

基于数字全息显微层析的癌细胞空泡化成像研究

刘雅坤¹, 肖文¹, 车蕾平¹, 李胤嘉³, 肖溪², 王皓², 潘锋^{1*}

¹北京航空航天大学仪器科学与光电工程学院精密光机电一体化技术重点实验室, 北京 100191;

²北京大学第三医院肿瘤放射治疗科, 北京 100191;

³北京大学第三医院基础医学研究中心, 北京 100191

摘要 癌症作为一种恶性化程度和致死率很高的疾病, 是世界各国共同面对的难题。研究癌细胞的死亡过程, 对于研究癌症的病理学机理以及探究有效的癌症治疗方法具有重要意义。本团队采用数字全息显微层析成像技术, 对膀胱癌细胞内部的空泡进行了全息记录和衍射再现, 获得了癌细胞在不同角度下的复光场数据; 然后采用衍射层析重建算法结合非负约束条件, 层析重构了癌细胞内部空泡的三维形态和空间位置, 证实了数字全息显微层析技术在癌细胞内部空泡三维成像方面的优势和潜力。这一成像方式在研究癌细胞类凋亡过程中的形态变化以及探索新的癌症治疗策略等方面具有重要的应用价值。

关键词 医用光学; 全息; 显微成像; 层析技术; 癌细胞空泡化

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2007209

1 引言

癌症是一种由恶性癌细胞不受控制的生长和分裂引起的疾病。自 21 世纪以来, 癌症的发病率和死亡率在全球范围内迅速增长, 是世界各国共同面对的难题^[1-2]。癌细胞是一种具有快速分裂和增殖能力的细胞, 其形态和物理化学性质均与正常细胞存在很大差异, 例如: 细胞间的黏附减少使其更容易侵袭和转移; 细胞的形状和硬度可随环境的变化而变化, 使其具有更强的环境适应能力^[3]。在单细胞水平上对癌细胞的形态和功能展开研究, 尤其是对癌细胞死亡过程展开研究, 对于研究癌症的病理学机理以及研究以诱导癌细胞死亡为基础的各种治疗方法具有重要意义。

对癌症治疗过程的研究有赖于对癌细胞死亡机制的认识。研究表明, 除了细胞凋亡外, 还存在一种被称为细胞类凋亡的细胞程序性死亡方式, 其表现形式是细胞质内产生液泡, 同时线粒体和内质网肿胀, 随后液泡融合产生更大的空泡^[4-5]。目前, 在光动力治疗(即通过光敏剂在特定亚细胞位点对癌细胞产生光损伤)过程中^[6]以及通过藤黄酸^[7]、纳米氧化钆^[8]、奈非那韦^[9]等药物诱导癌细胞死亡过程中均观察到了大量细胞质以及内质网空泡的产生, 证实了这一现象存在的普遍性。对癌细胞内的空泡进行精确定量成像, 不仅可以准确识别细胞类凋亡过程, 还可以通过空泡的大

小、数量、位置等信息, 进一步判断各种治疗方式诱导癌细胞死亡的效果及其作用机制。目前, 常用透射电子显微镜^[10]和免疫荧光显微镜^[11-12]观察癌细胞内部空泡的形态。其中, 透射电子显微镜需要对细胞进行冷冻切片等预处理, 而免疫荧光显微镜则需要预先用荧光染料对细胞进行标记, 二者均不能实现对活体细胞的无损原位定量成像。

数字全息显微成像技术为生物医学研究提供了一种无损非标记的定量显微成像方法。数字全息与光学全息的原理相同, 即通过干涉记录和衍射再现两个步骤还原被测物体的波前分布, 这一思想最早由英国物理学家 Gabor^[13]于 1948 年提出。1967 年, Goodman 和 Lawrence^[14]提出了数字全息的思想, 即用光电传感器件(如 CCD 或 CMOS)代替传统的银盐干板记录全息图, 通过计算机模拟光学衍射过程实现被记录物体的全息再现和处理。随着 CCD 等光电成像器件及计算机性能的不不断提升, 20 世纪 90 年代, 数字全息技术得到了蓬勃发展。自 20 世纪以来, 数字全息技术的应用范围得到了充分拓展, 其应用领域涵盖了信息存储、形貌测量和医学诊断等^[15-17]。全息技术根据所使用光源的波长可分为红外全息、微波全息和可见光全息三类。微波全息能获得被测物体不同于光频的电磁信息, 能透过云层、冰雪、植被及其他光学不透明介质, 但需要较强的能量密度^[18]; 红外全息常被用于烟雾、明火等极端工业

收稿日期: 2022-05-20; 修回日期: 2022-06-21; 录用日期: 2022-08-18

基金项目: 北京市自然科学基金(M22017)、北京大学第三医院创新转化基金(BYSYZHKC2021113)

通信作者: *panfeng@buaa.edu.cn

环境下,但实验装置的调试较为复杂^[19];可见光全息具有光路调试简单、系统稳定、便于观察等特点,在实验室条件下最常用。为了满足对微小被测样品的观测需求,1999年,Depeursinge 研究组^[20]提出了预放大数字全息显微方法,将数字全息与显微成像结合,在干涉之前利用显微物镜对被测样品进行预放大,实现横向分辨率的提升。基于这一方法,该研究组还完成了对花粉、酵母细胞、血红细胞等生物样品的定量成像^[21-22]。作为数字全息技术的一个重要应用,数字全息显微技术以其非接触、非破坏、无标记等特点,在生物医学领域发挥着重要作用,被各国科学家广泛用于活体生物细胞的无标记成像和定量分析,包括细胞的三维形态测量、三维位置动态追踪以及细胞在药物作用下的形态变化检测等^[23-25]。

通过相位分布计算折射率时,由于单次定量相位成像测量得到的相位分布表示的是光程差的大小,即沿着照明光方向样品内各点折射率的线积分,故所得到的折射率值也只是样品在照明光方向上的平均折射率。当已知某些先验信息(如折射率分布均匀或结构具有对称性)时,完整的三维结构可以通过某些积分变换得到。对于一些内部结构比较复杂的三维物体而言,通过单次定量相位成像准确地检测其内部结构是十分困难的。数字全息显微层析技术将数字全息显微成像技术与层析技术相结合,通过数字全息技术获取被测样品在不同角度下的二维振幅和相位分布,然后结合层析重建算法,重建出被测物体的三维折射率分布信息^[26]。早期的层析重建算法采用的是忽略光学衍射效应的计算层析重建方法^[27],然而,当物体尺度与光波长尺度相近或小于光波长尺度时,衍射效应变得不可忽略。基于 1969 年 Wolf^[28]提出的傅里叶衍射定理发展出的一系列衍射层析重建算法,考虑了光波的弱散射效应,大大提高了三维重构精度。目前,衍射层析重建算法已经成为数字全息显微层析重建的标准算法。数字全息显微层析技术结合了数字全息技术和层析技术的优点,在活体细胞的三维成像方面展现出了极大潜力,其无需标记或染色的检测方式可以避免复杂的样本准备过程,也能够消除标记试剂或染色剂对生物样本的影响。此外,其三维定量检测内部结构的能力可以将所测得的折射率数值转化为多种有用的参数,如蛋白质浓度、细胞干重等。国内外许多课题组对其成像质量的提升以及其在生物医学领域的应用展开了大量研究:瑞士成像与应用光学研究所的 Depeursinge 课题组^[29]实现了对硅藻、大肠杆菌、活树突棘等多种生物样本的层析成像;瑞士洛桑联邦理工学院光学实验室的 Psaltis 课题组^[30]运用衍射层析技术,对人结肠癌 HCT-116 细胞和人胰腺癌 Panc-1 细胞进行了成像;加利福尼亚大学洛杉矶分校的 Ozcan 课题组^[31]提出了光源沿两个正交轴旋转的双轴层析成像方案,以减小照明角度受限产生的伪影;意大利国

