

基于正交双波长测量的有核细胞三维形态重建

龚凌冉, 贾希宇, 徐媛媛, 王亚伟, 季颖*

江苏大学物理与电子工程学院, 江苏 镇江 212013

摘要 细胞是有机体结构与生命活动的基本单位,其形态结构往往与功能状态相匹配,因而细胞的形态是生命科学的重要研究内容,对临床医学诊断也有着重要的意义。定量相位成像技术作为一种强大的无损、无标记成像工具,可为定量评估细胞提供重要的生物、物理特性信息。提供的相位图虽携带了样品内部结构信息,但样品厚度与折射率耦合在相位数据中,需要借助算法对相位数据进行解耦,才能重建样品的三维形态。提出了基于两路正交的双波长相位信息重建多介质相位体三维形态的方法。以有核生物细胞为例,利用该方法对样本的两幅同方向双波长相位图按亚结构分布进行区域划分,对应解析不同区域内参考点的相位值,提取出胞质折射率及其沿入射光方向的厚度分布,据此分离胞质和胞核各自引起的相位;进一步联合正交方向的相位图,获取胞核中参考点在对应方向上的物理厚度,并相继计算出胞核的平均折射率和胞核整体厚度分布,从而利用两个正交方向的三幅相位图重建出样品的三维形态。

关键词 生物医学; 相位成像; 形态重建; 双波长; 正交成像

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2007206

1 引言

细胞是生命体最基本的结构和功能单元,其细胞形态结构与生命体状态直接相关,在生命科学研究和临床检验应用中有重要意义^[1]。由于生物细胞在可见光波段中的吸收率和对对比度较低,目前的成像方法往往需要对样品进行外源性的标记以提高成像的对比度和特异性^[2]。但标记过程不仅增加了人工成本,也对生物样本造成了破坏。为了简化样本制备过程、减少对测物体的干扰,无标记光学成像成为生物医学光学成像研究中的热点之一^[3]。定量相位成像(QPI)技术^[4-5]可以在生物样本原态下对其进行观察研究,是一种强大的、无标记的“薄”生物样本二维成像方法。但是 QPI 技术测量的是样品引起的光程差,折射率与厚度信息耦合在相位数据中,样本的三维形态信息无法得到直接展示。因此,多种不同的解耦技术被提出,其中双波长测量法因操作相对简单而受到很多关注^[6]。该方法使用不同的波长入射,为每个空间位置生成两个带有两个未知数的方程,从而实现折射率与厚度的解耦。例如 Jafarfard 等^[7]使用乙二醇($C_2H_6O_2$)作为环境液,以直径为 $10\ \mu\text{m}$ 的球形二氧化硅珠作为样本,当照射波长从 $532\ \text{nm}$ 改为 $632\ \text{nm}$ 时,环境液的折射率相差 0.019 ,忽略不同波长下样本的折射率变化,进而解耦得到二氧化硅珠的厚度和折射率。考虑

到乙二醇溶液对细胞的毒性,Boss 等^[8]提出以 FCF 溶液替代乙二醇溶液,该溶液具有高度色散性,更适合动态研究。但因为细胞本身的折射率变化与环境液相比可忽略不计,上述双波长技术仅适用于单一介质样本,尚不能将具有亚结构的多介质相位体(例如有核细胞)的内部结构表达出来。针对这一不足,本文在双波长测量法的基础上,结合边缘提取和正交成像,提出了一种快速分离样本亚结构相位信息,进而反演相位体三维形态的方法,以期细胞结构研究提供一定的参考。

2 双波长测量下的样品亚结构相位分离

在人外周血细胞中,单核细胞、淋巴细胞等白细胞的变形运动较为活跃,其形态变化对临床医学研究有重要意义,比如各种病毒感染、局部贫血、白血病、视网膜病变等都可以从白细胞的形态变化中得知^[9]。本文以单核细胞为例建立相位体模型,探究从相位数据中快速解耦物理厚度等形态信息的方法。以图 1 所示的双介质模型来模拟单核细胞,并沿袭大多数同类建模工作惯例,将同一亚结构的折射率视作均匀分布,用平均折射率来描述。

假设环境液的折射率为 n_0 ,细胞质的折射率为 n_1 ,细胞核的折射率为 n_2 。细胞质和细胞核沿 Z 轴方向的厚度分别为 h_1 、 h_2 。波长为 λ 的平行光沿 Z 轴方

收稿日期: 2022-05-16; 修回日期: 2022-06-16; 录用日期: 2022-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(11874184)、江苏大学农业装备学部项目(NZXB20200215)

通信作者: *jy@ujs.edu.cn

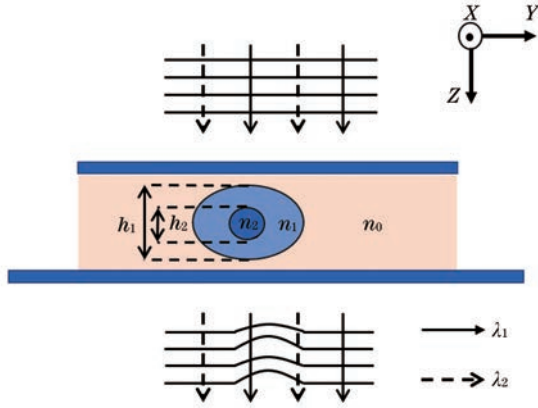


图 1 双波长测量法示意图

Fig. 1 Schematic of dual wavelength measurement method

向照射,细胞引起的相移可表示为

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} [(n_1 - n_0)h_1 + (n_2 - n_1)h_2]. \quad (1)$$

若入射光仅经过环境液,则 $n_1 = 0$ 且 $n_2 = 0$;若入射光仅经过环境液和胞质,则 $n_2 = 0$;若入射光经过环境液、胞质和细胞核,则 n_0, n_1, n_2 均不为零。在双波长下,环境液、细胞质、细胞核的折射率分别表示为 n_{0,λ_i} ($i=1,2$)、 n_{1,λ_i} ($i=1,2$)、 n_{2,λ_i} ($i=1,2$)。不同入射波长引起的各介质折射率变化分别为 $\Delta n_0 = n_{0,\lambda_1} - n_{0,\lambda_2}$, $\Delta n_1 = n_{1,\lambda_1} - n_{1,\lambda_2}$, $\Delta n_2 = n_{2,\lambda_1} - n_{2,\lambda_2}$ 。在高度色散 ($\Delta n_1, \Delta n_2 \ll \Delta n_0$) 的情况下,生物细胞本身各部分的折射率变化与环境液的变化相比可忽略不计^[7]。因此,双波长下细胞相对于环境液体的相位偏移可分别表示为

$$\varphi_{\lambda_1} = k_1 [(n_1 - n_{0,\lambda_1})h_1 + (n_2 - n_1)h_2], \quad (2)$$

$$\varphi_{\lambda_2} = k_2 [(n_1 - n_{0,\lambda_2})h_1 + (n_2 - n_1)h_2], \quad (3)$$

