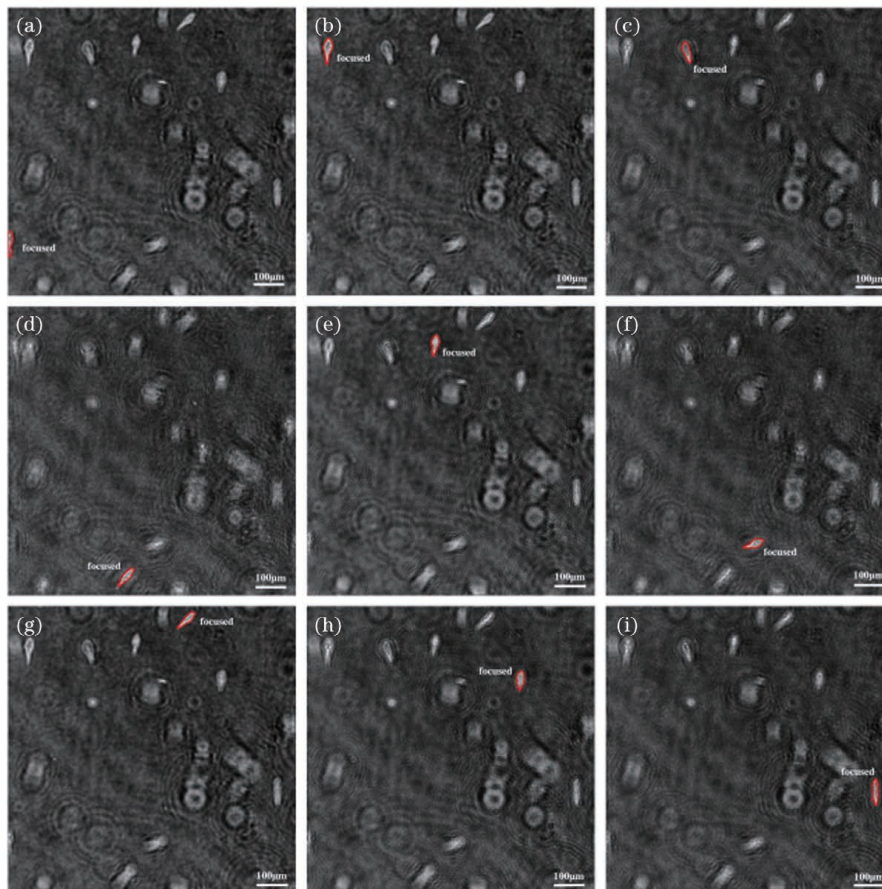


图 6 不同深度平面处浮游生物的聚焦像<sup>[55]</sup>。(a)0.960 mm;(b)0.995 mm;(c)3.268 mm;(d)12.010 mm;(e)2.090 mm;(f)8.620 mm;(g)1.050 mm;(h)3.039mm;(i)4.440 mm

Fig. 6 In-focused reconstructed images at different depth-planes<sup>[55]</sup>. (a) 0.960 mm; (b) 0.995 mm; (c) 3.268 mm; (d) 12.010 mm; (e) 2.090 mm; (f) 8.620 mm; (g) 1.050 mm; (h) 3.039mm; (i) 4.440 mm

微系统,可对  $5\sim 100\ \mu\text{m}$  的微型浮游生物进行三维成像和准确识别<sup>[55]</sup>。结合多角度照明和波长复用技术的数字全息系统还可以在较大体积内对生物样品三维运动轨迹的追踪<sup>[56-57]</sup>。根据数字全息显微系统测量得到的微球和血红细胞的三维运动轨迹和运动速度,可以对液体的流动模式进行定量分析<sup>[58]</sup>,因此,数字全息显微技术可以进一步应用于血流动力学领域,实现圆形微管中血红细胞运动模式的分析<sup>[59]</sup>。数字全息显微成像还可以被应用于血红细胞动力学特性分析<sup>[60]</sup>、水中气泡场三维分布研究<sup>[61]</sup>以及海洋浮游生物几何参数测量等领域<sup>[62]</sup>。

尽管离轴全息显微系统使用的是相干性较高的激光光源,但当物光路径和参考光路径之间的光程差较大时,全息图干涉图样的对比度可能会下降,从而降低了重建像的信噪比等成像性能。与之相比,同轴全息显微技术的光路系统更加简单,系统稳定性更高,而且对机械振动更不敏感。同时,同轴全息系统对空间带宽的利用更加充分,在相同数值孔径下能提供的空间分辨率更高。与 Gabor 提出全息术之初使用的光路配置相似,同轴全息将样品的散射光波作为物光,将直透光作为参考光,因而不需要设置额外的参考光路径。然而,重建像与其孪生像、零级项之间的相互交叠会影响同轴全息系统的成像质量。结合不同的数值算法,

通过使用不同的约束条件以及在全息图和重建像之间进行多次传播迭代,可以很好地解决孪生像和零级项的干扰问题,并可以实现样品的三维成像或重建其相位分布<sup>[63-67]</sup>。目前,同轴全息显微系统已被广泛应用于生物医学和环境监测中<sup>[68]</sup>。如图 7 所示,将无透镜的同轴数字全息、强度传输方程及多平面迭代相位恢复等技术结合,可以实现对病理学切片的三维大视场高分辨率成像<sup>[69]</sup>。在图 7(a)所示的结果中,两个白色方框分别示意了 20 倍和 40 倍显微物镜所能提供的视场。图 7(b)和图 7(c)中分别给出了黄色方框所示部分的无透镜全息重建结果与 40 倍显微物镜直接成像结果的对比。可见,在不牺牲空间分辨率的前提下,该技术能提供比传统显微镜更大的成像视场。近年来,数字全息研究领域重要的研究方向之一是通过结合其他技术或器件实现成像模式的扩展或功能性的提升。例如,结合微流控通道器件,可以研究不同环境下细胞形貌的动态变化<sup>[69]</sup>。将片上(on-chip)无透镜数字全息技术与波长扫描技术结合所实现的大视场高分辨率快速定量相衬显微成像系统,在面向生物样品的实时观测应用中具有极大的潜在应用优势<sup>[70]</sup>。有关无透镜数字全息显微技术及其在生物医学成像中的应用可参见文献<sup>[68]</sup>。

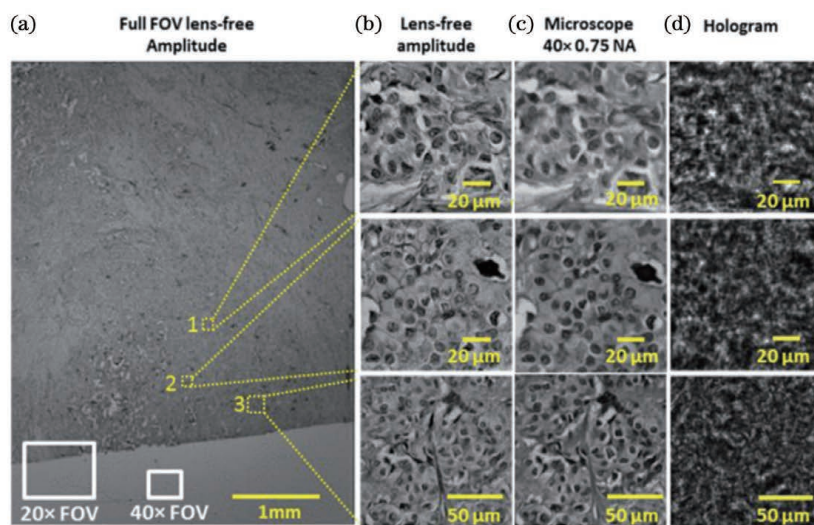


图 7 基于无透镜同轴数字全息实验系统的大视场高分辨率生物样品显微成像结果<sup>[68]</sup>。(a)人乳腺导管癌细胞的无透镜全息大视场振幅重建像;(b)图(a)中黄色方框区域的放大显示;(c)传统显微成像结果;(d)全息图

Fig. 7 Large field-of-view and high resolution microscopy imaging of biological samples based on lens-free coaxial digital holographic system<sup>[68]</sup>. (a) Full field-of-view lens-free amplitude image of invasive ductal carcinoma of human breast; (b) zoomed-in regions outlined by the yellow squares in Fig. (a); (c) traditional microscopy imaging; (d) holograms

此外,针对弱散射或反射型样品,可以采用适用性更广的同轴相移全息显微术进行观察。该技术首先在参考光相位中依次引入至少 3 个不同的常数相移值,用于分别记录对应的全息图,而后通过数值计算便可实现孪生像和零级项的抑制<sup>[71]</sup>。在实际系统中,可使用高精度压电陶瓷器件驱动反射镜或空间光调制器直接调制的方式实现相移。结合广义相移方法可以降低

对相移器件精度的要求,并有效降低系统的成本<sup>[72-76]</sup>。然而,分时采集多幅相移全息图会导致系统成像速度下降,不利于对动态样品或动态过程的观察。如图 8 所示<sup>[77]</sup>,并行相移技术利用安装在相机前面的微型偏振器件阵列,实现空间复用相移全息图的记录,因而提高了系统的成像速度,实现了单次曝光的相移全息成像<sup>[77-81]</sup>。空间复用会导致全息图欠采样,进而

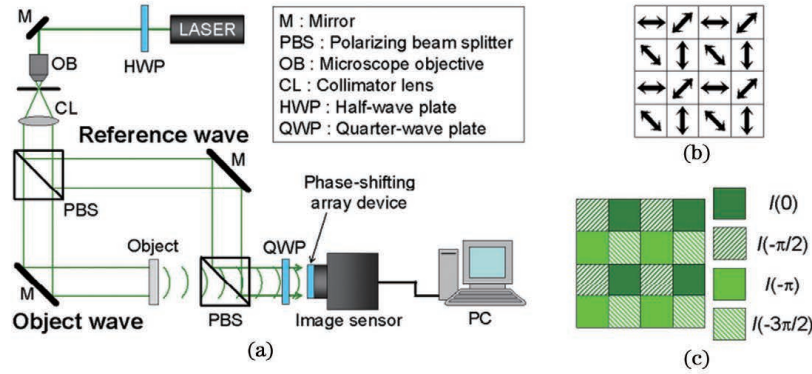


图 8 并行相移数字全息光路图及原理示意图<sup>[77]</sup>。(a)光路图；(b)安装在图像传感器前的空间复用偏振器件的细节；(c)在记录的全息图中，不同像素上记录的信号具有不同的相移值

Fig. 8 Scheme of optical path and basic principle of parallel phase shifting digital holography<sup>[77]</sup>. (a) Optical path; (b) details of spatial-multiplexed parallel polarizing component that mounted in front of image sensor; (c) in the recorded hologram, different phase shifting values are assigned to different pixels

产生噪声，采用并行相移数字全息与插值算法<sup>[77-79]</sup>或压缩感知算法<sup>[80]</sup>相结合的方法可以对这些噪声进行有效抑制。

对于数字全息显微而言，若要实现真正的三维成像(三维层析成像)，除了需要改进技术以提升成像的分辨率、信噪比、成像速度等指标外，还有一个待解决的问题，即，从一幅二维全息图中重建三维信息的轴向维度欠采样问题。压缩感知恰好提供了一个可由欠采样的探测数据不失真地重建原始数据的数学模型，也为解决数字全息轴向欠采样问题提供了一个可靠途