家应用光学研究所的 Ferrero 课题组^[32]基于细胞在微通道中自由滚动和光学衍射层析原理,提出了一种全息层析成像流式细胞检测技术,并采用该技术对血红细胞和硅藻细胞进行了观察与分类;美国麻省理工学院的 Choi 课题组^[33]通过层析三维折射率定量测量,量化了完整活细胞中的染色体质量,并仅基于染色体干重区分了两个人类结肠癌细胞株 HT-29 和 T84 细胞;波兰华沙科技大学的 Kujawińska 课题组^[34]通过测量折射率和细胞干重的三维分布,研究了多聚甲醛(PFA)固定过程对大鼠肾上皮细胞系 NRK-52E 的细胞核、核仁、核浆以及细胞质的影响;韩国科学技术院的 Park 课题组^[35]通过不同时期血液中红细胞折射率分布的测量和相关参数的定量计算,研究了红细胞形态和生理学特性在血液储存过程中的改变;上海大学的于瀛洁课题组^[36]研究了少投影角度数字全息层析重建过程中迭代重建算法中的加权因子和松弛因子对重建图像质量的影响,并提出了优化方案;南京理工大学的左超课题组^[37]提出了一种基于非干涉相位反演和可编程照明的光学衍射层析成像技术,并采用该技术定量测量了肺癌细胞和宫颈癌细胞的三维折射率分布。细胞的空泡化是癌细胞类凋亡过程中的重要表现形式,具有重要的研究价值。空泡的折射率与癌细胞内部其他物质及结构的折射率存在显著差异,因此,数字全息显微层析方法适合用于癌细胞内部空泡的三维定量成像。

本团队采用数字全息显微成像技术获取了含有不同尺寸和数量空泡的膀胱癌细胞的多角度相位图像,结合层析技术,重构了含有空泡的膀胱癌细胞内部的三维折射率分布。结果表明,这一成像方式可以清晰地区分膀胱癌细胞内部的空泡与细胞内部其他结构的折射率差异,并可以获取膀胱癌细胞内部空泡的三维空间位置和形状信息。这说明数字全息显微层析成像方法在癌细胞内空泡的三维重构过程中具有无标记非接触、三维定量、原位测量等优势,具有广阔的应用前景。

2 原理和方法

2.1 数字全息显微技术原理

数字全息成像技术的实现包括全息记录和衍射再现两个步骤。使物光与参考光发生干涉,将得到的干涉图样记录下来,即为全息图。在干涉之前,利用显微物镜将物光进行预放大,将物镜输出的放大像作为新的物光,即可实现数字全息显微观测。设参考光为 $R(x, y)$, 物光为 $O(x, y)$, 则全息图的强度分布 $I(x, y)$ 可以表示为

$$I(x, y) = |R(x, y) + O(x, y)|^2 = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + R(x, y)O^*(x, y), \quad (1)$$

式中: $R^*(x, y)$ 为参考光的共轭; $O^*(x, y)$ 为物光的

共轭。式(1)中第二个等号之后的前两项为直流项,不携带相位信息,后两项分别包含原始物光场的复振幅以及与其共轭的复振幅,携带物体的相位信息。全息记录方法主要包括同轴全息和离轴全息两种。在同轴全息记录的频谱中,零级项和±1级项重叠,会有一个虚假的物体叠加到重建的物光场中,因此需要通过深度学习等方法去除这一孪生像^[38]。为了便于在频谱上分离直流项和干涉项,通常使用离轴全息的记录方法,即通过使参考光和物光之间存在一定的夹角来实现三项的分离。设离轴角为 θ ,对全息图进行傅里叶变换,可以得到全息图的频谱 $I_f(k_x, k_y)$ 为

$$I_f(k_x, k_y) = \mathcal{F}\{I(x, y)\} = \mathcal{F}\{|O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + |R(x, y)| \cdot O_f(k_x + k \sin \theta, k_y + k \cos \theta) + |R(x, y)| \cdot O_f^*(-k_x + k \sin \theta, -k_y + k \cos \theta)\}, \quad (2)$$

式中: k 为入射光的波数。由式(2)可以看出,由于离轴角的存在,两个干涉项的频谱向相反的方向移动,从而可以实现直流项以及两个干涉项的分离。

数字全息再现是使用计算机数值模拟参考光的衍射过程。用相同的参考光 $R(x, y)$ 照射全息图,通过光学衍射过程使物光场复现,得到的衍射场为 $T(x, y)$,即

$$T(x, y) = R(x, y)I(x, y) = R(x, y)[|O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2] + O(x, y)|R(x, y)|^2 + R(x, y)R(x, y)O^*(x, y) = T_0 + T_{+1} + T_{-1}. \quad (3)$$

其中,仅有-1级衍射项可以成实像并被光电探测器件所记录。因此,在衍射计算之前,需要先通过频域滤波器去除零级项和+1级衍射项,仅保留-1级衍射项对应的频谱。

当全息图记录位置与成像面位置重合时,可以直接采用像面全息重建方法获得物体的清晰像^[39]。但是,全息图记录的位置和成像面通常不重合,需要通过一定的算法将其传播到再现面,使光波聚焦,从而获得清晰像。常用的方法是角谱再现^[40]算法,该方法主要在频域讨论光的衍射传播过程。根据角谱法,成像面的光波复振幅 $U(x_i, y_i)$ 可以表示为

$$U(x_i, y_i) =$$

$$\mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}[U(x, y)] \cdot \exp(i d \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2})\}, \quad (4)$$

式中: $U(x, y)$ 表示全息面的复振幅分布。通过再现光场 $U(x_i, y_i)$ 的复振幅分布即可解算出对应的振幅分布和相位分布:

$$A(x, y) = |U(x_i, y_i)|, \quad (5)$$

$$\Phi(x, y) = \arctan \frac{\text{Im}\{U(x_i, y_i)\}}{\text{Re}\{U(x_i, y_i)\}}. \quad (6)$$

2.2 衍射层析计算原理

光学衍射层析算法^[41]的基础是傅里叶衍射定理。首先利用一阶 Born 近似描述光透过被测物体时的散射过程。一阶 Born 近似是一个弱散射近似模型,描述了透射光场 $U(\mathbf{r})$ 和物体散射势 $f(\mathbf{r})$ 之间的关系。透射光场可以表示为入射光场 $U_0(\mathbf{r})$ 与光场中受到散射影响部分 $U_s(\mathbf{r})$ 之和,即

$$U(\mathbf{r}) = U_s(\mathbf{r}) + U_0(\mathbf{r}). \quad (7)$$

由齐次波动方程和格林公式可以推导得到

$$U_s(\mathbf{r}) \stackrel{\text{Born}}{\approx} U_B(\mathbf{r}) = \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') U_0(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'. \quad (8)$$