式中: $k_1 = \frac{2\pi}{\lambda_1}$; $k_2 = \frac{2\pi}{\lambda_2}$ 。 $\varphi_{\lambda_1}, \varphi_{\lambda_2}$ 为已知量, n_1, n_2, h_1, h_2 为待求量。通过相减操作即可得到胞质沿 Z 方向的厚度分布:

$$k_1 \varphi_{\lambda_2} - k_2 \varphi_{\lambda_1} = k_1 k_2 (n_{0,\lambda_1} - n_{0,\lambda_2}) h_1, \quad (4)$$

$$h_1 = \frac{k_1 \varphi_{\lambda_2} - k_2 \varphi_{\lambda_1}}{k_1 k_2 (n_{0,\lambda_1} - n_{0,\lambda_2})} = \frac{\lambda_2 \varphi_{\lambda_2} - \lambda_1 \varphi_{\lambda_1}}{2\pi(n_{0,\lambda_1} - n_{0,\lambda_2})}. \quad (5)$$

在得到细胞质沿 Z 方向的厚度信息后,如果再求得细胞质的折射率,就可以分离细胞质与细胞核的相位。此处样品各介质折射率与入射波长无关,但是相位值与波长有关,在上述计算处理中,两个波长下的相位图在功能上是对称等效的。也就是说,在基于任意单幅相位分布图求得细胞质折射率后,都可以借助另一幅相位图计算并分离出细胞质和细胞核在相应波长下的相位。下文以入射光波长 λ_1 为例给出相位分离的处理过程。

根据样本相位分布的特点,在不含细胞核的区域(该区域可通过边缘检测划分提取)任选一点 (x_0, y_0) ,该点的相位只由细胞质引起,与细胞核无关,故可以表示为

$$\varphi_{\lambda_1}(x_0, y_0) = \frac{2\pi}{\lambda_1} (n_1 - n_{0,\lambda_1}) h_1(x_0, y_0). \quad (6)$$

根据点 (x_0, y_0) 处的厚度信息,可以得到细胞质的折射率为

$$n_1 = \frac{\lambda_1 \varphi_{\lambda_1}(x_0, y_0)}{2\pi h_1(x_0, y_0)} + n_{0,\lambda_1}. \quad (7)$$

至此细胞质的折射率以及各点的厚度都已知,故细胞质的相位可以表示为

$$\varphi_z = \frac{2\pi}{\lambda_1} (n_1 - n_{0,\lambda_1}) h_1. \quad (8)$$

将式(1)减去式(8),可以分离出细胞核引起的相位,表示为

$$\varphi_h = \varphi_{\lambda_1} - \varphi_z = \frac{2\pi}{\lambda_1} (n_2 - n_1) h_2. \quad (9)$$

下面以几个具有不同结构特征的细胞模型为例来说明该相位分离方法的效果。首先对于单核细胞模型,由于其细胞体通常呈球形或椭球形,细胞核的形态变化较大,通常呈球形、马蹄形、肾形或不规则形状^[10],故用椭球模拟细胞质(X轴、Y轴、Z轴半径分别为 12、18、12 μm),以半径为 4 μm 的球体表示细胞核,细胞质和细胞核的中心坐标分别为 $(0, 0, 0)$ 和 $(2, 2, 2)$,其三维形态如图 2 所示,其中 X、Y、Z 为三个方向的长度坐标。参考生物细胞常见的折射率分布情况^[11],设细胞质的折射率为 1.36,细胞核的折射率为 1.45。衍射面的几何尺寸设置为 40 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$,入射光沿 Z 方向入射,波长分别为 $\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 532 \text{ nm}$ 。环境液折射率的设置参考实验中常用的生理盐水,两种波长下分别为 1.339 和 1.348^[12]。相位分布 $\varphi_{\lambda_1}, \varphi_{\lambda_2}$ 如图 3(a)、(b)所示,其中 X'和 Y'为两个方向的像素坐标。由式(5)可得到沿 Z 方向每一个像素点处细胞质对应的厚度分布 h_1 。

结合相位图的物理意义和前期实验工作^[13],对相位图进行梯度处理以获得样本结构的边缘数据。图 3(c)是对图 3(a)沿 X'方向取梯度后的结果。在不含细胞核的区域任选一点,例如图 3 中 A'(129, 100) (此处为像素坐标,下同),该点在 $\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$ 时相