径。近年来，结合压缩感知的数字全息技术被提出并得以快速发展。压缩感知首先假设样品在某一变换域中可被稀疏表示，然后通过求解最优化过程对样品的三维结构进行估计。对于结构分布较为简单的样品，同轴数字全息成像过程可以被近似认为是一个稀疏化的编码过程<sup>[82]</sup>。如图 9 所示，结合同轴数字全息与压缩感知算法，可以从单幅全息图中实现三维样品的层析重建<sup>[82]</sup>。此外，结合深度学习等其他数值算法的全息三维重建方法近年来得到了广泛关注和快速发展<sup>[83-85]</sup>。

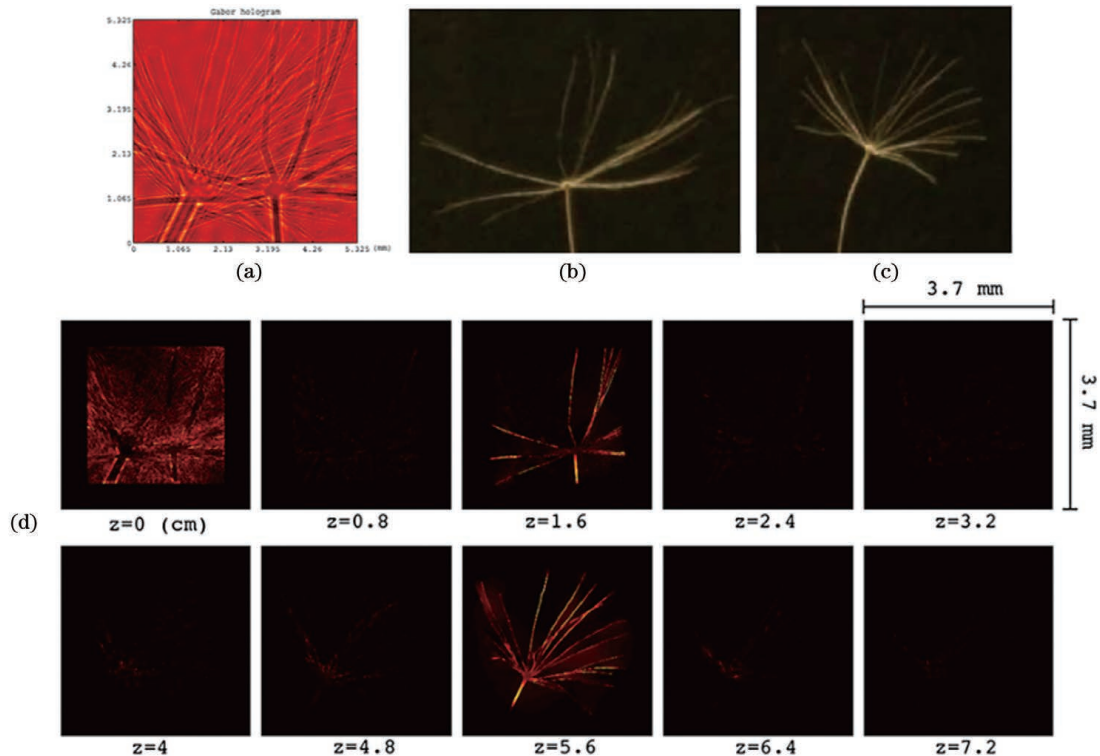


图 9 基于压缩感知算法实现的同轴数字全息三维层析成像<sup>[82]</sup>。(a)记录的全息图；(b)(c)三维物体在不同轴向平面上的图像；(d)压缩感知重建后不同重建距离所对应的重建像

Fig. 9 Coaxial digital holographic three-dimensional tomographic imaging realized based on compressive sensing algorithm<sup>[82]</sup>. (a) Recorded hologram; (b)(c) images of 3D object at two different axial planes; (d) compressive sensing reconstructed images at different reconstruction distances



结合波长复用、多角度照明也可以实现数字全息定量相衬三维层析成像。数字全息定量相衬三维层析显微技术以其无标记三维折射率分布成像能力,可以对细胞内部生物物理学参数的时空分布进行分析,是目前对细胞和组织进行无创成像研究时使用的重要工具之一。在不同的照明角度下拍摄多张全息图,然后结合后向投影滤波算法,就可以实现对样品折射率分布的三维层析重建<sup>[83-84]</sup>。利用该类系统可以实现对红细胞或白细胞体积、表面积或其他生物物理学参数的测量,也可以对血液疾病导致的红细胞形态改变进行研究,还可以实现对有丝分裂等细胞生命过程或病理学进程的动态观察。文献[83]对数字全息定量相衬三维层析显微在生物医学方面的相关应用进行了综述。

### 3.2 部分相干光源照明的数字全息显微

激光光源的使用极大地推进了数字全息显微术的发展进程,并使得光路设计、配置和调整变得更为简单。然而,激光的高度相干性引入的散斑噪声(相干噪声)严重地影响了重建像的质量。尽管可以通过记录多幅含有不相干散斑噪声的全息图并进行平均或通过数字处理的方式对相干噪声进行抑制,但这些方法都会导致系统的成像速度或空间分辨率损失<sup>[85]</sup>。为了

解决这一问题,部分相干光源被引入到数字全息显微系统中。通过降低光源空间相干性的方法,可以有效降低重建像中散斑噪声的干扰,提高振幅和相位的重建精度。在系统中引入旋转毛玻璃来降低光源空间相干性的方法使得重建像的质量得到了有效提高<sup>[86]</sup>。出于简化系统结构和降低成本的考虑,近年来,研究人员更倾向于采用空间相干性较低的 LED 器件作为照明光源,以实现散斑噪声的抑制<sup>[87-89]</sup>。为了获得对比度较高的干涉图样,采用低相干光源的干涉显微系统需要确保物光和参考光之间的光程差较小。这对物参分离式系统的调节精度提出了更高要求。因此,低相干光源往往被用于物参共路式干涉显微系统中。例如,基于横向剪切的数字全息显微系统使用低相干光源来实现无散斑的高精度相位测量<sup>[90]</sup>。近年来,基于点衍射干涉仪的部分相干或白光照明数字全息显微系统得到了广泛关注及研究<sup>[21-23]</sup>,其中典型的系统光路示意图及实验结果如图 10 所示<sup>[22]</sup>。目前,采用部分相干光源照明的数字全息显微系统已被应用于生物细胞相位测量、生物组织三维成像和微纳结构表面形貌测量等方面。关于该类技术的实现方式和应用领域等更多详细信息可参见综述文章[91]。

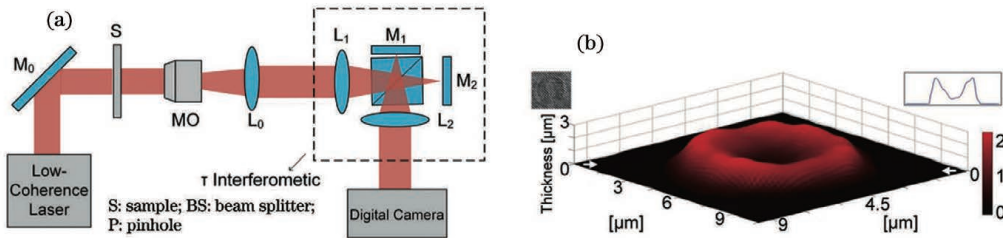


图 10 基于点衍射干涉的干涉显微成像系统<sup>[22]</sup>。(a)光路示意图;(b)红细胞定量相衬成像结果

Fig. 10 Schematic of point diffraction interferometer based interference microscopic imaging system<sup>[22]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) quantitative phase contrast imaging results of red blood cells

另外,低时间相干光源也被用于生物样品的数字全息三维层析显微成像中。较低的相干长度使得样品中只有很小的一个深度范围内发出的物光才能与参考光干涉产生全息图。通过调节参考光路径的光程,可

以在三维样品内部沿着深度方向移动这一干涉区域,从而实现三维层析成像。采用这一方法可以实现全场层析成像<sup>[92-93]</sup>,或对处于较强散射介质后面的物体实现成像<sup>[94]</sup>。如图 11 所示,该类方法已被应用于对生

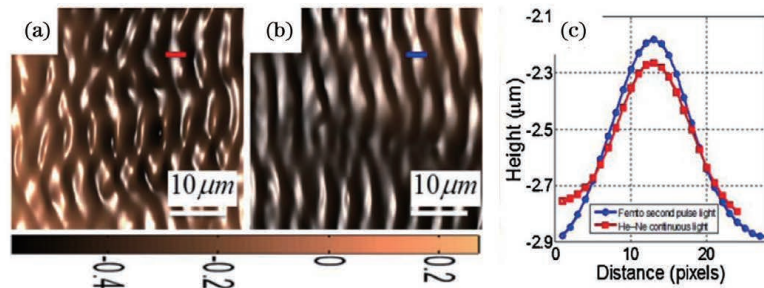


图 11 定量相衬图像<sup>[95]</sup>。(a)相干光源下数字全息显微系统拍摄的肌原纤维的定量相衬图像;(b)低相干超短脉冲光源下数字全息显微系统拍摄的肌原纤维的定量相衬图像;(c)沿图(a)、(b)中红线和蓝线位置处的二维高度轮廓

Fig. 11 Quantitative phase-contrast images<sup>[95]</sup>. (a) Quantitative phase-contrast image of stripy sarcomere captured by digital holographic microscopy system with coherent light; (b) quantitative phase-contrast image of stripy sarcomere captured by digital holographic microscopy system with low coherence ultrashort pulse laser; (c) two-dimensional height profiles along the red and blue lines in (a) and (b)

物组织内肌原纤维的定量相衬显微成像<sup>[95]</sup>。图 11(a)所示是使用相干光源获取的结果,与其相比,低相干超短脉冲光源的使用有效抑制了相干噪声对图像质量的影响。从图 11(b)中可以清晰地观察到隐藏在组织内部的条纹状肌纤维的分布情况。

#### 4 OCT 显微成像技术及其在生物样品三维成像领域的应用

OCT 技术从物光和参考光的干涉图样中提取样品沿深度方向的结构信息。时域 OCT 的系统结构与数字全息系统类似,都基于迈克耳孙干涉仪,但时域 OCT 技术又不同于数字全息术。OCT 技术一般使用弱时间相干的会聚光波照明样品,样品的背向散射

光与参考光之间产生的干涉图样包含了光源相干长度范围内样品沿深度方向的结构信息。利用计算机对这一信息进行处理,并结合一维轴向扫描(A-scan)和二维横向扫描(B-scan),便可以实现样品的三维层析成像。如图 12 所示的频域 OCT 系统利用光谱仪对物光和参考光的干涉信号进行探测,而后经过傅里叶逆变换操作便可以获得样品在较大范围内(与时域 OCT 相比)沿深度方向的结构分布<sup>[96]</sup>。由于不需要进行 A-scan,频域 OCT 系统的成像速度更快,而且具有更高的成像信噪比,因而已被广泛应用于生物医学和工业检测领域。图 13 给出了基于频域 OCT 显微系统获得的人眼角膜和虹膜肌的三维层析成像结果<sup>[97]</sup>。