式(8)即为 Born 近似下透射光场散射部分 $U_s(\mathbf{r})$ 与物体散射势之间的关系。傅里叶衍射定理则是在 Born 近似下从频域角度分析 $U_s(\mathbf{r})$ 与 $f(\mathbf{r})$ 之间的关系。

对式(8)中的格林函数进行平面波分解,并在此基础上作傅里叶变换,可以得到

$$\tilde{U}_s(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} U_s(x) \exp(-i\omega x) dx = \frac{i}{2\sqrt{k_m^2 - \omega^2}} \exp(i\sqrt{k_m^2 - \omega^2} l_d) \tilde{f}(\omega, \sqrt{k_m^2 - \omega^2} - k_m), \quad |\omega| \leq k_m, \quad (9)$$

式中: ω 为散射光场的空间频率; l_d 为光电探测器与被测物体之间的距离; k_m 为入射光的波数。设 $t = \sqrt{k_m^2 - \omega^2} - k_m$,则有 $\omega^2 + (t + k_m)^2 = k_m^2$ 。这说明,当 ω 在 $-k_m$ 到 k_m 之间变化时, $\tilde{U}_s(\omega)$ 对应于频域中的一条半圆弧,其圆心位于 $(0, -k_m)$,半径为 k_m ,圆心与原点的连线平行于入射光传播方向。此即为傅里叶衍射定理。

将傅里叶衍射定理推广至三维,则表示透射光场的二维频谱对应于散射势三维频谱中的一个经过原点的半球冠,球心与原点的连线平行于入射光传播方向。

基于此,可以得到衍射层析的基本原理,即:通过改变入射光的传播方向来改变物体散射势三维频谱中球冠的填充位置,当频谱范围被完全填充后,再通过傅里叶逆变换得到被测物体的三维散射势分布。

得到三维散射势分布 $f(\mathbf{r})$ 后,结合已知的周围介质的折射率 n_m 以及入射光波数 k_m ,由公式 $n(\mathbf{r}) = n_m \sqrt{f(\mathbf{r})/k_m^2 + 1}$ 即可得到物体的三维折射率分布 $n(\mathbf{r})$ 。

2.3 数字全息显微层析光路系统

实验所采用的光路结构是基于 Mach-Zehnder 干涉仪的离轴式全息光路,光路结构如图 1 所示。激光器出射的光束通过偏振分束器分为参考光和物光,分别对两束光进行准直扩束,产生平面波。参考光在准直扩束之前需再次经过衰减器和半波片,其中:衰减器用来补偿被测样品对物光的衰减,使物光与参考光的强度基本相同;半波片用来调整参考光的偏振态,使之与物光一致的偏振分量达到最大,以保证获得最佳的

干涉条纹对比度。在物光透过物体之前,利用旋转电机带动两个反射镜旋转来改变入射光的方向,使其以不同的角度照射到样本平面,获得被测样本在不同入射光角度下的投影图像。在本实验中,保持反射镜 M3 与显微镜中心轴线方向的夹角为 27° 不变,旋转电

机旋转 360° 。旋转过程中,每 2° 记录一张图像,共采集 180 个不同角度下的全息图。光透过物体之后,经过由 60 倍显微物镜和筒镜组成的成像系统,然后在合光棱镜处与参考光会合发生干涉,最后传播到成像面被 CCD 相机记录。相机记录的干涉图样即为数字全息图。

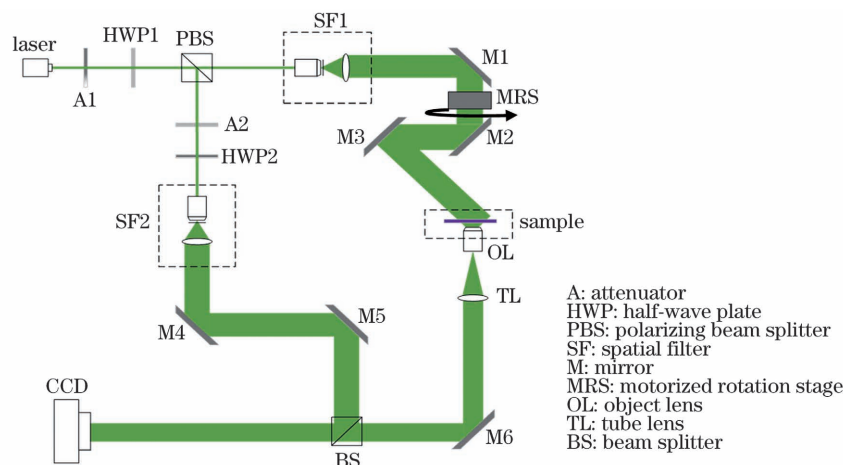


图 1 数字全息显微层析光路结构示意图

Fig. 1 Schematic of digital holographic microscopy tomography optical path

2.4 细胞培养过程

实验所采用的人尿路上皮膀胱癌细胞株 HT1376 购买于北京博泰斯生物科技有限公司。细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素的 Eagle 最低基础培养基中生长,每月进行一次支原体检测,以确保支原体培养呈阴性。将细胞以每皿 $1.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个的密度接种在 30 mm 玻璃底细胞培养皿中,在温度为 37°C 、 CO_2 体积分数为 5% ($5\% \text{CO}_2$)、湿度恒定的培养箱中培养 12 h。

2.5 细胞相位再现及三维层析重建方法

在多角度全息图重建过程中,若入射角度变化, -1 级衍射项频谱的位置也会随之变化,因此不能使用固定的滤波窗口滤波。首先判断 -1 级衍射项频谱所处的象限,然后通过对象限内寻找最亮点的位置找到 -1 级衍射项的频谱中心,再以此频谱中心为圆心生成圆形滤波窗口,实现频域自动滤波。

滤波完成后,通过角谱法在一定距离范围内进行多次再现,选取感兴趣细胞所在区域作为聚焦窗口,在聚焦窗口内计算聚焦判据,然后选取聚焦判据值最小对应的距离作为最佳再现距离,完成数字自动聚焦。聚焦判据的计算公式为

$$C = \sqrt{\frac{\text{MSE}(A)}{\text{mean}(A)}}, \quad (10)$$

式中: $\text{MSE}(A)$ 表示聚焦窗口内幅值图像上各像素点的均方差; $\text{mean}(A)$ 表示聚焦窗口内幅值图像上各像素点的平均值。得到聚焦再现相位图像后,利用去除细胞区域的背景掩模结合泽尼克多项式拟合方法补偿系统本身固有的高阶像差^[42]; 补偿完成后,通过相位解包裹算法去除相位跳变,将相位分布还原为连续值,从而得到原始相位信息;最后对得到的相位图像进行