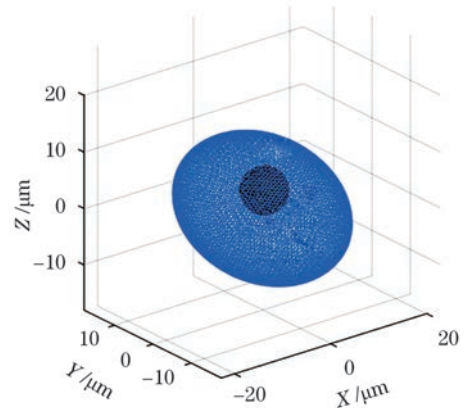


图 2 球形胞核的单核细胞模型图

Fig. 2 Schematic of monocyte with spherical nucleus

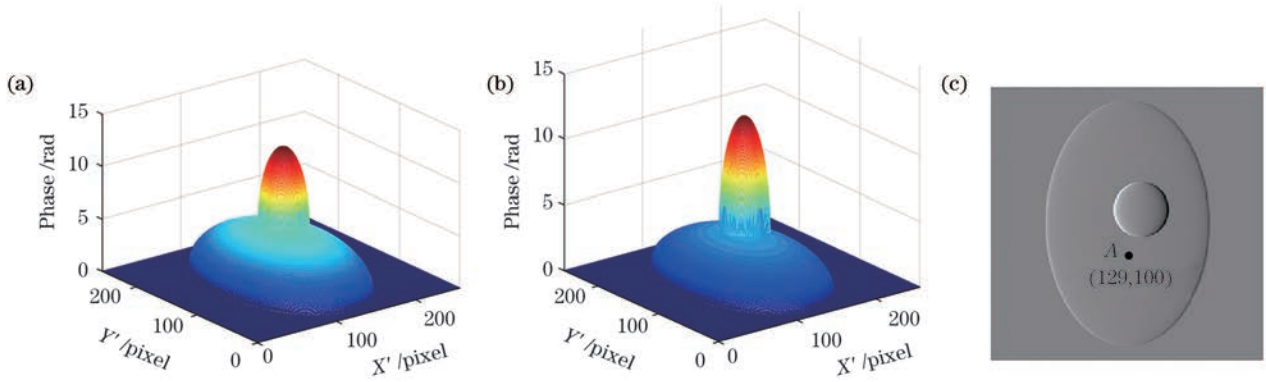


图 3 球形胞核的单核细胞模型的相位分布。(a)沿 Z 方向入射的相位图($\lambda_1=632.8 \text{ nm}$)；(b)沿 Z 方向入射的相位图($\lambda_2=532 \text{ nm}$)；(c)图 3(a)的梯度图

Fig. 3 Phase distributions of monocyte with spherical nucleus. (a) Phase diagram for incidence along Z direction ($\lambda_1=632.8 \text{ nm}$)；(b) phase diagram for incidence along Z direction ($\lambda_2=532 \text{ nm}$)；(c) gradient diagram of Fig. 3 (a)

位值为 2.7675 rad,厚度为 23.227 μm (由像素坐标转化而来),根据式(7)计算得细胞质折射率 $n_1=1.36$ 。需要说明的是,这是数值计算的结果,实际精度还要取决于设备性能等诸多实验因素。联合该平均折射率

n_1 和厚度分布 h_1 就可以分离出细胞质在 Z 方向引起的相位,如图 4(a)所示;进而用细胞整体和细胞质的相位相减就可以得到细胞核引起的相位,如图 4(b)所示。

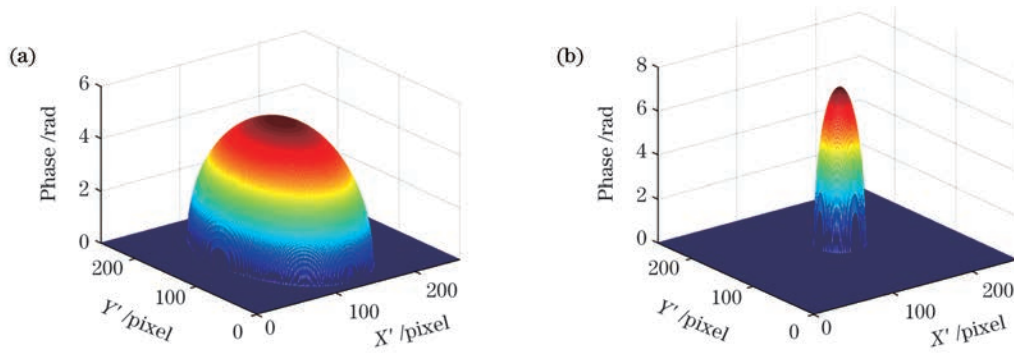


图 4 相位分离结果。(a)细胞质相位；(b)细胞核相位

Fig. 4 Phase separation results. (a) Cytoplasmic phase；(b) nucleus phase

上述分离相位的过程仅涉及两幅相同方向的相位图,并未对亚结构形态或其平均折射率加以限定,也就是说适用于任意形态的样本。为了验证说明这一点,本文以单核细胞的另一形态为原型,建立了图 5(a)所示的相位体模型。其细胞核为马蹄形,其截面是半径为 2 μm 的圆,细胞质是半径为 16 μm 的球体。按照

上述算法流程获得入射光波长为 632.8 nm 时细胞质引起的相位,如图 5(b)所示;进而结合整体相位分布分离出细胞核相位,如图 5(c)所示,该结果与原模型相符。

对于结构更加复杂的样本,如嗜酸性粒细胞,通常有两个细胞核。对于这类多介质相位体,本文也建立

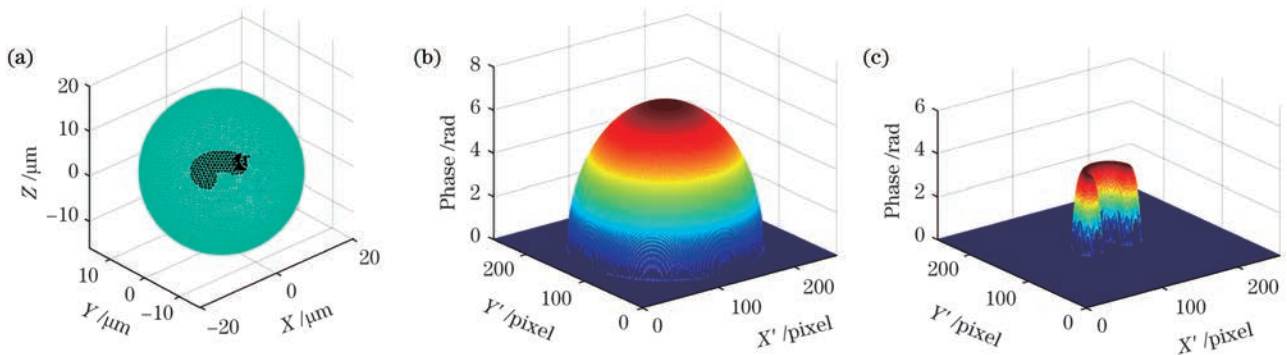


图 5 马蹄形胞核的单核细胞的亚结构相位分离。(a)细胞三维模型；(b)球形细胞质相位；(c)马蹄形细胞核相位

Fig. 5 Substructure phase separation of monocyte with horseshoe-shaped nucleus. (a) Three-dimensional model of cell；(b) spherical cytoplasmic phase；(c) horseshoe-shaped nucleus phase

了相应的模型以考察该相位分离方法的可行性。由于前面已经论证过上述计算对样本物理形状的普适性, 此处着重验证其在更复杂折射率分布情形下的效果, 均用球形模拟不同的亚结构, 其中细胞质半径为 $4 \mu\text{m}$, 细胞核的半径分别为 $2.5 \mu\text{m}$ 和 $2 \mu\text{m}$, 细胞质和两个细胞核的中心坐标分别为 $(0, 0, 0)$ 、 $(0, -2, 0)$ 和 $(0, 3, 0)$, 其三维形态如图 6(a) 所示。细胞质的折射率为 1.36, 较大细胞核的折射率为 1.43, 较小细胞核的折射率为 1.45, 因该模型尺寸较小, 衍射面几何