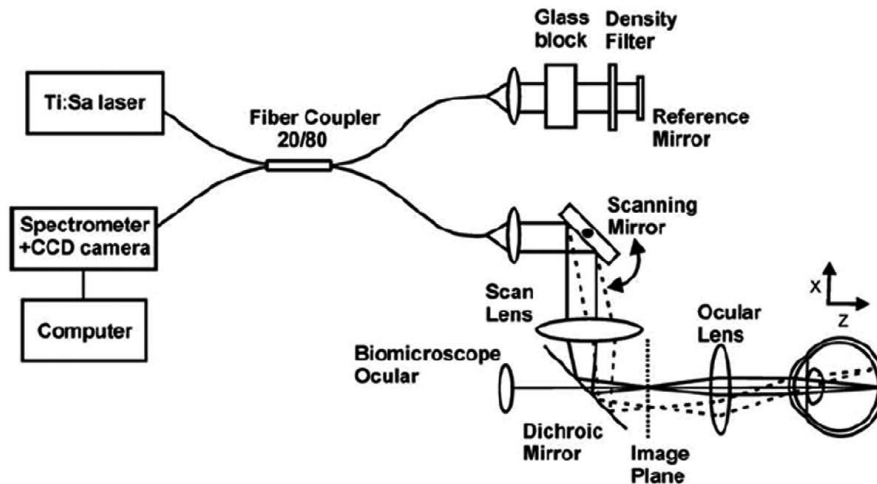


图 12 频域 OCT 系统结构图<sup>[96]</sup>

Fig. 12 Schematic of frequency domain OCT system<sup>[96]</sup>

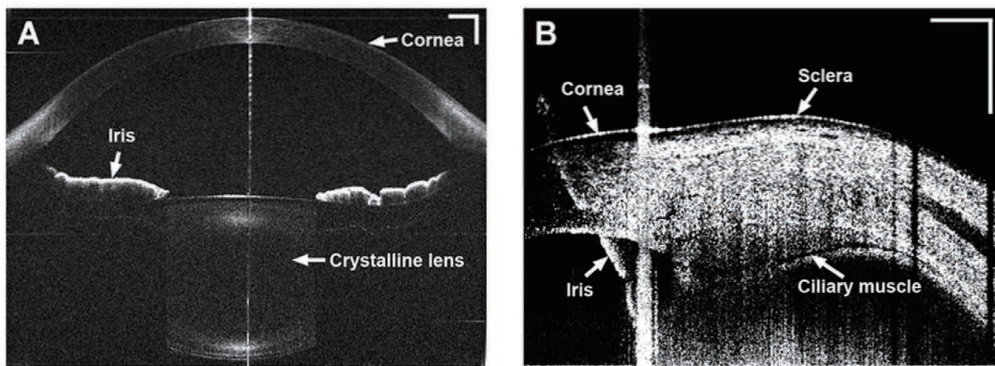


图 13 基于频域 OCT 获得的视网膜成像结果<sup>[97]</sup>

Fig. 13 Imaging results of retina using frequency domain OCT system<sup>[97]</sup>

由于结合了内窥成像系统和偏振光学探测器件,偏振敏感的 OCT 系统已被应用于人体声带、气管等组织的成像以及临床诊断中<sup>[98-104]</sup>。基于 OCT 获取的样品三维层析图像在医学临床诊断上具有重要的指导意义。偏振敏感的内窥 OCT 显微系统对慢阻肺患者支气管横切样品的成像结果<sup>[99]</sup>如图 14 所示。在图 14(a)所示的组织学图像中,平滑肌由黑线示出,血管由红线示出,软骨

由蓝线示出。在图 14(c)和图 14(d)所示的相位敏感 OCT 图像中,白色箭头指向平滑肌,黑色箭头指向软骨。可见,两组结果中平滑肌和软骨的分布具有较好的一致性。此外,非侵害性的内窥 OCT 显微方法适用于活体和在体观察,对于临床诊断具有重要意义。关于 OCT 技术及其在医学成像和诊断领域应用的更多具体信息可参见综述文献<sup>[105-110]</sup>。

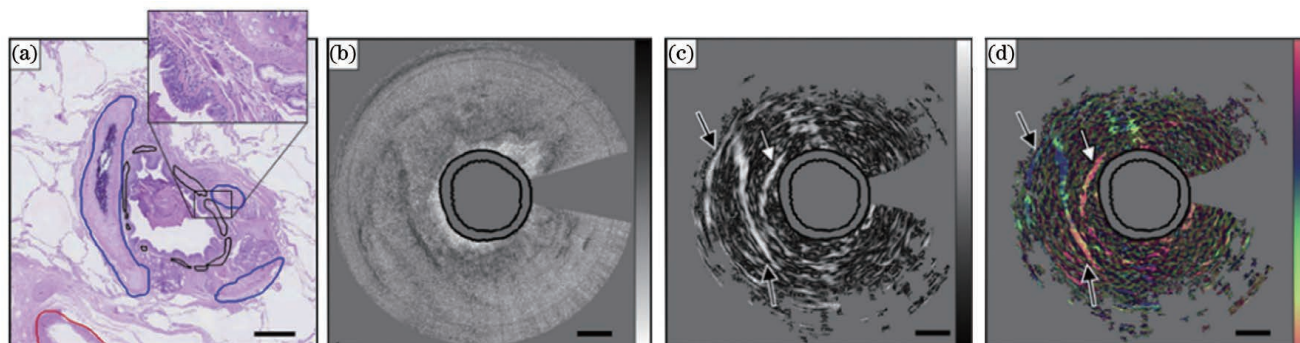


图 14 慢阻肺患者支气管横切样品的成像示例<sup>[99]</sup> (图中比例尺为 0.5 mm)。(a)组织学图像;(b)对数缩放下的衰减系数分布;(c)0~1 范围内的归一化光轴一致性分布;(d)0°~180°范围内的相对光轴取向

Fig. 14 Example of a bronchial cross section from a chronic obstructive pulmonary disease sample<sup>[99]</sup> (scale bars: 0.5 mm).

(a) Histology image; (b) attenuation coefficient shown on a logarithmic scale; (c) OAxU, displayed from 0 to 1; (d) relative optic axis orientation, displayed from 0°–180°

## 5 自干涉数字全息显微成像技术及其在生物样品三维成像中的应用

现实世界中的许多光源都属于非相干光源。不同于单色性好且空间高度相干的激光光源,非相干光源中包含着许多不同的波长成分,且光源平面上来自任意两点的光不具备任何相干性,彼此之间不能产生干涉。在现代光学成像领域,由于各光学元件均存在色散现象,因此实际应用中往往需要使用干涉滤光片或光栅等器件将非相干光源转变为具有一定时间相干性的准单色光。然而,非相干光源的空间非相干性阻碍了其在全息成像领域的应用。以荧光样品为例,对比荧光显微和上述采用 LED 部分相干光源照明的全息显微。可以发现,虽然荧光的时间相干性不弱于 LED 光源,但由于是自发光样品,且样品中任意两个荧光团发出的光不具有相干性,因此不能采用常用的物光和参考光光路配置实现荧光显微中的干涉记录。

全息术提出后不久,在天文成像领域便发展出了非相干全息的基本概念。最早的非相干全息使用胶片记录光波照射菲涅耳波带片后形成的投影强度分布,进而实现自发光物体的三维重建<sup>[111]</sup>。而后,人们发展出了基于干涉原理的多种非相干全息技术<sup>[112-116]</sup>。此类技术将物体看作是由无数物点构成的,且任意两个不同物点发出的光波是统计独立的。通过使用特殊的光路配置或光学元件,可将来自同一物点的光波分为两束。由于这两束光源来自同一物点,因此,它们是空间自相干的,并具有一定的时间相干性,可以发生干涉,从而可以形成该点源的全息图。扩展物体的全息图是由所有物点非相干(光强)叠加而成的。由于参与干涉的两束光波均来自样品本身,故也将这类非相干全息技术称为自干涉全息术。与空间相干的单色光照明下的传统全息技术不同,非相干自干涉全息不能获得一个完整的物光波前分布。相应地,每个物点发出

的光波的完整波前能够被独立地记录并重建,其中编码了该物点的三维位置信息。如果记录的是同轴菲涅耳全息图,则点源全息图具有与菲涅耳波带片相似的强度分布,而且任意两个物点所形成的点源全息图均不相同。所形成的一系列菲涅耳波带片的中心位置和疏密条纹分别编码了对应物点的横向以及轴向位置信息。然而,点源全息图会不可避免地受到直流感项和孪生像的干扰,且点源全息图彼此之间的非相干叠加会加剧这些干扰项的影响,使得早期自干涉全息图的信噪比较低。虽然可以通过相移技术对这些干扰项进行抑制,但早期通过旋转波片实现的相移方法严重降低了系统的成像速度<sup>[117-119]</sup>。

菲涅耳非相干关联全息术 FINCH(非相干光源)将空间光调制器(SLM)作为分波和相移器件,很好地解决了非相干全息术早期存在的分波方法不灵活的问题和局限性。FINCH 可从单幅复值全息图(通过多幅相移全息图合成后获得)中实现空间非相干照明或自发光样品的非扫描三维成像。FINCH 以其在荧光三维显微成像领域所展现出的独特优势,一经提出便得到了诸多关注。图 15(a)给出了 FINCH 三维显微系统的光路示意图<sup>[13]</sup>。使用激发光激发出样品的荧光,利用显微物镜对荧光进行收集。荧光信号中混杂的激发光经过二向色镜和荧光滤波器后被滤除。利用 SLM 的偏振敏感特性(只对入射光中特定方向的偏振分量有调制作用),在其上加载一个透镜的相位分布,然后结合对入射荧光偏振态的控制实现分波。在 SLM 后一段距离处,使用 CCD 记录分波后形成的两束光的干涉图样(全息图)。此外,SLM 还可作为相移器件使用,向参与干涉的一束光中引入定量的常数相移值。记录同一场景的 3 幅或 4 幅相移全息图,通过计算获得复值全息图,然后采用衍射传播数值算法就可以实现荧光样品的非扫描三维重建<sup>[120-121]</sup>。图 15(b)给出了基于 FINCH 实现的花粉在不同轴向平面处的三维重建像。