相位偏移运算,使背景平均相位值接近零。至此,可以得到被测细胞在各个角度下的复光场数据。

采用光学衍射层析算法对不同光照角度下得到的复光场进行三维重建,采用傅里叶变换将不同角度下的二维透射光场变换到三维频域空间内进行频谱填充,最后对填充后的三维空间频谱进行傅里叶逆变换,即可得到被测物体的三维散射势分布。由于在角度扫描式光路系统中最大光照角度受物镜数值孔径的限制,入射光只能在一个锥形范围内透过显微物镜到达光电探测器件,这会导致三维傅里叶空间信息缺失,进而导致重构层析图像沿轴向发生畸变。鉴于此,本文采用非负约束算法^[43],即基于细胞的折射率不小于培养基折射率这一先验知识,对重构结果进行迭代修正计算,以填补缺失的信息,最终得到被测细胞的三维折射率分布。此外,在对细胞进行三维重构之前,用实验光路采集了直径为 $20 \mu\text{m}$ 、折射率为 1.4607 的 SiO_2 微球的多角度全息图,并用同样的方法对其进行三维层析重构,以标定实验系统的分辨率,并验证重构结果的准确性。

3 实验结果

3.1 SiO_2 微球相位再现及三维层析重构结果

将各个角度下 SiO_2 微球的全息图进行相位再现及相位解包裹处理,得到微球在各个角度下的相位图,如图 2 所示。基于再现得到的各个角度下的二维复光场数据,通过衍射层析重建算法计算微球内部的三维折射率分布,计算结果如图 3 所示。

已知微球的直径 d 为 $20 \mu\text{m}$,放大倍数 m 为 60,像元尺寸 p 为 $5.86 \mu\text{m}$,由公式 $r_{\text{re}} = dm / (2p)$ 可以计算得到重构结果中微球的半径为 102 pixel。

以微球中心为球心,以 102 pixel 为半径绘制球形

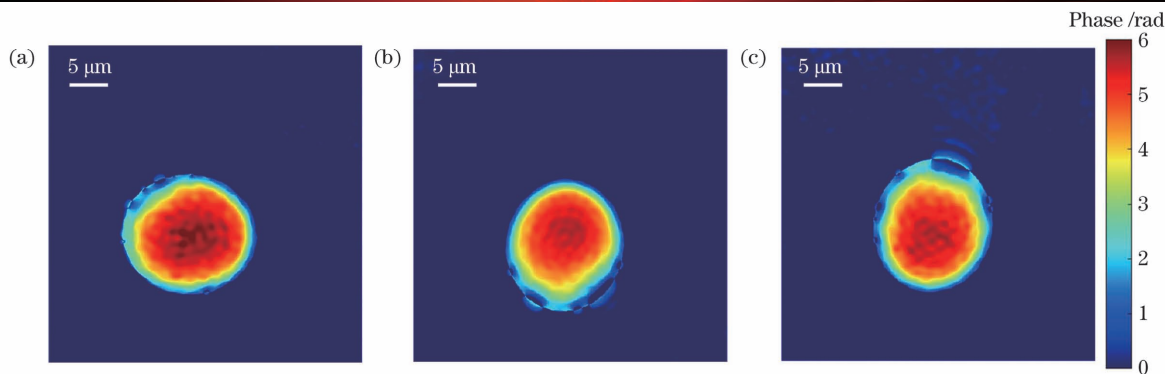


图 2 SiO₂ 微球在不同角度下的相位图。(a) 90°; (b) 180°; (c) 0°

Fig. 2 Phase images of SiO₂ microsphere at different angles. (a) 90°; (b) 180°; (c) 0°

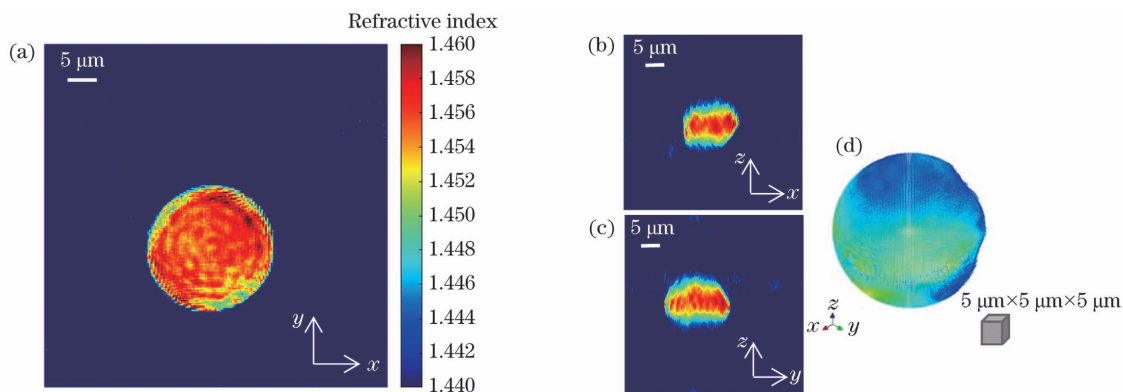


图 3 SiO₂ 微球的三维层析重构结果。(a) x - y 面上的中心切片图; (b) x - z 面上的中心切片图; (c) y - z 面上的中心切片图; (d) 微球的三维层析重构结果

Fig. 3 Three-dimensional tomographic reconstruction results of SiO₂ microsphere. (a) Central slice in x - y plane; (b) central slice in x - z plane; (c) central slice in y - z plane; (d) three-dimensional tomographic reconstruction result of SiO₂ microsphere

掩模。计算可知,掩模内部所有像素点的平均折射率为 1.4510,与理论值 1.4607 的误差为 0.6%。

根据式(11)和式(12)可以计算得到该成像结果的横向分辨率 R_1 和轴向分辨率 R_a 分别为 $0.17 \mu\text{m}$ 和 $0.67 \mu\text{m}$ 。

$$R_a = \frac{\lambda}{2(1 - \sqrt{1 - NA^2})}, \quad (12)$$

式中: NA 为显微镜的数值孔径, $NA = 0.8$; λ 为激光器出射激光的波长, $\lambda = 532 \text{ nm}$ 。

3.2 细胞全息图记录及再现结果

首先,选取合适的滤波窗口对各角度下的全息图进行频域滤波,保留-1级衍射项对应的频谱,如图4所示。

$$R_1 = \frac{\lambda}{4NA}, \quad (11)$$

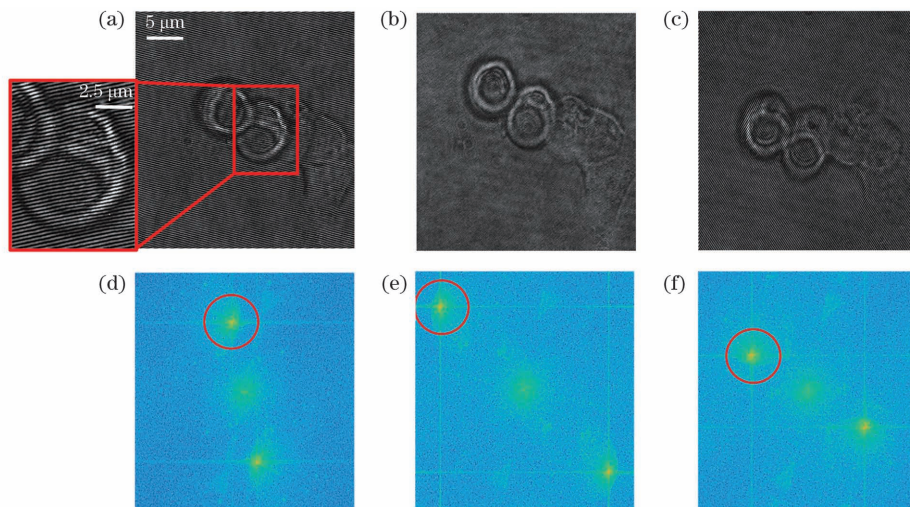


图 4 同一位置不同角度下的全息图及对应的频谱,图中圆圈内区域为所选择的滤波窗口。(a)(d) 90°; (b)(e) 180°; (c)(f) 0°

Fig. 4 Holograms at different angles and at the same position and their corresponding spectra, where the area inside the circle is selected filtering window. (a)(d) 90°; (b)(e) 180°; (c)(f) 0°