尺寸设置为 $16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$ 。

当入射光沿 Z 轴方向照射时, 得到的相位图及其相应的梯度分布分别如图 6(b)、(c) 所示。为简洁起见, 仅展示了 $\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$ 的梯度图。梯度处理结果提示该细胞有两个细胞核。执行与上例相同的操作即可将细胞质的相位分布分离出来, 如图 6(d) 所示。对于细胞核相位的分离, 在细胞质引起的相位被分离出去后, 两个细胞核的相位在空间上已经是分开的状态了, 仅需分别提取即可, 如图 6(e)、(f) 所示。

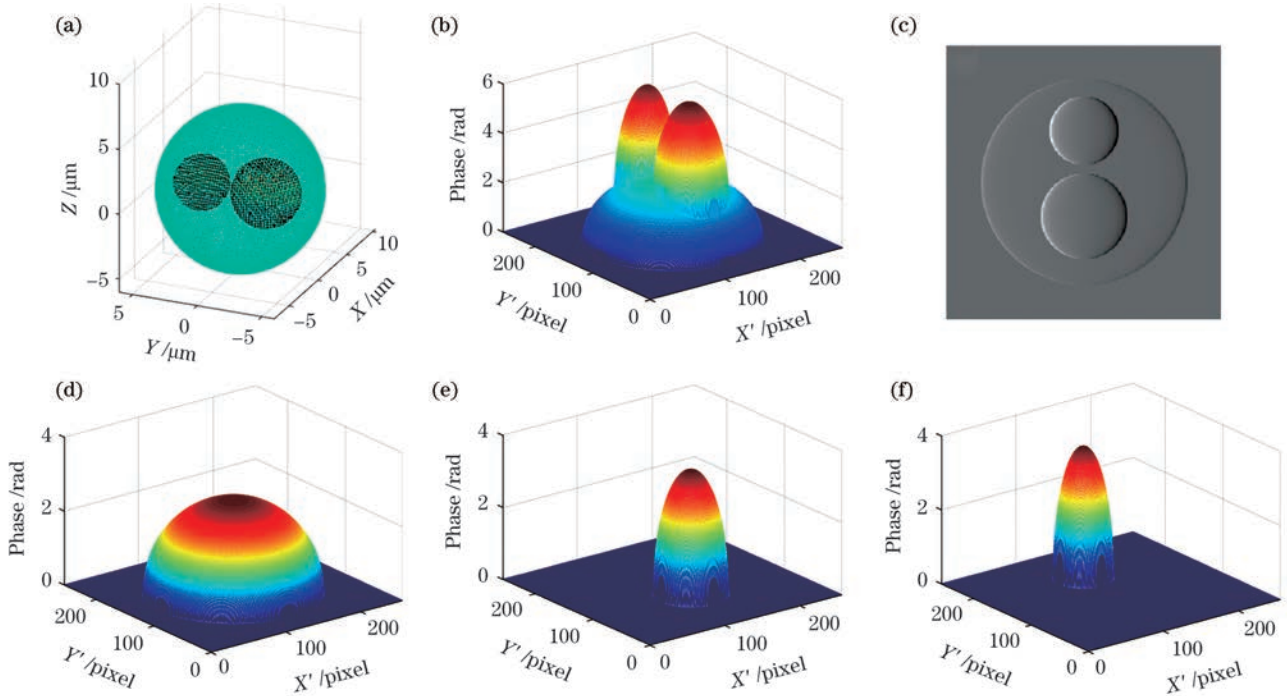


图 6 嗜酸性粒细胞模型。(a) 三维模型; (b) 沿 Z 方向入射的相位图; (c) 梯度图; (d) 细胞质相位; (e) 较大细胞核相位; (f) 较小细胞核相位

Fig. 6 Eosinophil model. (a) Three-dimensional model; (b) phase diagram for incidence along Z direction; (c) gradient map; (d) cytoplasmic phase; (e) larger nucleus phase; (f) smaller nucleus phase

上述单独分离出来的亚结构相位尚不能直接反映样本形态, 但其可为后续形态重建提供数据支持, 还可以用于一些微结构动态分析, 例如核的形态分叶或细胞局部离子浓度变化的表征^[14]。同时, 值得注意的是, 上述数据处理过程基于一个前提, 即样本亚结构在入射光方向上没有相互遮挡, 否则整体相位图中两个细胞核引

起的相位可能叠加在一起。例如, 若入射光沿 Y 轴方向照射, 相位分布如图 7(a) 所示。对于这种情况, 上述处理只能将细胞质的相位分离出来[图 7(b)], 两个细胞核的相位仍耦合在一起[图 7(c)], 而该结果并不能体现出样品的结构特征。虽然光镊可无接触地操控单细胞^[15-16], 但其大多用于搬运细胞, 实现细胞翻转的难度

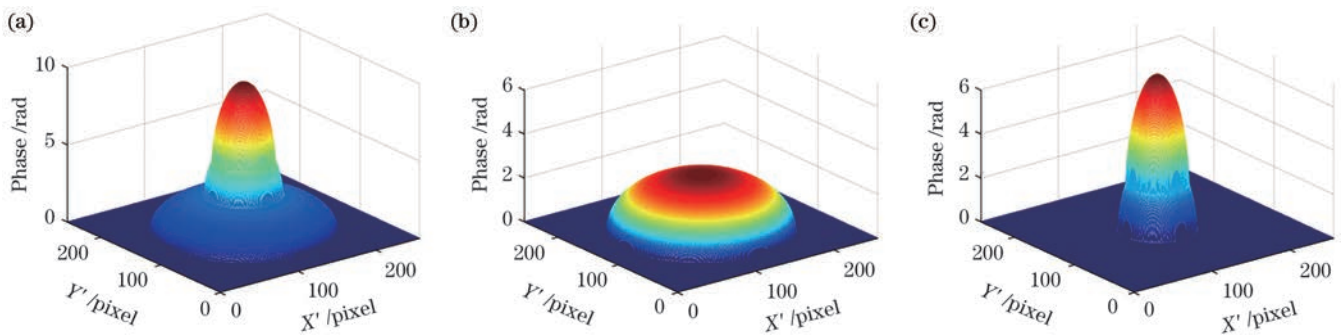


图 7 另一方向入射下的嗜酸性粒细胞模型的相位分布。(a) 沿 Y 方向入射的相位图; (b) 细胞质相位; (c) 两个细胞核相位
Fig. 7 Phase distributions of eosinophil model for incidence along the other direction. (a) Phase diagram for incidence along Y direction; (b) cytoplasmic phase; (c) phase of two nuclei