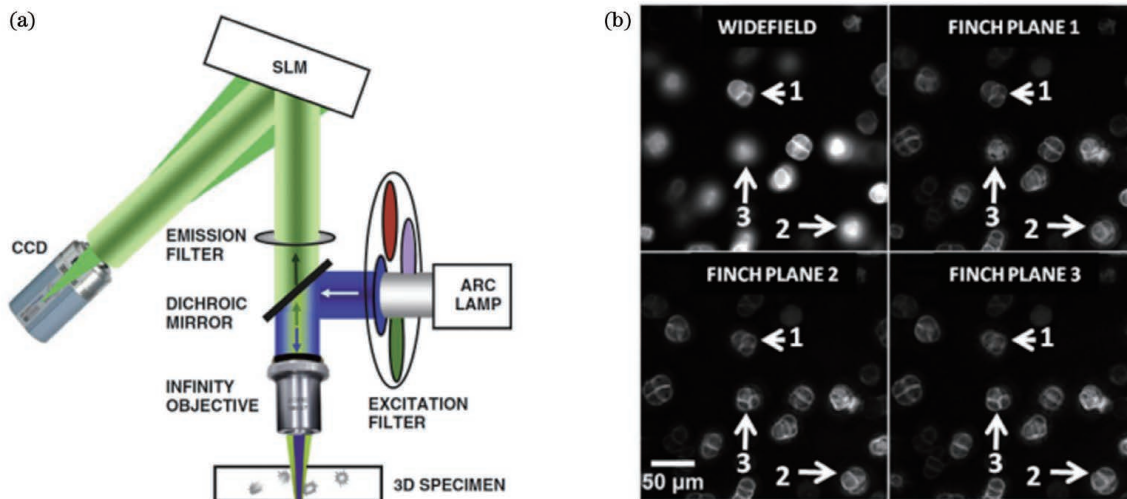


图 15 FINCH 荧光三维显微系统的光路及花粉的三维重建结果。(a)光路<sup>[13]</sup>; (b)三维重建结果<sup>[120]</sup>

Fig. 15 Optical path of FINCH three-dimensional fluorescence microscopy system and three-dimensional reconstructed images of pollen. (a) Optical path<sup>[13]</sup>; (b) three-dimensional reconstructed images<sup>[120]</sup>

然而, FINCH 技术也存在一定的局限性, 例如: 分时相移的全息记录方式影响了 FINCH 的时间分辨率; SLM 有限的调制效率以及倾斜使用时可能引入的额外像差, 都会对实际的 FINCH 系统性能产生潜在影响。近年来, 对该技术的研究聚焦于提升其成像性能以及衍生发展非相干数字全息成像机理<sup>[120-127]</sup>, 其中包括但不限于: 使用特殊的光路配置<sup>[122-124]</sup> 或结合并行相移技术<sup>[14, 125, 174]</sup> 实现单次曝光的 FINCH 成像; 使用渐变折射率透镜<sup>[120]</sup> 或双折射率晶体透镜<sup>[14, 126]</sup> 代替 SLM 作为分波元件, 以提升系统的成像信噪比和分辨率; 在 FINCH 中结合共焦激发和探测提高系统的

成像信噪比和轴向分辨率, 实现荧光样品的超分辨率三维成像<sup>[126-127]</sup>; 通过使用更为精确的全息重建方法实现自干涉全息显微系统各项性能指标的提升<sup>[128-129]</sup>。如图 16 所示, 通过结合压缩感知算法, 自干涉全息技术的轴向成像性能得到了提升。从图 16 所示的成像结果可以看出, 针对两个处于不同轴向位置(P1, 分辨率板; P2, 汉字;  $d_{p1} - d_{p2}$  为轴向间距)且相互交叠的样品构成的三维物体, 该方法有效抑制了离焦像带来的串扰, 提高了系统的轴向成像质量<sup>[129]</sup>。有关 FINCH 以及类似技术的发展和应, 可见综述文献<sup>[130-133]</sup>。

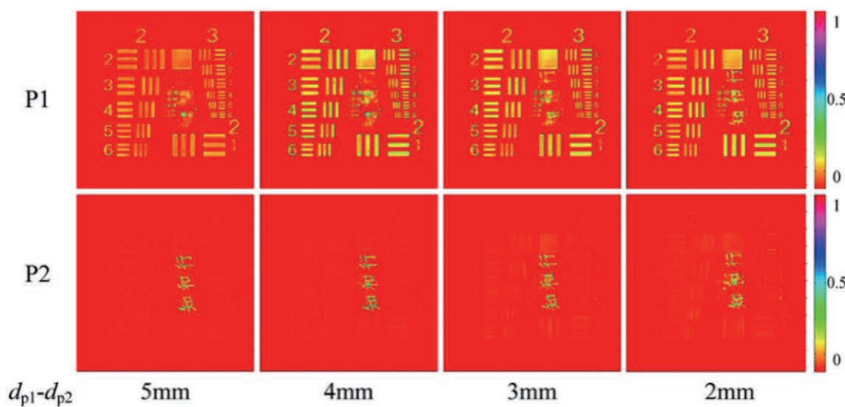


图 16 压缩感知 FINCH 的三维层析成像结果<sup>[129]</sup>

Fig. 16 Three-dimensional tomographic imaging using compressive FINCH<sup>[129]</sup>

FINCH 由于光源的空间非相干性无法像传统数字全息一样从全息图中恢复出样品的相位分布, 但是, 对于每个物点或荧光团所发出的光波, 其完整的复振幅信息可以被 FINCH 记录及重建。这些复振幅信息不仅可以用于重建样品的三维结构, 还可以被充分利用, 从而赋予自干涉全息系统更多可能性<sup>[133]</sup>。其中一种已经被实验验证的可能性就是结合自适应光学的基本思路, 在 FINCH 中实现光学像差的数字校

正<sup>[134]</sup>。不需要在系统中配置波前传感器和波前校正器等硬件, 仅需一幅复值全息图, 利用全息波前记录的方式获得光学像差的相位分布, 而后在数值算法的迭代过程中校正像差对每个点源重建像的干扰, FINCH 就可以有效提升重建像的信噪比和分辨率, 并且当系统中存在各向异性的光学像差时也能够实现样品的高质量三维重建。从图 17 所示的结果中可以看出, 由于光学像差的存在, 图 17(a)和图 17(d)所示的传统宽场

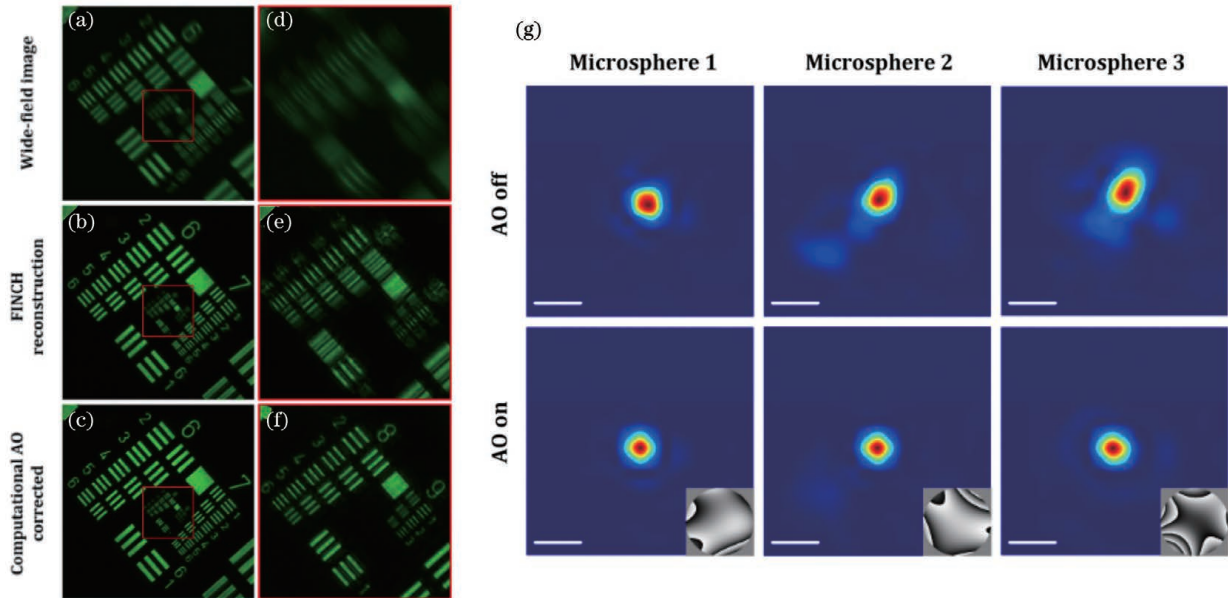


图 17 计算自适应荧光自干涉三维显微成像结果<sup>[134]</sup>。(a)(d)存在光学像差的系统的荧光宽场显微成像;(b)(e)基于传统衍射传播算法的 FINCH 重建像;(c)(f)计算自适应校正算法处理后的重建像;(g)计算自适应像差校正前(上一行)和后(下一行)的荧光微球重建像,比例尺为 880 nm

Fig. 17 Imaging results of computational adaptive optics three-dimensional fluorescence microscopy<sup>[134]</sup>. (a) (d) Wide-field fluorescence microscopic imaging results in a system with optical aberration; (b) (e) FINCH reconstructed images obtained by using conventional diffraction propagation algorithm; (c) (f) computational adaptive optic (AO) corrected images; (g) reconstructed images of microspheres without (upper row) and with (lower row) computational AO correction, scale bar represents 880 nm

荧光显微图像的质量受到了极大影响。同时,图 17(b)和图 17(e)所示基于传统衍射重建算法获得的 FINCH 重建像的质量也较差,物体的细节不能被很好地分辨。与之相比,图 17(c)和图 17(f)所示经过计算自适应校正后的重建像的分辨率和信噪比均有大幅度提高。图 17(g)所示为各向异性光学像差介质中荧光微球的三维成像结果。对未进行像差校正(AO off)的三维成像结果进行分析可以发现,视场中不同三维位置处的微球图像因受像差的影响而明显不同。对自适应校正后(AO on)的结果进行分析可以发现,在数字自适应校正过程中使用不同的像差模式(如插入图所示),可以提升视场中所有三维位置处样品重建像的质量。

自干涉数字全息显微系统可以实现荧光样品的非扫描三维成像,并可以将光漂白和光毒性效应的影响降至最低,因而特别适合用于对生物样品进行快速三维成像。早期的研究验证了 FINCH 显微系统用于荧光非扫描三维成像的可行性<sup>[13]</sup>。然而,系统的成像信噪比等关键参数还难以满足复杂样品的实际成像需求。通过对系统硬件及重建算法进行优化,自干涉数字全息显微目前已被应用于人类癌细胞细胞核的三维成像<sup>[135]</sup>。如图 18 所示,将双折射晶体透镜作为分波元件的 FINCH 显微系统已实现了细胞的荧光超分辨率成像<sup>[14]</sup>。图 19 给出了使用宽场/共焦双模式的 FINCH 显微镜获取的生物样品的超分辨率成像结果<sup>[130]</sup>。

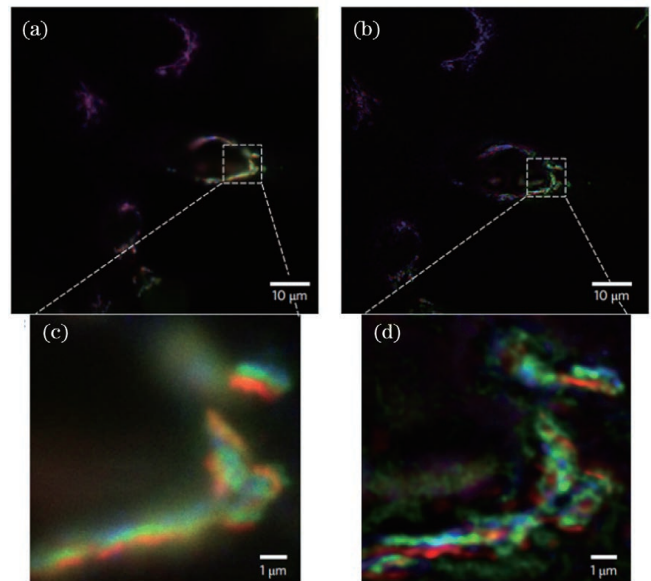


图 18 基于双折射晶体分光器件的荧光自干涉全息系统实现的超分辨率成像<sup>[14]</sup>。(a)(c)高尔基体的宽场显微成像结果;(b)(d)相同数值孔径下高尔基体的超分辨率全息重建像