从图4可以看出,在不同角度下的全息图所对应的频谱中, ± 1 级衍射项的位置各不相同,其位置与入射光的角度有关。

滤波之后,选取合适的聚焦距离对图像进行数字重聚焦,结果如图5所示。

由图5可以看出,当再现距离为 -1.51 cm时,再现效果最好,幅值图中的细胞边缘最清晰。最后,对再

现后的细胞的相位像进行解包裹,将其还原为连续分布的真实的相位值,如图6所示。

在再现后的幅值图和相位图中将感兴趣的单个细胞分割出来作为后续三维层析重建的原始复光场数据。这里选取4个内部有空泡的膀胱癌细胞,展示其在旋转电机旋转 0° 时的相位再现结果,如图7所示。

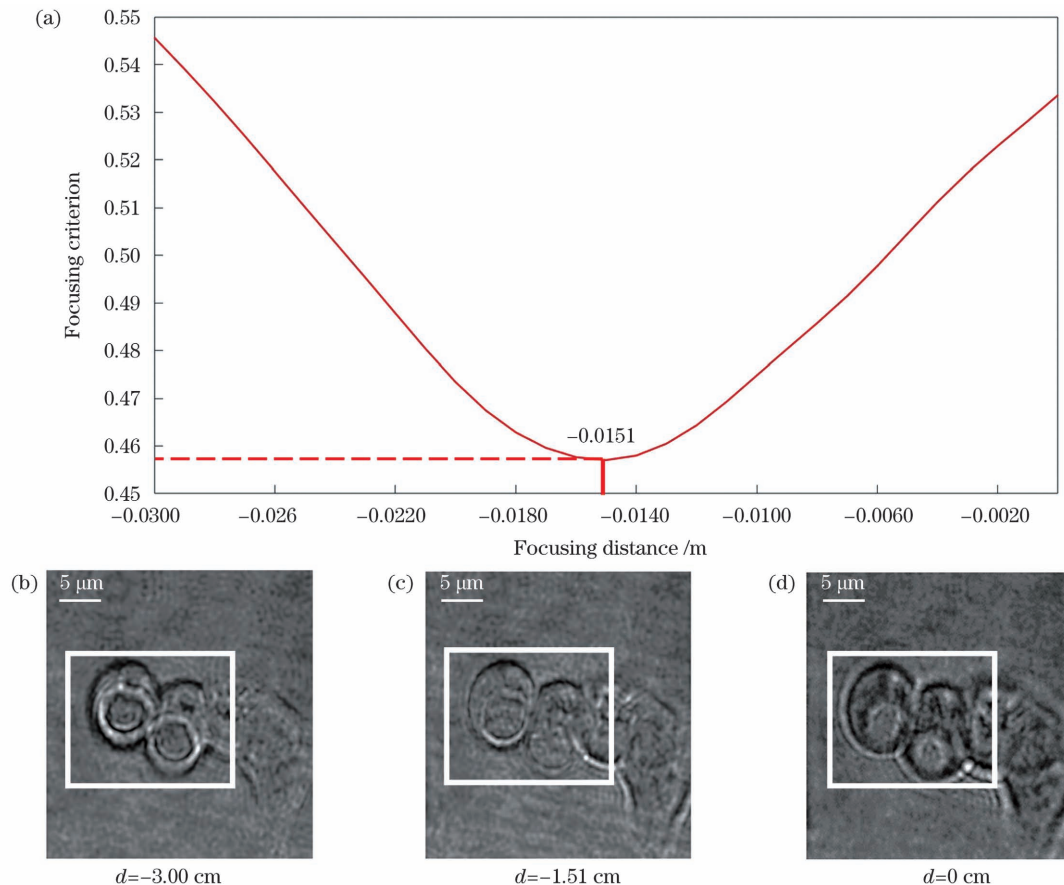


图5 聚焦判据随聚焦距离的变化以及不同聚焦距离对应的幅值图,图中方框表示所选择的聚焦窗口。(a)聚焦判据随聚焦距离的变化,曲线最低点对应的聚焦距离为最佳再现距离;(b)~(d)再现幅值图,聚焦距离分别为 -3.00 、 -1.51 、 0 cm

Fig. 5 Variation of focusing criterion with focusing distance and corresponding amplitude images of different focusing distances, where rectangle represents the selected focus window. (a) Variation of focusing criterion with focusing distance, focusing distance corresponding to the lowest point of the curve is the best reconstruction distance; (b)~(d) reconstruction amplitude images, focusing distance is -3.00 , -1.51 , and 0 cm, respectively

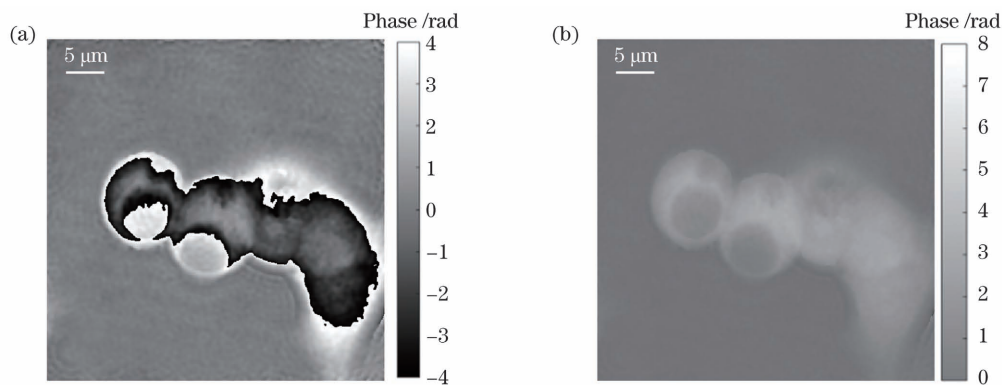


图6 解包裹前后的细胞相位像。(a)解包裹前的细胞相位像;(b)解包裹后的细胞相位像

Fig. 6 Cell phase images before and after phase unwrapping. (a) Cell phase image before phase unwrapping; (b) cell phase image after unwrapping