相对较大,并且光镊直接作用于细胞时激光生物学效应会对某些敏感细胞产生不同程度的伤害^[17],加载成本也会大幅提升。故下文通过增加一个方向的入射光来实现两个细胞核相位的分离,进而重建样本形态。

3 基于正交相位分布的样品三维形态重建

本节仍以图 2 所示的球形细胞核的单核细胞模型为例说明形态重建原理及流程。为了获取更多的样品结构信息,使用波长为 $\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$ 的入射光沿 Y 方向照射,获得与 Z 方向成正交的方向的相位图。取波长相同的两幅正交相位图,如图 8(a)、(b)所示,分别为入射光沿 Z 和 Y 方向照射的相位图,坐标平面分别为 XY 和 XZ 。在图 8(a)中细胞核所在区域任取一点 $P(X_1, Y_1)$,该点的相位值可以从图中读取,并且第 2 节中已将细胞质和细胞核各自引起的相位分离,因此细胞核在该点的相位 $\varphi_h(X_1, Y_1)$ 是已知的。根据空间关系,该点对应的物理厚度 $h_2(X_1, Y_1)$ 也就是 XZ 平面上 X_1 处对应的 Z 轴坐标值差值 ΔZ 。在正交方

向的相位图[图 8(b)]中,通过边缘检测提取 ΔZ ,代入相位值解耦出细胞核的平均折射率:

$$n_2 = \frac{\lambda_1 \varphi_h(X_1, Y_1)}{2\pi h_2(X_1, Y_1)} + n_1. \quad (10)$$

再根据平均折射率求解细胞核沿 Z 方向的厚度分布信息:

$$h_2 = \frac{\lambda_1 \varphi_h}{2\pi(n_2 - n_1)}. \quad (11)$$

这里的 P 点是任选的,只要其位于细胞核的区域内即可,同样可以参考边缘提取的结果来选定。我们以该样本细胞核区域内相位值最大点 $O_1(142, 142)$ 为例进行细胞核的重建。为了获得该点对应的细胞核物理厚度,对正交方向的相位图[图 8(b)]沿 X' 方向取梯度,得到图 8(c)所示的结果。提取 $X' = 142 \text{ pixel}$ 这条线上的梯度数据,其中图 8(b)、(c)中的 A 点、 D 点为该线上细胞质的边界点, B 点、 C 点为该线上细胞核的边界点。由 B 点和 C 点可以得到点 O_1 在 Z 方向上的光程。该数据经像素坐标转换,有 $\Delta Z = 7.8125 \mu\text{m}$,利用式(10)、(11)可以依次得到细胞核折射率及其沿 Z 方向的厚度分布 h_2 。

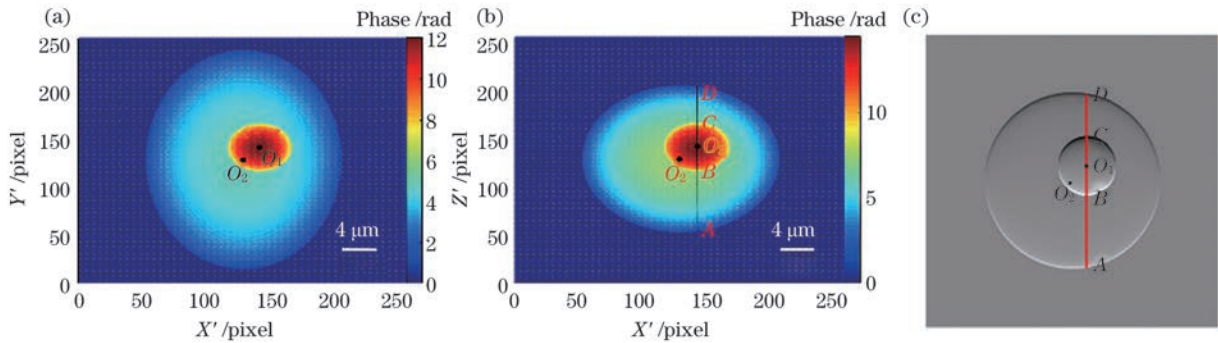


图 8 正交入射下的单核细胞模型的相位分布($\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$)。 (a)沿 Z 方向入射的相位图; (b)沿 Y 方向入射的相位图; (c)图 8(b)的梯度图

Fig. 8 Phase distributions of monocyte model at orthogonal incidence ($\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$). (a) Phase diagram for incidence along Z direction; (b) phase diagram for incidence along Y direction; (c) gradient diagram of Fig. 8 (b)

相位分布可以有效表示细胞在入射光方向的位置以及轮廓信息,根据图 8(a)可知细胞核中心点的像素坐标为 $O_1(142, 142)$,细胞质中心点的像素坐标为 $O_2(129, 129)$,投影面的中心对应二维平面坐标系的原点。根据一个像素点对应的实际物理尺寸,中心点在 XY 平面上的投影坐标分别为 $(2, 2)$ 和 $(0, 0)$ 。同理,由图 8(b)得 O_1 和 O_2 在 XZ 平面上的投影坐标也为 $(2, 2)$ 和 $(0, 0)$ 。考虑到中心位置仅体现细胞质与细胞核的相对位置,为便于定位,这里坐标值均只保留了整数位。因此可以得到细胞质和细胞核的中心位置分别为 $O_1(2, 2, 2)$ 和 $O_2(0, 0, 0)$ 。再结合前面解耦出来的细胞质和细胞核沿 Z 方向的厚度重建样本三维结构,如图 9 所示,耗时 0.1168 s 。

为了定量考察该算法的效果,本文对比了计算结果和模型的几个特征参数,如表 1 所示。由对比结果可以看出,该方法能够较为准确地还原样本的三维形态,尤其细胞质部分的计算值与设置值吻合得很好。

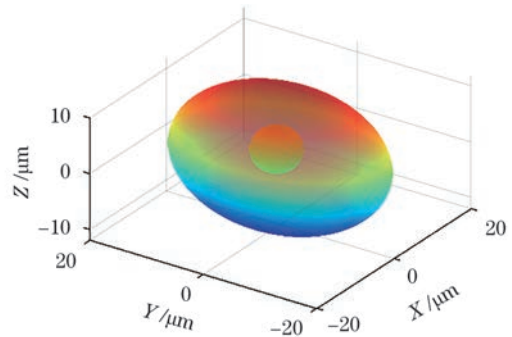


图 9 球形细胞核的单核细胞模型的三维重建形态
Fig. 9 Three-dimensional reconstruction morphology of monocyte model with spherical nucleus