Fig. 18 Super resolution fluorescence self-interference holographic imaging based on birefringence device<sup>[14]</sup>. (a)(c) Wide-field microscopic images of Golgi apparatus; (b)(d) super resolved holographic reconstructed images of Golgi apparatus at same numerical aperture

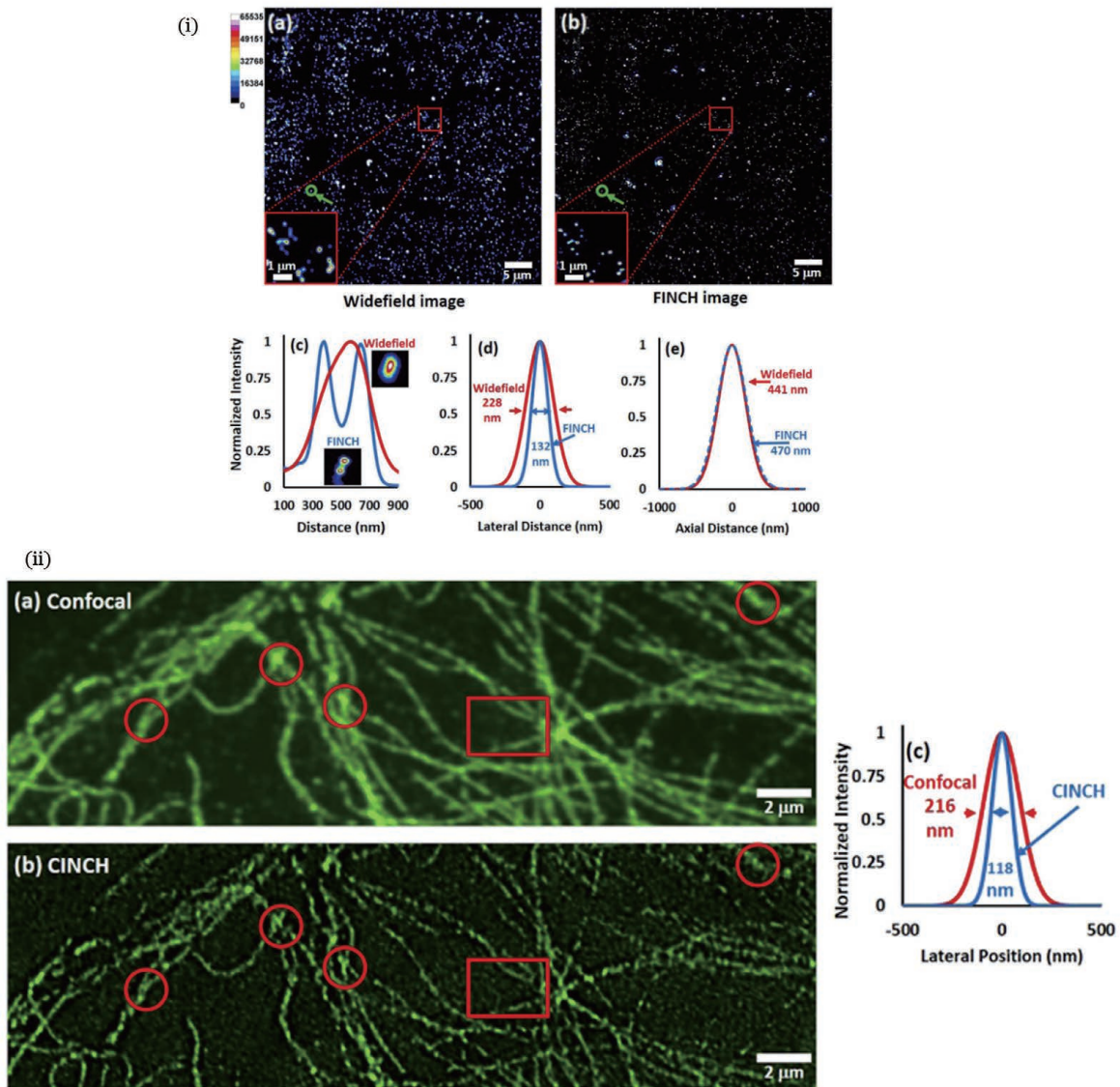


图 19 宽场/共焦双模式荧光自干涉超分辨率成像结果<sup>[130]</sup>。(i) 荧光微球的宽场和自干涉全息 FINCH 超分辨率成像；(ii) 细胞微管的共聚焦和共焦荧光自干涉 CINCH 超分辨率显微成像

Fig. 19 Wide-field/confocal dual-mode fluorescence self-interference super resolution imaging<sup>[130]</sup>. (i) Wide-field and self-interference FINCH super resolved images of fluorescence beads; (ii) microtubule obtained by confocal microscopy and confocal self-interference holographic super resolved microscopy CINCH

## 6 结合光干涉的荧光超分辨率显微成像技术及其应用

与电子显微技术相比,远场荧光超分辨率显微术可将样品的损伤降至最低,因而能够被用于观察活体细胞。近年来,对荧光团进行受激发射损耗的 STED 技术以及通过荧光单分子定位和重建实现的 STORM 等超分辨率成像方法已在生物医学研究领域展现出了不可替代的优势<sup>[136]</sup>。在基于单分子定位的超分辨率成像方法中,分子轴向定位往往是通过系统点扩散函数(PSF)的调制实现的<sup>[137-139]</sup>。光的干涉可被用于对 PSF 进行调制。实际上,分子的轴向位置与其所发出的荧光在探测平面上的波前曲率有唯一的定量对应关系。利用光的干涉可以定量、高精度地将

光场的复振幅信息编码至干涉图样中。虽然荧光是空间非相干的,但荧光超分辨率显微系统可以利用源于同一物点的光分束后的自干涉来实现干涉记录。基于这一原理发展出的荧光自干涉三维超分辨率显微(SELFI)技术已被成功应用于生物细胞和组织的成像中<sup>[10,140]</sup>。如图 20 所示<sup>[10]</sup>,SELFI 通过放置在探测器前的相位衍射光栅实现对荧光的分光,通过自干涉的方式实现荧光波前的记录,而后通过确定单分子荧光干涉图样的中心位置,实现分子的横向定位。从干涉图中提取相位信息并计算波前曲率后,可以实现分子轴向位置的高精度定位。SELFI 具有对球差等光学像差不敏感的特性,因而能够实现对较厚生物组织的三维成像。图 21 给出了 SELFI 对 50 μm 厚样品内部荧光染色肌动蛋白的成像结果<sup>[10]</sup>。

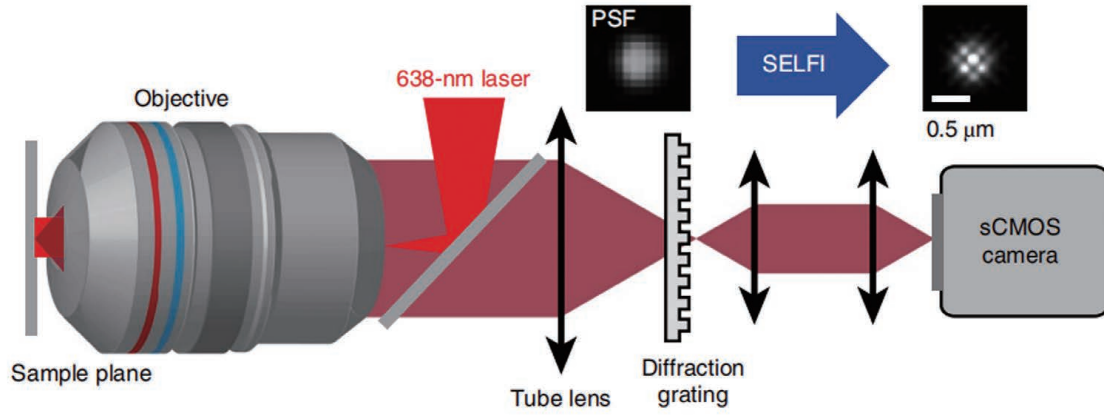


图 20 荧光自干涉三维超分辨率显微系统示意图<sup>[10]</sup>

Fig. 20 Schematic of SELFI fluorescence self-interference three-dimensional super resolution microscopy<sup>[10]</sup>

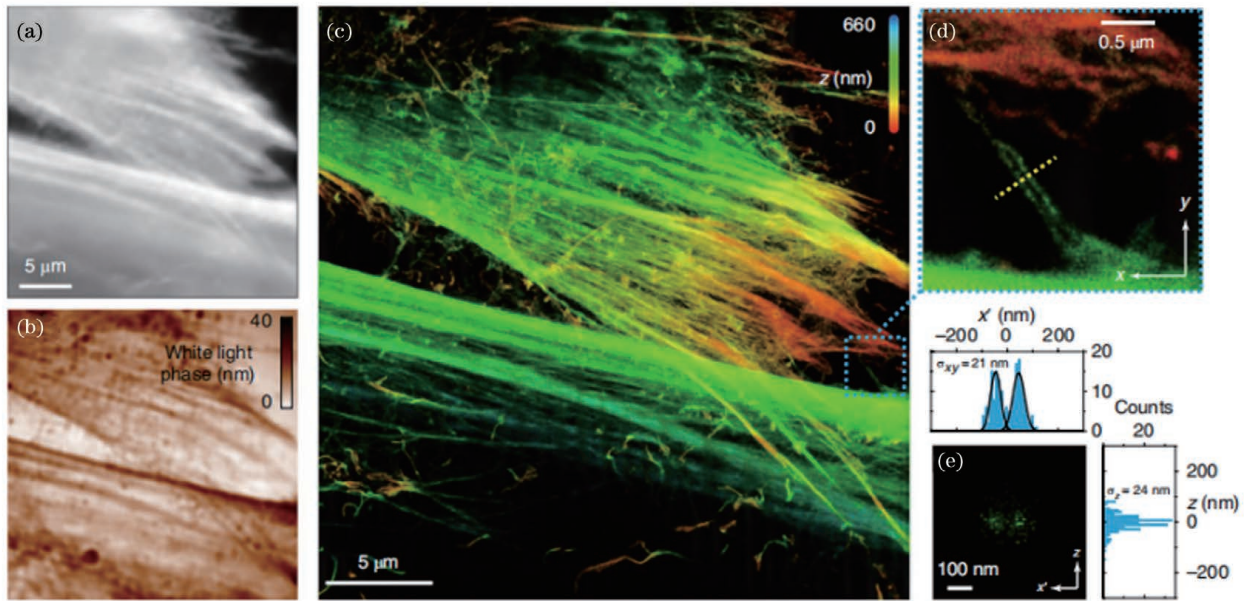


图 21 针对厚生物样品实现的 SELFI 超分辨率成像<sup>[10]</sup>

Fig. 21 SELFI super resolved imaging of thick biological sample<sup>[10]</sup>

其他荧光干涉或波前调制技术为提升超分辨率显微系统的性能或拓展其功能提供了更多可能。例如，STORM 类技术结合自干涉数字全息的基本原理，可以从点源全息图中更直接地实现荧光波前恢复，进而实现分子三维位置的高精度定位。文献[141-142]研究了荧光自干涉全息用于单个粒子三维定位时可实现