从图 7 可以看出,每个癌细胞在形态、大小和相位上均存在显著差异,而且其内部空泡的大小和数量也不相同。分析可知,空泡部分的相位值明显较细胞其

他部分低。这说明数字全息显微成像方法可以通过相位分布定量检测出这种差别,可用于癌细胞内部空泡的形态学观察。

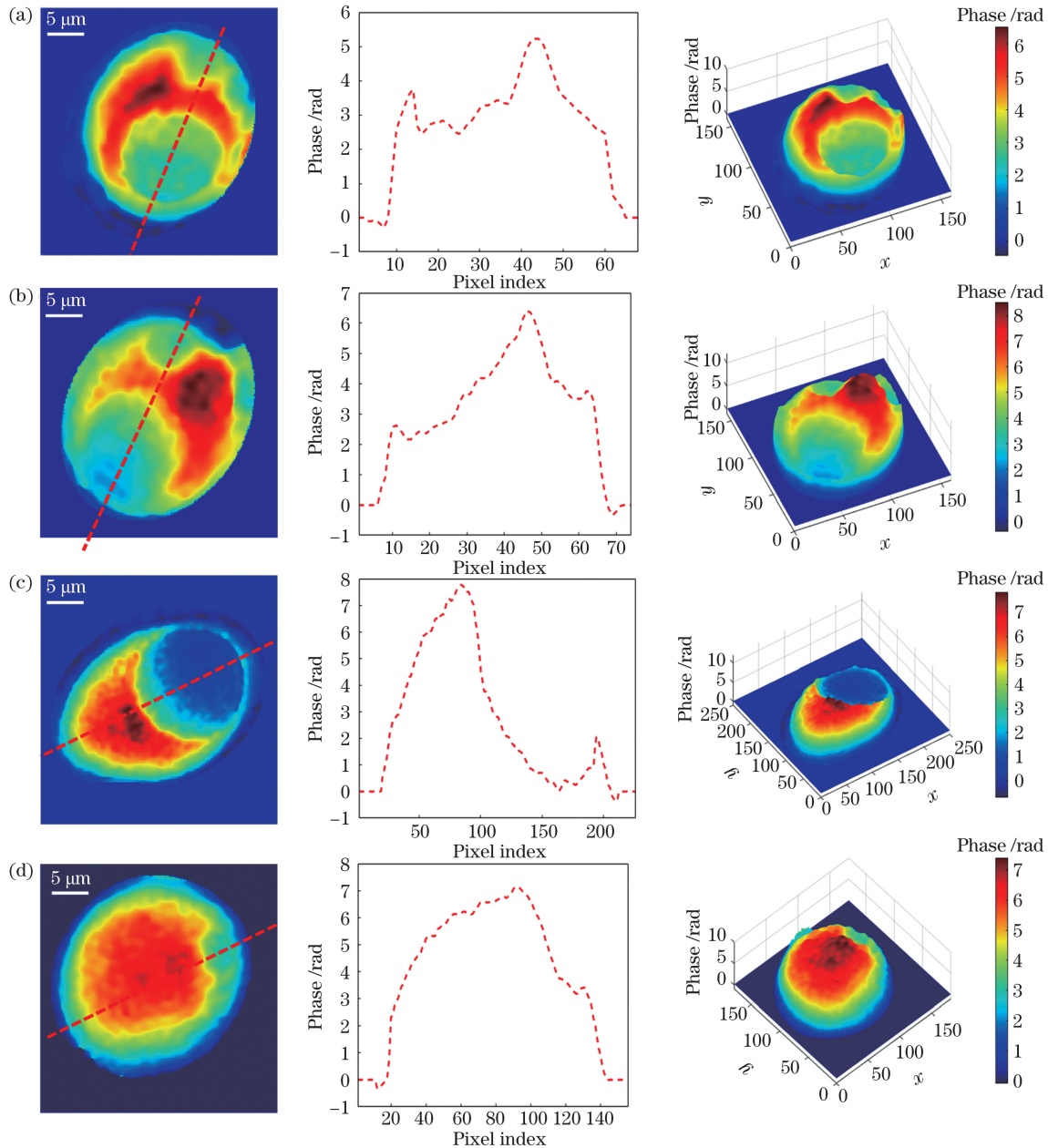


图 7 含有空泡的膀胱癌细胞的相位图、相位图虚线部分的相位分布以及相位图的三维显示结果。(a)细胞 1;(b)细胞 2;(c)细胞 3;(d)细胞 4

Fig. 7 Phase images of bladder cancer cells with vacuoles, phase distribution along the dotted line of phase images, and three-dimensional display results of phase images. (a) Cell 1; (b) cell 2; (c) cell 3; (d) cell 4

3.3 带有空泡的膀胱癌细胞的三维层析重建结果

利用 3.2 节提到的细胞在各个角度下的二维复光场数据,通过衍射层析重建算法计算各个细胞内部的三维折射率分布。图 7 中 4 个癌细胞对应的三维层析重建结果如图 8 所示。

由图 8 可以看出空泡在各个细胞内的三维空间位置和折射率分布。空泡的大小、形状、数量及其在细胞

内的体积占比均存在差异。三维层析重构结果显示:空泡内部的折射率比较均匀;空泡由单一膜包围,其折射率显著低于细胞内其他物质成分的折射率,且与细胞所处环境(即培养基)的折射率较为接近。