这是因为细胞质的厚度是通过解析相位分布得到的,推导过程并不会引入误差;细胞核厚度则是通过边缘检测、像素坐标转换等环节得到的,而这些环节的数值计算都会产生并累积误差。结合第 2 节内容可知,本重建算法分两步进行,即先对亚结构相位进行分离,再

表 1 球形细胞核的单核细胞模型的形态重建结果

Table 1 Morphological reconstruction results of monocyte model with spherical nucleus

Reconstruction result	Cytoplasm		Nucleus	
	Refractive index	Diameter in Z-axis	Refractive index	Diameter
Actual value	1.36	24 μm	1.45	8 μm
Calculated value	1.36	24 μm	1.4522	7.8125 μm
Error	0	0	0.15%	2.34%

从中解耦各亚结构的折射率和厚度,实施流程图如图 10 所示。

最后,为了考察该方法的普适性,本文以形态结构特征不同的样本模型为例进行了验证。对于只有一个细胞核的样本,仍以图 5 所示的马蹄形细胞核的

单核细胞模型的另一个形态为例。为了简洁起见,与前面相同的数据信息此处不再重复罗列,仅给出正交方向的相位图以及重建过程中用于获取细胞核位置和物理厚度的梯度处理环节,重建结果如图 11(b)和表 2 所示。

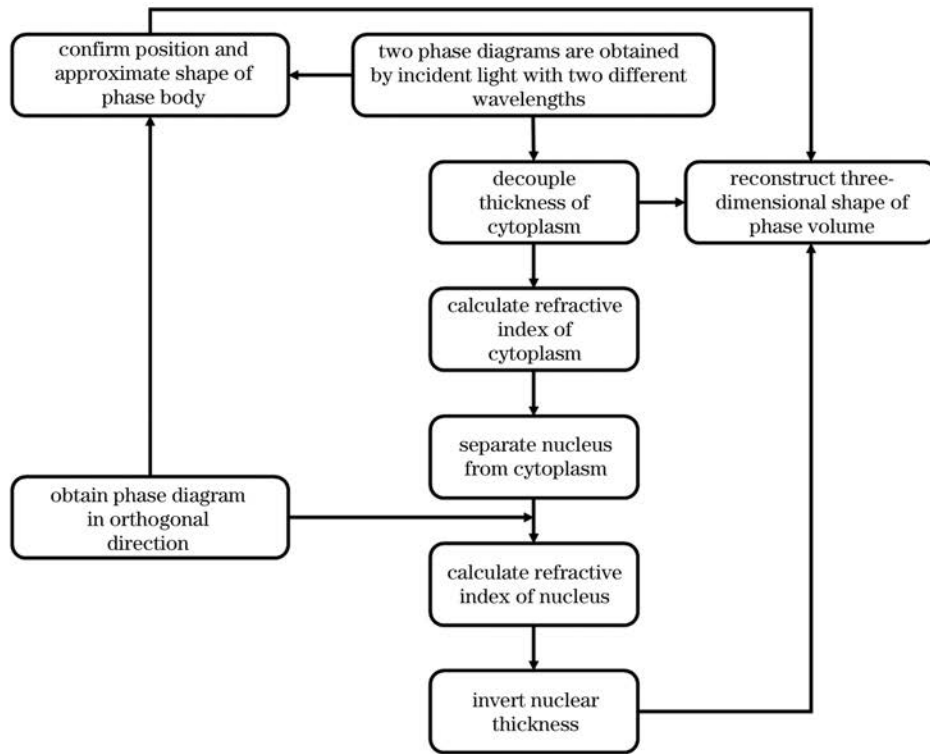


图 10 正交双波长测量法重建相位体三维形态流程图

Fig. 10 Flow chart for reconstructing three-dimensional morphology of phase volume by orthogonal dual wavelength measurement method

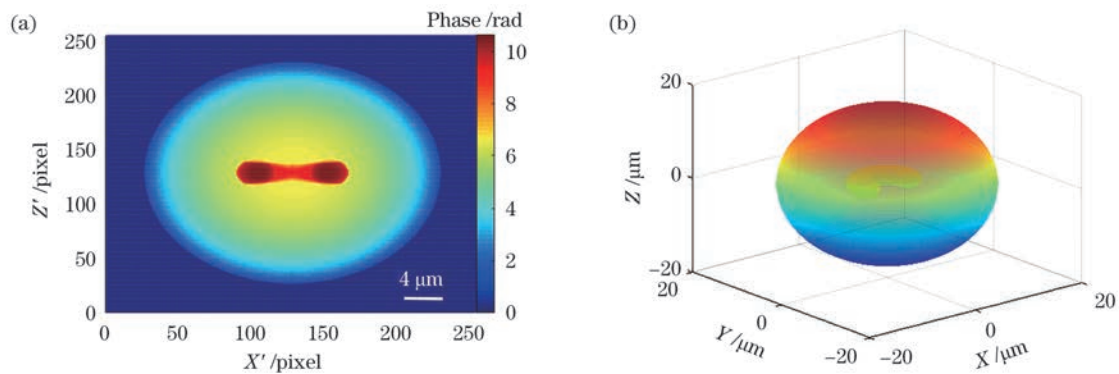


图 11 马蹄形细胞核的单核细胞模型的形态重建。(a)正交方向的相位图($\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$); (b)重建的三维形态

Fig. 11 Morphological reconstruction of monocyte model with horseshoe-shaped nucleus. (a) Phase diagram in orthogonal direction ($\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$); (b) reconstructed three-dimensional morphology

表 2 马蹄形胞核的单核细胞模型的形态重建结果

Table 2 Morphological reconstruction results of monocyte model with horseshoe-shaped nucleus

Reconstruction result	Cytoplasm		Nucleus	
	Refractive index	Diameter	Refractive index	Diameter of section
Actual value	1.36	32 μm	1.45	4 μm
Calculated value	1.36	32 μm	1.4521	3.9979 μm
Error	0	0	0.15%	0.05%