的精度，并给出了理论分析和初步验证性实验结果。通过对点源全息图进行数字重建，荧光自干涉单分子成像系统可以模拟全息记录时对应分子发出的荧光在系统中的传播过程，并给出物空间内任意轴向位置处分子的荧光强度分布。对三维强度分布进行拟合就可确定分子的三维位置。如图 22 所示的系统已经成功

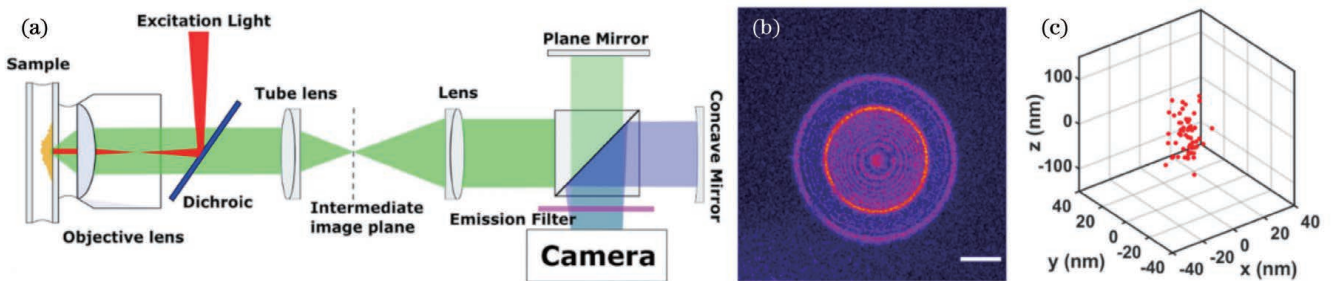


图 22 基于自干涉全息的三维定位方法<sup>[141]</sup>。(a) 成像原理图；(b) 单个荧光微球的全息图；(c) 三维定位结果

Fig. 22 Three-dimension localization based on self-interference digital holography<sup>[141]</sup>. (a) Scheme of imaging principle; (b) hologram of a single fluorescent microsphere; (c) localization results plotted in three dimensions

实现了优于 50 nm 定位精度的荧光颗粒的三维定位,初步验证了自干涉全息方法在随机定位三维超分辨率显微术中应用的可行性<sup>[14]</sup>。

## 7 结束语

本文介绍了基于光干涉的数字全息、光学相干层析成像、自干涉数字全息以及结合了光干涉的荧光自干涉(SELFI)超分辨显微成像技术的基本原理、基本光路配置及其在生物医学成像领域的应用,着重介绍了这些技术在样品定量相衬成像、非扫描三维成像以及超分辨显微成像等领域的应用。与传统的显微系统只能实现光强探测相比,干涉显微系统还可以获取物光波的相位。这种本质上的多维信息获取能力,使得干涉显微技术在实际应用中具有独特优势。基于不同的光源以及系统光路结构,干涉显微系统探测到的相位信息可以用于重建样品的折射率分布、层析成像、非扫描三维成像、超分辨率成像和光学像差校正等。

与传统的显微系统相比,干涉显微系统能够快速、高精度地获取和重建样品的多维信息(如三维结构、吸收系数和折射率分布同时重建)。不同类型的干涉显微技术在生物成像及临床医学诊断中发挥着越来越重要的作用。近年来,该类技术也得到了越来越多的关注和研究,其中主要的方向是与压缩传感、深度学习等数据处理算法结合,提高成像性能并充分发掘编码在全息图中的样品的三维结构、三维形貌和折射率分布等信息。将干涉显微与荧光超分辨率成像技术结合可以实现高分辨率的快速三维成像,这也是该类技术未来的主要发展方向之一。另一个重要的发展方向是发展新的光学技术,将三维结构、折射率分布和偏振特性等多维信息同时编码在干涉图样中,拓展干涉显微技术所能探测的信息维度,实现多维度信息的同时获取和重建。总之,干涉显微技术已经成为生物医学成像领域不可替代的观察工具,该技术的进一步发展必将有利于拓展人们对具体生命进程运行机理的观察和理解。

## 参 考 文 献

- Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects[J]. *Physica*, 1942, 9(7): 686-698.
- Yu X, Hong J, Liu C G, et al. Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking[J]. *Optical Engineering*, 2014, 53(11): 112306.
- 张熙, 王爱琦, 孔艳, 等. 透射式 K 空间变换数字全息三维成像技术研究[J]. *中国激光*, 2021, 48(21): 2109001.
- Zhang X, Wang S Y, Kong Y, et al. Transmission mode K-domain transform based digital holographic three-dimensional imaging technology[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(21): 2109001.
- 冯方, 田爱玲, 刘丙才, 等. 基于数字全息扫描成像的划痕缺陷全场三维测试[J]. *中国激光*, 2020, 47(4): 0409003.
- Feng F, Tian A L, Liu B C, et al. Full-field three-dimensional test for scratch defects using digital holographic scanning imaging system[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(4): 0409003.
- 李文静, 邹帅, 何登科, 等. 频谱卷积神经网络实现全息图散斑降噪[J]. *光学学报*, 2020, 40(5): 0509001.
- Zhou W J, Zou S, He D K, et al. Speckle noise reduction of holograms based on spectral convolutional neural network[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(5): 0509001.
- Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- Rosen J, Brooker G. Digital spatially incoherent Fresnel holography[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(8): 912-914.
- Wang Y, Kanchanawong P. Three-dimensional super resolution microscopy of F-actin filaments by interferometric photo activated localization microscopy (iPALM)[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2016(118): 54774.
- Bon P, Linares-Loyez J, Feyeux M, et al. Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 449-454.
- Sheridan J T, Kostuk R K, Gil A F, et al. Roadmap on holography[J]. *Journal of Optics*, 2020, 22(12): 123002.
- Serebryakov V A, Boiko E V, Gatsu M V, et al. Optical coherence tomography angiography in the diagnosis of ophthalmologic diseases: problems and prospects (review)[J]. *Journal of Optical Technology*, 2020, 87(2): 67-93.
- Rosen J, Brooker G. Non-scanning motionless fluorescence three-dimensional holographic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(3): 190-195.
- Siegel N, Lupashin V, Storrie B, et al. High-magnification super-resolution FINCH microscopy using birefringent crystal lens interferometers[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10(12): 802-808.
- Man T L, Wan Y H, Yan W J, et al. Adaptive optics via self-interference digital holography for non-scanning three-dimensional imaging in biological samples[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(6): 2614-2626.
- Gabor D. A new microscopic principle[J]. *Nature*, 1948, 161(4098): 777-778.
- Leith E N, Upatnieks J. Holography with achromatic-fringe systems[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1967, 57(8): 975-980.
- Vanligten R F, Osterberg H. Holographic microscopy[J]. *Nature*, 1966, 211(5046): 282-283.
- Singh V, Tayal S, Mehta D S. Highly stable wide-field common path digital holographic microscope based on a Fresnel biprism interferometer[J]. *OSA Continuum*, 2018, 1(1): 48-55.
- Guo R L, Barnea I, Shaked N T. Low-coherence shearing interferometry with constant off-axis angle[J]. *Frontiers in Physics*, 2021, 8: 611679.
- Ding H F, Popescu G. Instantaneous spatial light interference microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(2): 1569-1575.
- Shaked N T. Quantitative phase microscopy of biological samples using a portable interferometer[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(11): 2016-2018.
- Bhaduri B, Pham H, Mir M, et al. Diffraction phase microscopy with white light[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(6): 1094-1096.
- Mann C J, Yu L F, Lo C M, et al. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography[J]. *Optics Express*, 2005, 13(22): 8693-8698.
- Yu L F, Mohanty S, Zhang J, et al. Digital holographic microscopy for quantitative cell dynamic evaluation during laser microsurgery[J]. *Optics Express*, 2009, 17(14): 12031-



- 12038.
- [26] Yu X, Cross M, Liu C G, et al. Measurement of the traction force of biological cells by digital holography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(1): 153-159.
- [27] Ferraro P, Alferi D, de Nicola S, et al. Quantitative phase-contrast microscopy by a lateral shear approach to digital holographic image reconstruction[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(10): 1405-1407.
- [28] Miccio L, Grilli S, Finizio A, et al. Lipid particle detection by means digital holography and lateral shear interferometry[J]. *Proceedings of SPIE*, 2007, 6631: 66310G.
- [29] Coppola G, di Caprio G, Gioffrè M, et al. Digital self-referencing quantitative phase microscopy by wavefront folding in holographic image reconstruction[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(20): 3390-3392.
- [30] Merola F, Miccio L, Paturzo M, et al. Driving and analysis of micro-objects by digital holographic microscope in microfluidics[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(16): 3079-3081.
- [31] Kim M K. Applications of digital holography in biomedical microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of Korea*, 2010, 14(2): 77-89.
- [32] Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, et al. Tomographic phase microscopy[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(9): 717-719.
- [33] 赵洁, 王大勇, 李艳, 等. 数字全息显微技术应用于生物样品相衬成像的实验研究[J]. *中国激光*, 2010, 37(11): 2906-2911. Zhao J, Wang D Y, Li Y, et al. Experimental study on the quantitative phase-contrast imaging of the biological samples by digital holographic microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2010, 37(11): 2906-2911.
- [34] Kim M K. Tomographic three-dimensional imaging of a biological specimen using wavelength-scanning digital interference holography[J]. *Optics Express*, 2000, 7(9): 305-310.
- [35] Javidi B, Moon I, Yeom S, et al. Three-dimensional imaging and recognition of microorganism using single-exposure on-line (SEOL) digital holography[J]. *Optics Express*, 2005, 13(12): 4492-4506.
- [36] You J W, Kim S, Kim D. High speed volumetric thickness profile measurement based on full-field wavelength scanning interferometer[J]. *Optics Express*, 2008, 16(25): 21022-21031.
- [37] Jeong S J, Hong C K. Illumination-angle-scanning digital interference holography for optical section imaging[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(20): 2392-2394.
- [38] Choi W S, Fang-Yen C, Badizadegan K, et al. Extended depth of focus in tomographic phase microscopy using a propagation algorithm[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(2): 171-173.
- [39] Poon T C. Optical scanning holography: a review of recent progress[J]. *Journal of the Optical Society of Korea*, 2009, 13(4): 406-415.
- [40] Kühn J, Montfort F, Colomb T, et al. Submicrometer tomography of cells by multiple-wavelength digital holographic microscopy in reflection[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(5): 653-655.
- [41] Jeon Y. Rotation error correction by numerical focus adjustment in tomographic phase microscopy[J]. *Optical Engineering*, 2009, 48(10): 105801.
- [42] 王宇, 温凯, 张美玲, 等. 数字全息显微中自动调焦技术及其应用(封面文章)(特邀)[J]. *红外与激光工程*, 2021, 50(2): 20200530. Wang Y, Wen K, Zhang M L, et al. Autofocusing techniques in digital holographic microscopy and their applications (cover paper)(invited)[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2021, 50(2): 20200530.
- [43] 王添, 于佳, 郭卜瑜, 等. 基于数字全息显微的海洋浮游生物三维形貌快速重建方法研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(2): 121-127. Wang T, Yu J, Guo B Y, et al. Study of rapidly reconstruction method of marine plankton 3D profile based on digital holographic microscopy[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(2): 121-127.
- [44] Bohdansky A B, Jericho M H, Herndl G J. Development and deployment of a point-source digital inline holographic microscope for the study of plankton and particles to a depth of 6000 m[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2013, 11(1): 28-40.
- [45] Yu X, Liu C, Clark D C, et al. Measurement of Young's modulus of polyacrylamide gel by digital holography[C]// *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*, May 9-11, 2011, Tokyo Japan. [S.l.]: Optica Publishing Group, 2011: DTuC32.
- [46] Kou S S, Sheppard C J. Imaging in digital holographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2007, 15(21): 13640-13648.
- [47] Miccio L, Finizio A, Puglisi R, et al. Dynamic DIC by digital holography microscopy for enhancing phase-contrast visualization[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(2): 331-344.
- [48] Kim M K. Digital holographic microscopy: principles, techniques, and applications[J]. *Proceedings of SPIE*, 2010, 0180: 018005.
- [49] Potcoava M C, Kim M K. Optical tomography for biomedical applications by digital interference holography[J]. *Measurement Science and Technology*, 2008, 19(7): 074010.
- [50] 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. 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.
- [51] Yi F L, Lee C G, Moon I K. Statistical analysis of 3D volume of red blood cells with different shapes via digital holographic microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of Korea*, 2012, 16(2): 115-120.
- [52] Marquet P, Depeursing C, Magistretti P J. Exploring neural cell dynamics with digital holographic microscopy[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2013, 15(1): 407-431.
- [53] Xu W, Jericho M H, Meinertzhagen I A, et al. Digital in-line holography for biological applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11301-11305.
- [54] Xu W, Jericho M H, Meinertzhagen I A, et al. Digital in-line holography of microspheres[J]. *Applied Optics*, 2002, 41(25): 5367-5375.
- [55] Tang M, Liu C, Wang X P. Autofocusing and image fusion for multi-focus plankton imaging by digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2020, 59(2): 333-345.
- [56] Su T W, Xue L, Ozcan A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16018-16022.
- [57] Su T W, Choi I, Feng J W, et al. Sperm trajectories form chiral ribbons[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1664.
- [58] Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho S K, et al. 4-D imaging of fluid flow with digital in-line holographic microscopy[J]. *Optik*, 2008, 119(9): 419-423.
- [59] Choi Y S, Lee S J. Three-dimensional volumetric measurement of red blood cell motion using digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2009, 48(16): 2983-2990.
- [60] Lee S J, Seo K W, Choi Y S, et al. Three-dimensional motion measurements of free-swimming microorganisms using digital holographic microscopy[J]. *Measurement Science and Technology*, 2011, 22(6): 064004.
- [61] 韩正英, 于佳, 王金城, 等. 基于数字全息术的水中气泡场获取方法的研究[J]. *光学技术*, 2010, 36(4): 617-621. Han Z Y, Yu J, Wang J C, et al. The research of under water bubble field on digital holography[J]. *Optical Technique*,