计算图 8 中 4 个癌细胞内空泡的体积、表面积、表面积体积比以及空泡体积与细胞体积比等三维形态学参数,计算结果如表 1 所示。

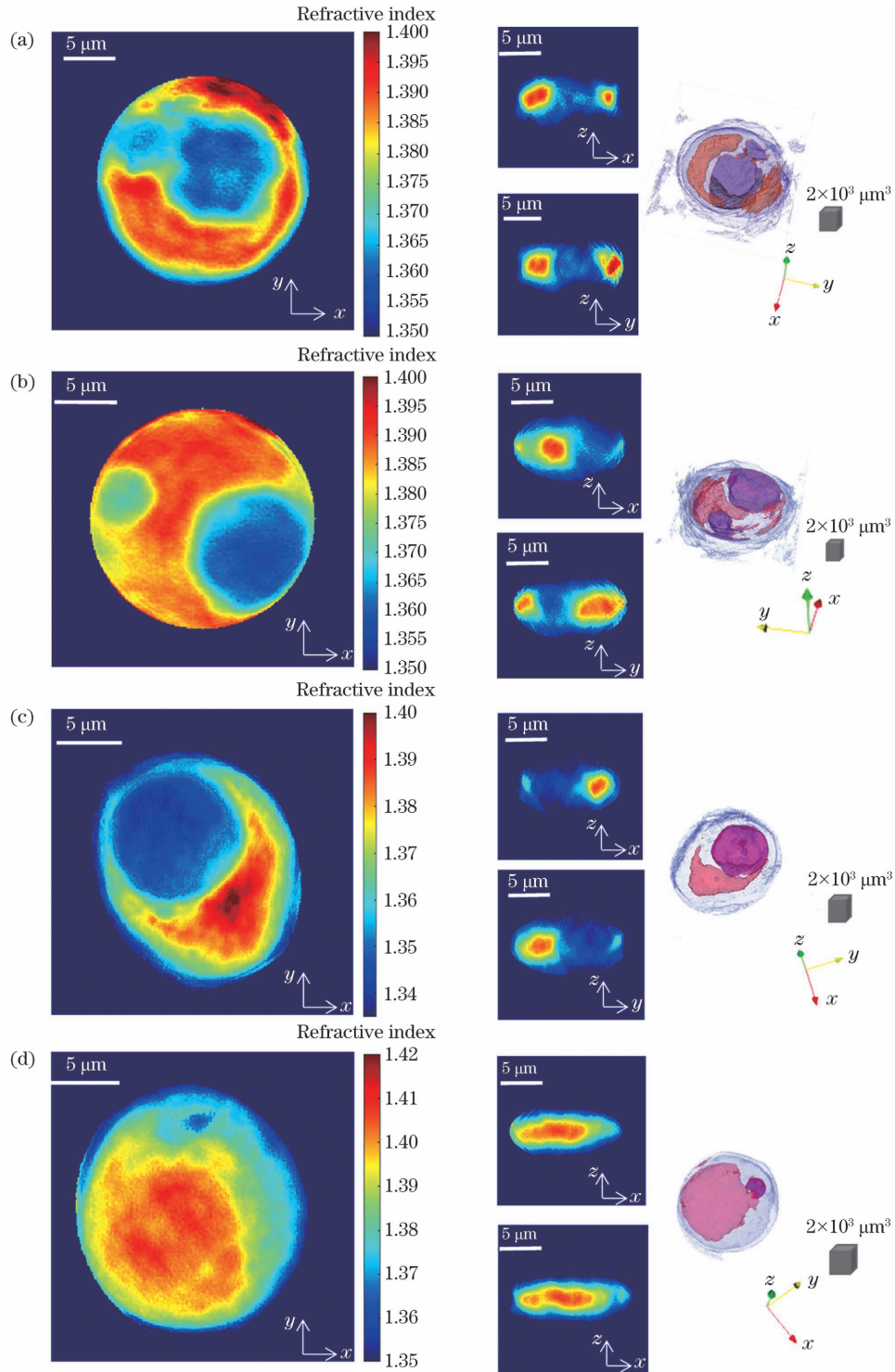


图 8 含有空泡的膀胱癌细胞的三维层析重构结果。(a)细胞 1;(b)细胞 2;(c)细胞 3;(d)细胞 4

Fig. 8 Three-dimensional tomographic reconstruction results of bladder cancer cells with vacuoles. (a) Cell 1; (b) cell 2; (c) cell 3; (d) cell 4

表 1 各个细胞的三维形态学参数

Table 1 Three-dimensional morphological parameters of each cell

Cell	Volume of vacuole / ($10^2 \mu\text{m}^3$)	Surface area of vacuole / ($10^2 \mu\text{m}^2$)	Ratio of surface area to volume / μm^{-1}	Ratio of vacuole volume to cell volume
Cell 1	2.33	2.31	0.991	0.113
Cell 2	2.80	2.27	0.811	0.267
Cell 3	2.03	1.36	0.670	0.060
Cell 4	0.15	0.32	2.133	0.009

4 讨论与展望

癌细胞的凋亡逃避机制是其能够快速增殖和分裂的重要原因之一^[44],研究癌细胞的死亡过程有助于更好地研究癌症的发病机制和治疗方法。近年来大量与生物化学和遗传学研究相关的研究表明,根据细胞死亡时的个体生化特征和形态,可将细胞的程序性死亡分为12个不同的亚型,细胞的类凋亡是其中重要的一类^[45]。与细胞凋亡不同,细胞类凋亡过程没有核固缩和细胞膜破裂现象,而是表现为细胞膜内陷形成嗜酸性凋亡小体,内质网和高尔基体膨胀,线粒体结构破裂,在细胞内形成大小不等的空泡,最后被巨噬细胞吞噬和降解^[46]。细胞的空泡化是细胞类凋亡的主要特征,常被用来作为形态上识别细胞类凋亡的主要依据,但空泡化机制还有待研究。其可能的原因是:蛋白酶受到抑制以及线粒体中的钙离子过量导致内质网和线粒体扩张,从而导致细胞质膜含量减少,进而导致膜张力增加以及肌动蛋白重组所需的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)耗竭,最终使细胞产生大量空泡结构并走向死亡^[47]。

研究发现,自然界中天然存在的一些小分子化合物可以诱导癌细胞类凋亡,因而可以作为增强抗癌活性的试剂,但它们的作用机制各不相同。例如:姜黄素通过提高细胞内的活性氧水平来改变细胞的氧化还原平衡,从而导致氧化应激反应发生^[48];苯磷酰胺通过下调细胞周期调控因子使细胞生长周期受到阻滞^[49];橘皮苷通过激活上游活性氧和促进线粒体内超氧化物的产生使线粒体内的钙离子水平显著增加^[50]。更好地理解类凋亡的过程将为利用小分子化合物治疗癌症这一新策略的研究奠定基础,而对癌细胞内部的空泡进行准确成像和形态学观察是研究类凋亡过程以及各类化合物及抗癌药物作用机制的基础和前提。

数字全息显微成像技术具有非接触、非标记、不需要对样品染色等优点,能够实现活体细胞在真实生长环境下的无损伤、非标记三维定量成像。已有的相关研究表明:数字全息显微技术可以用于检测癌细胞在凋亡过程中的形态变化;基于数字全息显微技术获得的细胞相位分布可以准确识别凋亡的癌细胞,还可以计算癌细胞凋亡过程中细胞数量、细胞体积和细胞面积等参数的变化^[51-52]。

基于数字全息的生物细胞层析成像技术可以在数字全息的基础上,通过多角度透射光场的记录并结合层析重构算法,获得物体内部的三维折射率分布信息,所测得的三维折射率分布可以直接反映细胞的内部结构信息,还可以进一步计算细胞干重、蛋白质浓度等生化参数,对于生命科学研究、病理学研究等相关研究具有重要意义。因此,将数字全息显微层析成像技术用于对癌细胞内部空泡的三维定量成像研究,可以定量计算活细胞内空泡的三维体积、分布位置以及其他相

关的形态学参数。进一步,将其与生物医学相关研究结合,可以观测药物诱导下癌细胞内部空泡三维形状和体积的变化,探究某些蛋白的表达与空泡形态学特征的相关性,从而为更全面、深刻地认识癌细胞类凋亡过程,寻找癌症治疗新靶点提供新思路。

5 结 论

本文主要介绍了数字全息显微层析成像技术在膀胱癌细胞内部空泡成像方面的应用,结果表明,数字全息显微层析成像方法可以准确重建出癌细胞内部空泡的三维形状及其所处的三维空间位置。上述研究对于研究癌细胞类凋亡过程以及药物诱导癌细胞凋亡的相关机制和癌症治疗策略具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Shams-White M M, Brockton N T, Mitrou P, et al. Operationalizing the 2018 world cancer research fund/American institute for cancer research (WCRF/AICR) cancer prevention recommendations: a standardized scoring system[J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1572.
- [3] Deng X Y, Xiong F, Li X Y, et al. Application of atomic force microscopy in cancer research [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2018, 16(1): 102.
- [4] Sperandio S, de Belle I, Bredesen D E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(26): 14376-14381.
- [5] Kitambi S S, Toledo E M, Usoskin D, et al. RETRACTED: vulnerability of glioblastoma cells to catastrophic vacuolization and death induced by a small molecule[J]. Cell, 2014, 157(2): 313-328.
- [6] Kessel D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: death and survival pathways associated with photodynamic therapy [J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(1): 119-125.
- [7] Seo M J, Lee D M, Kim I Y, et al. Gambogic acid triggers vacuolization-associated cell death in cancer cells via disruption of thiol proteostasis[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10: 187.
- [8] Chen Y, Yang L S, Feng C, et al. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 337(1): 52-60.
- [9] Brüning A, Burger P, Vogel M, et al. Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis [J]. Cancer Biology & Therapy, 2009, 8(3): 226-232.
- [10] Ghosh K, De S, Das S, et al. Withaferin A induces ROS-mediated paraptosis in human breast cancer cell-lines MCF-7 and MDA-MB-231[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168488.
- [11] Monel B, Compton A A, Briel T, et al. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells [J]. The EMBO Journal, 2017, 36(12): 1653-1668.
- [12] Tan W C C, Nerurkar S N, Cai H Y, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy [J]. Cancer Communications, 2020, 40(4): 135-153.
- [13] Gabor D. A new microscopic principle [J]. Nature, 1948, 161(4098): 777-778.