对于含有多个细胞核的样本,为了解决第 2 节中单方向入射时细胞核的相互遮挡使得细胞核相位无法解耦的问题,增加了一束正交方向的入射光。仍以图 6 所示的嗜酸性粒细胞模型为例,图 12(a)和图 12(b)为正交方向的相位图($\lambda_1 = 632.8 \text{ nm}$)。图 12(b)中入射方向的胞核相位虽有重叠,但是我们用梯度算法仍可以将两个细胞核的边缘提取出来,如图 12(c)所示。图 12(a)中 $O'_0(X_0, Y_0)$ 点处的厚度对应于图 12(c)中 B_2 点与 E_2 点的距离, $O'_1(X'_1, Y'_1)$ 点

处的厚度对应于图 12(c)中 C_2 点与 D_2 点的距离,可得 $|B_2E_2| = 4.875 \mu\text{m}$, $|C_2D_2| = 3.875 \mu\text{m}$ 。根据 O'_0 和 O'_1 相位信息及对应的厚度信息即可分别计算得到两个细胞核的平均折射率。将折射率代入各自相位表达式,则可以分别得到两个细胞核沿 Z 方向的厚度信息。重建得到的三维形态如图 12(d)所示,相应的定量参数及其误差分析如表 3 所示。结果表明,该重建算法同样适用于多个不同细胞核的情形。

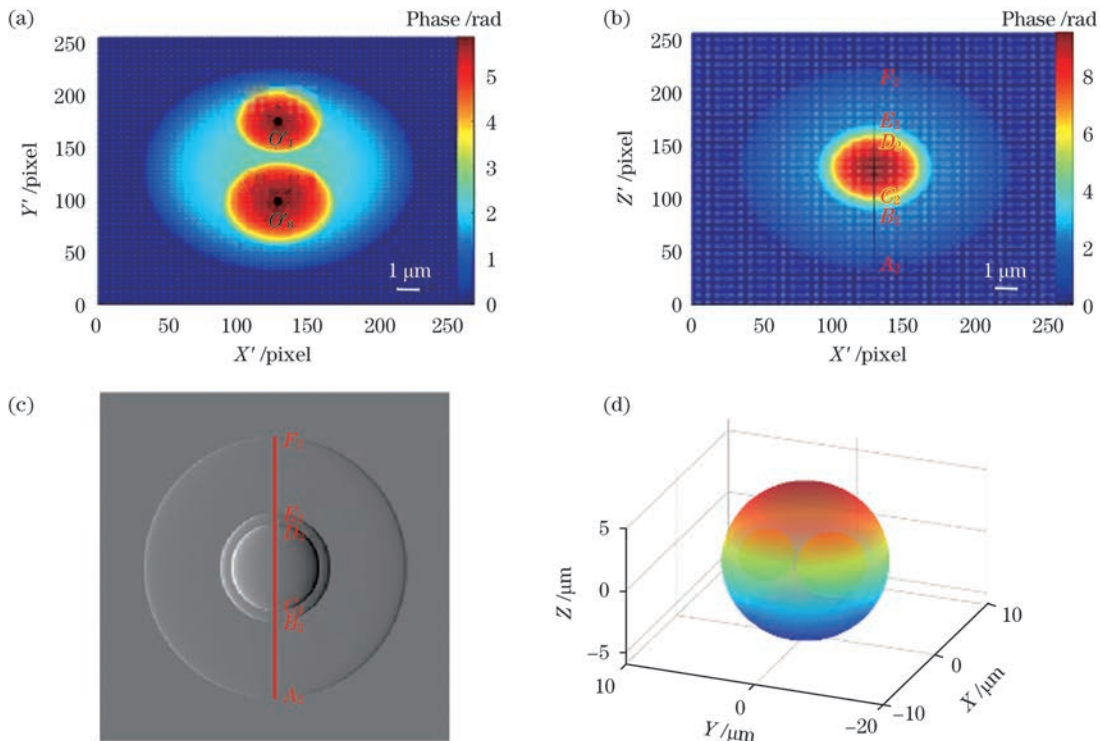


图 12 正交双波长入射下的嗜酸性粒细胞模型。(a)沿 Z 方向入射的相位图;(b)沿 Y 方向入射的相位图;(c)图 12(b)的梯度图;(d)重建的三维形态

Fig. 12 Eosinophil model under orthogonal dual-wavelength incidence. (a) Phase diagram for incidence along Z direction; (b) phase diagram for incidence along Y direction; (c) gradient diagram of Fig. 12 (b); (d) reconstructed three-dimensional morphology

表 3 双核的嗜酸性粒细胞模型的形态重建结果

Table 3 Morphological reconstruction results of binuclear eosinophil model

Reconstruction result	Cytoplasm		Nucleus 1		Nucleus 2	
	Refractive index	Diameter	Refractive index	Diameter	Refractive index	Diameter
Actual value	1.3600	12 μm	1.4300	5 μm	1.4500	4 μm
Calculated value	1.3600	12 μm	1.4318	4.875 μm	1.4525	3.8921 μm
Error	0	0	0.12%	2.5%	0.17%	2.7%

4 结 论

提出了一种基于正交双波长相位图像的有核细胞三维形态重建方法。该方法仅需要从两个方向采集三幅相位图,数据量小,同时可避免样本亚结构相互遮挡引起的相位重叠问题,对样本位置姿态及其亚结构形态无限制要求。仿真结果证明了该算法的有效性,其重建速度快,可满足实时检测要求。同时也注意到,在实际应用中,由于生物细胞等真实样本的折射率并不是理想均匀分布的,在上述反演计算中需要用平均折射率来进行简化替代,这就会丢失一部分亚结构细节,从而影响重建结果的分辨率。除了算法的计算过程外,重建的误差更多来源于数据噪声、相位恢复的误差、边缘检测的误差等,每一个环节都需探索降低误差的方法。例如我们在前期工作中曾着重探究过边缘提取的采样策略^[13],如何基于实验快速获得高精度、高分辨率的重建结果是我们今后研究工作的重点。此外,对于具有更加复杂亚结构的细胞,例如细胞核数目较多的中性粒细胞,在两束入射光下可能会出现细胞核相位重叠的现象。对于上述问题,可以从光路设计方面着手优化并探究相应的重建算法。