- 2010, 36(4): 617-621.
- [62] Tan S Z, Zhang F Y, Huang Q M, et al. Measuring and calculating geometrical parameters of marine plankton using digital laser holographic imaging[J]. *Optik*, 2014, 125(18): 5119-5123.
- [63] 戎路, 王大勇, 王云新, 等. 同轴数字全息中的相位恢复算法[J]. *中国激光*, 2014, 41(2): 0209006.  
Rong L, Wang D Y, Wang Y X, et al. Phase retrieval methods in in-line digital holography[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, 41(2): 0209006.
- [64] Oe K, Nomura T. Twin-image reduction method using a diffuser for phase imaging in-line digital holography[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(20): 5652-5656.
- [65] Ma L H, Wang H, Li Y, et al. Partition calculation for zero-order and conjugate image removal in digital in-line holography[J]. *Optics Express*, 2012, 20(2): 1805-1815.
- [66] Chen G L, Lin C Y, Kuo M K, et al. Numerical suppression of zero-order image in digital holography[J]. *Optics Express*, 2007, 15(14): 8851-8856.
- [67] Stoykova E, Kang H, Park J. Twin-image problem in digital holography: a survey (invited paper)[J]. *Chinese Optics Letters*, 2014, 12(6): 60013-60024.
- [68] Wu Y C, Ozcan A. Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring[J]. *Methods*, 2018, 136: 4-16.
- [69] Pandiyan V P, John R. Optofluidic bioimaging platform for quantitative phase imaging of lab on a chip devices using digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2016, 55(3): A54-A59.
- [70] Wu X J, Sun J S, Zhang J L, et al. Wavelength-scanning lensfree on-chip microscopy for wide-field pixel-super-resolved quantitative phase imaging[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(9): 2023-2026.
- [71] Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography[J]. *Optics Letters*, 1997, 22(16): 1268-1270.
- [72] 李杰. 广义相移数字全息相移提取算法及应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2014: 1-135.  
Li J. Study of phase-shift extraction algorithm and its application in generalized phase-shifting digital holography[D]. Jinan: Shandong University, 2014: 1-135.
- [73] Nomura T, Shinomura K. Generalized sequential four-step phase-shifting color digital holography[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(24): 6851-6854.
- [74] Imbe M, Nomura T. Study of reference waves in single-exposure generalized phase-shifting digital holography[J]. *Applied Optics*, 2013, 52(18): 4097-4102.
- [75] Yoshikawa N, Shiratori T, Kajihara K. Robust phase-shift estimation method for statistical generalized phase-shifting digital holography[J]. *Optics Express*, 2014, 22(12): 14155-14165.
- [76] Situ G H, Ryle J P, Gopinathan U, et al. Generalized in-line digital holographic technique based on intensity measurements at two different planes[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(5): 711-717.
- [77] Kakue T, Moritani Y, Ito K, et al. Image quality improvement of parallel four-step phase-shifting digital holography by using the algorithm of parallel two-step phase-shifting digital holography[J]. *Optics Express*, 2010, 18(9): 9555-9560.
- [78] Awatsuji Y, Sasada M, Kubota T. Parallel quasi-phase-shifting digital holography[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(6): 1069-1071.
- [79] Awatsuji Y, Tahara T, Kaneko A, et al. Parallel two-step phase-shifting digital holography[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(19): D183-D189.
- [80] Wan Y H, Man T L, Wu F, et al. Parallel phase-shifting self-interference digital holography with faithful reconstruction using compressive sensing[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 86: 38-43.
- [81] Martínez-León L, Araiza-E M, Javidi B, et al. Single-shot digital holography by use of the fractional Talbot effect[J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 12900-12909.
- [82] Brady D J, Choi K, Marks D L, et al. Compressive holography[J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 13040-13049.
- [83] Balasubramani V, Kuś A, Tu H Y, et al. Holographic tomography: techniques and biomedical applications[J]. *Applied Optics*, 2021, 60(10): B65-B80.
- [84] Charrière F, Marian A, Montfort F, et al. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 178-180.
- [85] Liu Y, Wang Z, Huang J H. Recent progress on aberration compensation and coherent noise suppression in digital holography[J]. *Applied Sciences*, 2018, 8(3): 444.
- [86] Choi Y, Yang T D, Lee K J, et al. Full-field and single-shot quantitative phase microscopy using dynamic speckle illumination[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(13): 2465-2467.
- [87] Qin Y, Zhong J G. Quality evaluation of phase reconstruction in LED-based digital holography[J]. *Chinese Optics Letters*, 2009, 7(12): 1146-1150.
- [88] Guo R L, Yao B L, Gao P, et al. Off-axis digital holographic microscopy with LED illumination based on polarization filtering[J]. *Applied Optics*, 2013, 52(34): 8233-8238.
- [89] Cho J, Lim J, Jeon S, et al. Dual-wavelength off-axis digital holography using a single light-emitting diode[J]. *Optics Express*, 2018, 26(2): 2123-2131.
- [90] Baek Y, Lee K, Yoon J, et al. White-light quantitative phase imaging unit[J]. *Optics Express*, 2016, 24(9): 9308-9315.
- [91] 王阳, 张美玲, 王宇, 等. 部分相干光照明的数字全息显微技术及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811005.  
Wang Y, Zhang M L, Wang Y, et al. Partially coherent illumination-based digital holographic microscopy and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811005.
- [92] 朱越, 高万荣. 全场高分辨生物组织光学层析成像[J]. *中国激光*, 2014, 41(8): 0804002.  
Zhu Y, Gao W R. High-resolution full-field optical coherence tomography for biological tissue[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, 41(8): 0804002.
- [93] Lin Y C, Cheng C J, Poon T C. Optical sectioning with a low-coherence phase-shifting digital holographic microscope[J]. *Applied Optics*, 2011, 50(7): B25-B30.
- [94] 梁子, 安晓英, 张茹, 等. 基于散斑照明和全息的穿透散射介质成像[J]. *光学学报*, 2017, 37(8): 0811002.  
Liang Z, An X Y, Zhang R, et al. Imaging through turbid media based on speckled illumination and holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(8): 0811002.
- [95] Abdelsalam D G, Yasui T. High brightness, low coherence, digital holographic microscopy for 3D visualization of an *in-vitro* sandwiched biological sample[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(13): F1-F6.
- [96] Wojtkowski M, Srinivasan V, Fujimoto J G, et al. Three-dimensional retinal imaging with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(10): 1734-1746.
- [97] Shao Y L, Tao A Z, Jiang H, et al. Simultaneous real-time imaging of the ocular anterior segment including the ciliary muscle during accommodation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(3): 466-480.
- [98] Kim K H, Burns J A, Bernstein J J, et al. *In vivo* 3D human vocal fold imaging with polarization sensitive optical coherence tomography and a MEMS scanning catheter[J]. *Optics Express*, 2010, 18(14): 14644-14653.
- [99] Willemsse J, Wener R R, Feroldi F, et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography in end-stage lung diseases: an *ex vivo* pilot study[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(11): 6796-6813.