参 考 文 献

- [1] Cacace T, Bianco V, Ferraro P. Quantitative phase imaging trends in biomedical applications [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 135: 106188.
- [2] Mehta D S. Quantitative phase optical microscopic techniques for biomedical imaging and diagnostic applications [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, 2018, 88(3): 437-451.
- [3] Li Y F, Fanous M J, Kilian K A, et al. Author Correction: quantitative phase imaging reveals matrix stiffness-dependent growth and migration of cancer cells [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 19025.
- [4] 杨泽文, 张璐, 吕宁, 等. 生物折射率三维无标记定量成像研究进展 [J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507201.
Yang Z W, Zhang L, Lü N, et al. Progress of three-dimensional, label-free quantitative imaging of refractive index in biological samples [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507201.
- [5] 穆书奇, 董大山, 施可彬. 无标记光学成像技术 [J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(12): 1200001.
Mu S Q, Dong D S, Shi K B. Label-free optical imaging technology [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(12): 1200001.
- [6] Xu X Q, Wang Y W, Xu Y Y, et al. Dual-wavelength in-line phase-shifting interferometry based on two dc-term-suppressed intensities with a special phase shift for quantitative phase extraction [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(11): 2430-2433.
- [7] Jafarfard M R, Moon S, Tayebi B, et al. Dual-wavelength diffraction phase microscopy for simultaneous measurement of refractive index and thickness [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(10): 2908-2911.
- [8] Boss D, Kühn J, Jourdain P, et al. Measurement of absolute cell volume, osmotic membrane water permeability, and refractive index of transmembrane water and solute flux by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(3): 036007.
- [9] 韩豪. 非正交相位成像下的血细胞相位恢复及三维形态重建技术研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
Han H. Phase retrieval method and 3D morphological reconstruction technology of blood cells based on non-orthogonal phase imaging [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [10] Wang Y W, Chen Y J, Lu C H, et al. Phase features of several typical blood cells and their identification without unwrapping [J]. *Optica Applicata*, 2013, 43(3): 505-514.
- [11] Tang W B, Ji Y, Zhang M M, et al. A rapid detection method for morphological characteristics of biological cells based on phase imaging [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 4651639.
- [12] Li X C, Liu L H, Zhao J M, et al. Optical properties of sodium chloride solution within the spectral range from 300 to 2500 nm at room temperature [J]. *Applied Spectroscopy*, 2015, 69(5): 635-640.
- [13] 张明明. 基于光相位边缘特征提取的生物细胞形态及动态活动快速检测实验研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
Zhang M M. Experimental analysis of biological cell morphological rapid detection based on edge extraction of optical phase information [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [14] Ji Y, Fu S, Zhang M M, et al. Characterization of the solution concentration variation in microstructure by phase imaging [J]. *Journal of Modern Optics*, 2020, 67(5): 454-461.
- [15] Han H, Xu Y Y, Liao J R, et al. Real-time measurement of three-dimensional morphology of blood cells in batches by non-orthogonal phase imaging [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 134: 106303.
- [16] Habaza M, Gilboa B, Roichman Y, et al. Tomographic phase microscopy with 180° rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(8): 1881-1884.
- [17] 梁言生, 姚保利, 雷铭. 全息光镊在生物学研究中的应用 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207020.
Liang Y S, Yao B L, Lei M. Applications of holographic optical tweezers in biological research [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207020.

Three-Dimensional Morphological Reconstruction of Nucleated Cell Based on Orthogonal Dual-Wavelength Measurement

Gong Lingran, Jia Xiyu, Xu Yuanyuan, Wang Yawei, Ji Ying*

School of Physics and Electronic Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract

Objective Cells are the basic units of biomass, and their morphological structures are often associated with the functional state of biomass. Therefore, the morphology of a cell is an important research topic in life science and a critical factor in clinical medical diagnosis. Quantitative phase imaging technology, as a powerful nondestructive and label-free imaging

tool, provides various biological and physical properties for the quantitative evaluation of cells. Although the phase diagram of the sample provided by this technology contains information about its internal structure, the thickness and refractive index of the sample is coupled with the phase data. Decoupling the phase data is required to reconstruct a three-dimensional (3D) morphology of the sample. Dual-wavelength imaging technology is effective for single medium samples. However, this method does not work for multimedia phase objects. In response to this shortage, this study proposes a new reconstruction method based on orthogonal dual-wavelength measurements.

Methods The 3D reconstruction method is based on three phase images from two orthogonal directions. Two of these phase images are obtained with two different wavelengths. The first step is to separate the phase shift due to different substructures. Given that the environmental liquid is a highly dispersive material relative to the cell sample, the refractive index (RI) of the environmental liquid correspondingly changes under different incident light, whereas the RI of the sample remains constant. Thus, by subtracting the two images at two different wavelengths, the physical thickness of the media adjacent to the environment (such as cytoplasm) can be determined. Next, the average RI of the cytoplasm can be extracted using the associated phase value distribution, while phase shifts due to cytoplasm and nucleus are also separated immediately. Following that, the thickness information of the nucleus for the incidence along the two directions can be obtained using a phase diagram from the orthogonal direction. Thus, the RI of the nucleus can be calculated from the nuclear phase value. The relative position of the cytoplasm and nucleus can also be determined using two orthogonal phase diagrams. The 3D morphology of the multimedia phase object is obtained by combining the physical thickness distributions of the cytoplasm and nucleus.

Results and Discussions The reconstructions of models with different structural characteristics are explored, including a cell with a single spherical nucleus (Fig. 2), a cell with a single saddle shape nucleus [Fig. 5(a)], and a binuclear cell with a double spherical nucleus [Fig. 6(a)]. The results of these samples [Figs. 9, 11(c), and 12(e)] are consistent with the initial model. Especially, the analytic method provides a sharp reconstruction result of the physical thickness of the cytoplasm and the entire reconstruction process takes a short time (Tables 1, 2, and 3). This study suggests the feasibility of this reconstruction method, but the actual application effect depends on many factors, such as image noise, heterogeneity of RI distribution, and calculation error in edge detection. An emphasis of the following study is to explore an efficient reconstruction algorithm suitable for experiments.

Conclusions This study proposes a 3D morphological reconstruction method for nucleated cells based on orthogonal dual-wavelength phase images. This method requires three phase images from two orthogonal directions and is divided into two steps. First, using the high dispersion characteristics of environmental liquid and edge detection, the phases of the cytoplasm and nucleus are separated based on the independence and superposition of phase data, and the thickness of the cytoplasm is decoupled simultaneously. Then, the 3D morphology of the sample is reconstructed using another orthogonal phase diagram, RI and thickness information of the coupling nucleus, and the relative position relationship of the substructure expressed by two mutually orthogonal phase diagrams. This method collects sample information from two directions simultaneously. A small amount of data means convenient data acquisition and fast data processing. The simulation results show that the algorithm, which may provide a reference for real-time imaging of biological cells, is effective.

Key words bio-optics; phase imaging; morphological reconstruction; dual wavelength; orthogonal imaging