- [100] Hee M R, Swanson E A, Fujimoto J G, et al. Polarization-sensitive low-coherence reflectometer for birefringence characterization and ranging[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 1992, 9(6): 903-908.
- [101] de Boer J F, Milner T E, van Gemert M J, et al. Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 1997, 22(12): 934-936.
- [102] Park B H, Pierce M C, Cense B, et al. Optic axis determination accuracy for fiber-based polarization-sensitive optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(19): 2587-2589.
- [103] Hariri L P, Villiger M, Applegate M B, et al. Seeing beyond the bronchoscope to increase the diagnostic yield of bronchoscopic biopsy[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 187(2): 125-129.
- [104] Hariri L P, Adams D C, Applegate M B, et al. Distinguishing tumor from associated fibrosis to increase diagnostic biopsy yield with polarization-sensitive optical coherence tomography[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2019, 25(17): 5242-5249.
- [105] Schmitt J M. Optical coherence tomography (OCT): a review[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 1999, 5(4): 1205-1215.
- [106] Goel R K, Kaouk J H. Optical coherence tomography: the past, present and future[J]. *Journal of Robotic Surgery*, 2007, 1(3): 179-184.
- [107] Bouma B E, Villiger M, Otsuka K, et al. Intravascular optical coherence tomography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(5): 2660-2686.
- [108] Drexler W. Ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(1): 47-74.
- [109] Tomlins P H, Wang R K. Theory, developments and applications of optical coherence tomography[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2005, 38(15): 2519-2535.
- [110] de Boer J F, Milner T E. Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2002, 7(3): 359-371.
- [111] Mertz L, Young N O. Fresnel transformation of images (Fresnel coding and decoding of images)[C]//*Proceedings of 1961 International Conference on Optical Instruments and Techniques*, January, 1961, Britain, London. Chapman Hall: [s.n.], 1961: 305-310.
- [112] Lohmann A W. Wavefront reconstruction for incoherent objects[J]. *JOSA*, 1965, 55(11): 1555-1556.
- [113] Stroke G W, Restrick R C. Holography with spatially incoherent light[J]. *Applied Physics Letters*, 1965, 7(9): 229-231.
- [114] Cochran G. New method of making Fresnel transforms with incoherent light[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1966, 56(11): 1513-1517.
- [115] Mallick S, Roblin M L. Fourier transform holography using a quasimonochromatic incoherent source[J]. *Applied Optics*, 1971, 10(3): 596-598.
- [116] Bryngdahl O, Lohmann A. One-dimensional holography with spatially incoherent light[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1968, 58(5): 625-628.
- [117] Kim S G, Lee B, Kim E S. Removal of bias and the conjugate image in incoherent on-axis triangular holography and real-time reconstruction of the complex hologram[J]. *Applied Optics*, 1997, 36(20): 4784-4791.
- [118] Kim S G, Ryeom J. Phase error analysis of incoherent triangular holography[J]. *Applied Optics*, 2009, 48(34): H231-H237.
- [119] Kim S G. Analysis of effect of phase error sources of polarization components in incoherent triangular holography[J]. *Journal of the Optical Society of Korea*, 2012, 16(3): 256-262.
- [120] Brooker G, Siegel N, Rosen J, et al. In-line FINCH super resolution digital holographic fluorescence microscopy using a high efficiency transmission liquid crystal GRIN lens[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(24): 5264-5267.
- [121] Rosen J, Siegel N, Brooker G. Theoretical and experimental demonstration of resolution beyond the Rayleigh limit by FINCH fluorescence microscopic imaging[J]. *Optics Express*, 2011, 19(27): 26249-26268.
- [122] Kelner R, Rosen J. Spatially incoherent single channel digital Fourier holography[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(17): 3723-3725.
- [123] Kelner R, Rosen J, Brooker G. Enhanced resolution in Fourier incoherent single channel holography (FISCH) with reduced optical path difference[J]. *Optics Express*, 2013, 21(17): 20131-20144.
- [124] Quan X Y, Matoba O, Awatsuji Y. Single-shot incoherent digital holography using a dual-focusing lens with diffraction gratings[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(3): 383-386.
- [125] Nobukawa T, Muroi T, Katano Y, et al. Single-shot phase-shifting incoherent digital holography with multiplexed checkerboard phase gratings[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(8): 1698-1701.
- [126] Siegel N, Brooker G. Single shot holographic super-resolution microscopy[J]. *Optics Express*, 2021, 29(11): 15953-15968.
- [127] Siegel N, Brooker G. Improved axial resolution of FINCH fluorescence microscopy when combined with spinning disk confocal microscopy[J]. *Optics Express*, 2014, 22(19): 22298-22307.
- [128] 翁嘉文, 杨初平, 李海. 自干涉非相干数字全息的压缩感知重建[J]. *光学学报*, 2016, 36(2): 0209001.
- Weng J W, Yang C P, Li H. Self-interference incoherent digital holography by compressive sensing[J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(2): 0209001.
- [129] Man T L, Wan Y H, Wu F, et al. Self-interference compressive digital holography with improved axial resolution and signal-to-noise ratio[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(13): F91-F96.
- [130] 万玉红, 刘超, 满天龙, 等. 非相干相关数字全息术: 原理、发展及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811004.
- Wan Y H, Liu C, Man T L, et al. Incoherent correlation digital holography: principle, development, and applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811004.
- [131] Anand V, Katkus T, Hock Ng S, et al. Review of Fresnel incoherent correlation holography with linear and non-linear correlations[J]. *Chinese Optics Letters*, 2021, 19(2): 020501.
- [132] Rosen J, Hai N, Rai M R. Recent progress in digital holography with dynamic diffractive phase apertures[J]. *Applied Optics*, 2022, 61(5): B171-B180.
- [133] Rosen J, Vijayakumar A, Kumar M, et al. Recent advances in self-interference incoherent digital holography[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2019, 11(1): 1-66.
- [134] Man T L, Wan Y H, Yan W J, et al. Adaptive optics via self-interference digital holography for non-scanning three-dimensional imaging in biological samples[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(6): 2614-2626.
- [135] Quan X Y, Kumar M, Matoba O, et al. Three-dimensional stimulation and imaging-based functional optical microscopy of biological cells[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(21): 5447-5450.
- [136] Leung B O, Chou K C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology[J]. *Applied Spectroscopy*, 2011, 65(9): 967-980.
- [137] Franke C, Sauer M, van de Linde S. Photometry unlocks 3D information from 2D localization microscopy data[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(1): 41-44.
- [138] Bourg N, Mayet C, Dupuis G, et al. Direct optical nanoscopy with axially localized detection[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9

- (9): 587-593.
- [139] Roider C, Jesacher A, Bernet S, et al. Axial super-localisation using rotating point spread functions shaped by polarisation-dependent phase modulation [J]. *Optics Express*, 2014, 22(4): 4029-4037.
- [140] Linares-Loyez J, Ferreira J S, Rossier O, et al. Self-interference (SELI) microscopy for live super-resolution imaging and single particle tracking in 3D [J]. *Frontiers in Physics*, 2019, 7: 68.
- [141] Marar A, Kner P. Three-dimensional nanoscale localization of point-like objects using self-interference digital holography [J]. *Optics Letters*, 2020, 45(2): 591-594.
- [142] Marar A, Kner P. Fundamental precision bounds for three-dimensional optical localization microscopy using self-interference digital holography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 12(1): 20-40.

## Research Progress in Optical Interference Microscopy Toward Three-Dimensional Imaging of Biological Samples

Man Tianlong, Wan Yuhong<sup>\*</sup>, Jian Mengjing, Zhang Wenxue, Zhang Minghua, Ma Teng, Zhang Qin

*Faculty of Science, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China*

### Abstract

**Significance** To minimize the physical damage, phototoxicity, and photobleaching of the biological samples, microscopic imaging methods for the visualization of cells and tissues need to have the ability of noncontract and fast measuring of the three-dimensional (3D) sample information. Far-field optical microscopy, which has been widely applied for biomedical imaging, is one of the most direct and indispensable ways of capturing the dynamic 3D architecture of biological samples. In the optical imaging system, both the intensity and phase distribution of the illumination light field will be quantitatively modulated by the sample and finally transmitted to the detector plane. The demodulation of all the obtained information enables quantitative reconstructions of the samples' 3D spatial structure, morphology profile, and refractive index distribution. However, the existing photon detectors are only sensitive to the intensity distribution of the input light signal. The phase of the light field, which cannot be directly measured by the detector, can be quantitatively coded and decoded from the two-dimensional intensity distribution of the interference pattern using the interference characteristic of light. These basic ideas enable, in principle, fast 3D imaging, tomography, and quantitative phase-contrast imaging and hence benefit the visualization of the dynamic structural and biophysical characteristics of the samples. Furthermore, the details of the fine structures inside the sample can be obtained with improved imaging performance through super-resolution imaging and non-scanning 3D imaging, which are enabled by fluorescent self-interference imaging techniques. All these potential advantages in biological imaging have promoted the rapid development of interference microscopic techniques in the past decades. The interference imaging methods are classified according to the coherence properties of the light source used. The interference microscopic techniques using different light sources enable quantitative phase-contrast imaging, non-scanning 3D imaging, and tomographic imaging to practically benefit the structural and functional visualization of 3D complex biological samples. The advantages, limitations, and potential applications of different interference imaging techniques are shown in Table 1.

**Progress** Different optical systems and numerical methods have been designed to improve the spatial resolution, imaging speed, signal-to-noise ratio, and robustness to extend the application and modalities of the interference microscopic techniques. Among them, research is mainly focused on the applications of digital holography in quantitative phase-contrast imaging (Fig. 4) and non-scanning 3D imaging (Fig. 6) of the sample. Parallel phase shifting (Fig. 8) and compressive sensing (Fig. 9) methods have been combined with digital holography to improve temporal and spatial resolution. Digital holography's large field-of-view, high speed, high resolution, and multidimensional imaging abilities have benefited both functional (Fig. 5) and structural (Fig. 7) imaging of biological samples. With optical sectioning imaging ability and less speckle noise, partially coherent digital holography has been applied for high accuracy phase-contrast imaging of cells (Fig. 10) and, more importantly, for the visualization of the structure behind the tissues (Fig. 11). Because of its 3D tomographic imaging ability, optical coherence tomography (OCT) has become one of the most important tools for ophthalmic imaging (Fig. 13). With extended imaging modalities, polarization sensitive OCT has provided proof-of-principle results in the diagnosis of bronchial disease (Fig. 14). Incoherent holography can considerably improve the temporal resolution of the existing 3D laser scanning fluorescence microscope. Non-scanning 3D imaging of the fluorescence sample has been demonstrated (Fig. 15) with inherent super resolution (Figs. 18 and 19). While some of the major limitations of incoherent holography, such as the low axial resolution, have been addressed and improved

(Fig. 16), the potential of this technique for high-resolution, high-speed 3D fluorescence imaging is still being explored. Successes have been achieved, e.g., by optimizing the 3D imaging performance of fluorescence holography via computational adaptive optics (Fig. 17). In localization-based super-resolution microscopy, the basic idea of interference microscopy has also been used as a point spread function modulation method. Therefore, the system's 3D resolution and imaging depth have been improved (Figs. 21 and 22).

**Conclusions and Prospects** In this paper, we have reviewed the basic principles, recent progresses, advantages, limitations, applications, and potential future directions of the techniques. The system's 3D spatial resolution, imaging speed, and signal-to-noise ratio have been considerably improved during the past decades. Based on the multidimensional (3D spatial + phase) imaging ability of interference microscopy, the applications of the methods for the structural and functional imaging of biological samples have been demonstrated. Further, the imaging modalities have been extended to provide even more data dimensions by combining the interference microscopic techniques such as OCT with polarization imaging method. In conclusion, in interference microscopy, the concurrently obtained structural and functional information of the sample is important for understanding the biological and biophysical mechanisms of the life processes. Interference microscopic techniques have benefited specific research in biological society by providing a powerful 3D imaging tool for both coherent and incoherent light sources. While several efforts have been made to improve system spatial resolution, another important direction in the future is to further develop functional imaging methods by exploring the potential of superior multidimensional data acquisition ability.

**Key words** bio-optics; microscopy; three-dimensional imaging; interference; digital holographic microscopy; optical coherence tomography; incoherent holography; fluorescence self-interference localization