- [14] Goodman J W, Lawrence R W. Digital image formation from electronically detected holograms[J]. *Applied physics letters*, 1967, 11(3): 77-79.
- [15] Valin J L, Gonçalves E, Palacios F, et al. Methodology for analysis of displacement using digital holography[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2005, 43(1): 99-111.
- [16] Cao L C, Liu J Q, Li J H, et al. Orthogonal reference pattern multiplexing for collinear holographic data storage[J]. *Applied Optics*, 2014, 53(1): 1-8.
- [17] 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.
- [18] Amineh R K, Ravan M, Khalatpour A, et al. Three-dimensional near-field microwave holography using reflected and transmitted signals[J]. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 2011, 59(12): 4777-4789.
- [19] Locatelli M, Pugliese E, Paturzo M, et al. Seeing through smoke and flames: a challenge for imaging capabilities, met thanks to digital holography at far infrared[J]. *Proceedings of SPIE*, 2013, 8788: 87880K.
- [20] Cuche E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms [J]. *Applied Optics*, 1999, 38(34): 6994-7001.
- [21] Marquet P, Rappaz B, Magistretti P J, et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(5): 468-470.
- [22] Rappaz B, Marquet P, Cuche E, et al. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(23): 9361-9373.
- [23] 孟章, 丁浩, 聂守平, 等. 深度学习在数字全息显微成像中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811006.
- Meng Z, Ding H, Nie S P, et al. Application of deep learning in digital holographic microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811006.
- [24] Langehanenberg P, Ivanova L, Bernhardt I, et al. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(1): 014018.
- [25] Jeong K, Turek J J, Nolte D D. Volumetric motility-contrast imaging of tissue response to cytoskeletal anti-cancer drugs[J]. *Optics Express*, 2007, 15(21): 14057-14064.
- [26] 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.
- [27] Kak A C, Slaney M. Principles of computerized tomographic imaging[M]. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001.
- [28] Wolf E. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data [J]. *Optics Communications*, 1969, 1(4): 153-156.
- [29] Cotte Y, Toy F, Jourdain P, et al. Marker-free phase nanoscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(2): 113-117.
- [30] Ayoub A B, Pham T A, Lim J, et al. A method for assessing the fidelity of optical diffraction tomography reconstruction methods using structured illumination [J]. *Optics Communications*, 2020, 454: 124486.
- [31] Isikman S O, Bishara W, Mavandadi S, et al. Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(18): 7296-7301.
- [32] Merola F, Memmolo P, Miccio L, et al. Tomographic flow cytometry by digital holography [J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(4): e16241.
- [33] Sung Y, Choi W, Lue N, et al. Stain-free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49502.
- [34] Baczewska M, Eder K, Ketelhut S, et al. Holotomographic investigation of an influence of PFA cell fixation process on refractive index of cellular organelles in epithelial cells [J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11249: 112491L.
- [35] Park H J, Lee S Y, Ji M, et al. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34257.
- [36] 周文静, 胡文涛, 郭路, 等. 少量投影数字全息层析重建实验研究[J]. *物理学报*, 2010, 59(12): 8499-8511.
- Zhou W J, Hu W T, Guo L, et al. Experimental study of digital holographic tomography by a few projections[J]. *Acta Physica Sinica*, 2010, 59(12): 8499-8511.
- [37] Li J J, Chen Q, Zhang J L, et al. Optical diffraction tomography microscopy with transport of intensity equation using a light-emitting diode array [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2017, 95: 26-34.
- [38] 王飞, 王昊, 卞耀明, 等. 深度学习在计算成像中的应用[J]. *光学学报*, 2020, 40(1): 0111002.
- Wang F, Wang H, Bian Y M, et al. Applications of deep learning in computational imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(1): 0111002.
- [39] 李俊昌, 桂进斌, 宋庆和, 等. 像面数字全息物体像的完整探测及重建[J]. *光学学报*, 2022, 42(13): 1309001.
- Li J C, Gui J B, Song Q H, et al. Complete detection and reconstruction of object image in image plane digital holography [J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(13): 1309001.
- [40] Mann C J, Kim M K. Quantitative phase-contrast microscopy by angular spectrum digital holography [J]. *Proceedings of SPIE*, 2006, 6090: 50-57.
- [41] Sung Y, Choi W, Fang-Yen C, et al. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging [J]. *Optics Express*, 2009, 17(1): 266-277.
- [42] 董昭, 王文健, 王华英, 等. 改进的基于相位梯度最小化的相位补偿方法[J]. *中国激光*, 2021, 48(24): 2409001.
- Dong Z, Wang W J, Wang H Y, et al. Improved phase compensation method based on phase vibration minimization[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(24): 2409001.
- [43] Kim K, Yaqoob Z, Lee K R, et al. Diffraction optical tomography using a quantitative phase imaging unit[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(24): 6935-6938.
- [44] Pluta P, Smolewski P, Pluta A, et al. Significance of Bax expression in breast cancer patients [J]. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 2011, 83(10): 549-553.
- [45] Ke B W, Tian M, Li J J, et al. Targeting programmed cell death using small-molecule compounds to improve potential cancer therapy[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2016, 36(6): 983-1035.
- [46] Lee D, Kim I Y, Saha S, et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 162: 120-133.
- [47] Wang Y J, Wen X, Zhang N, et al. Small-molecule compounds target paraptosis to improve cancer therapy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109203.
- [48] Hasima N, Aggarwal B B. Targeting proteasomal pathways by dietary curcumin for cancer prevention and treatment [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2014, 21(14): 1583-1594.
- [49] Volvert M L, Sezen S, Piette M, et al. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives[J]. *BMC Pharmacology*, 2008, 8: 10.
- [50] Yumnam S, Hong G E, Raha S, et al. Mitochondrial dysfunction and Ca^{2+} overload contributes to hesperidin induced

- paraptosis in hepatoblastoma cells, HepG2 [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231(6): 1261-1268.
- [51] El-Schich Z, Mölder A L, Wingren A G. Quantitative phase imaging for label-free analysis of cancer cells: focus on digital holographic microscopy [J]. *Applied Sciences*, 2018, 8(7): 1027.
- [52] El-Schich Z, Mölder A, Tassidis H, et al. Induction of morphological changes in death-induced cancer cells monitored by holographic microscopy [J]. *Journal of Structural Biology*, 2015, 189(3): 207-212.

Cancer Cell Vacuolization Imaging Based on Digital Holographic Microscopy Tomography

Liu Yakun¹, Xiao Wen¹, Che Leiping¹, Li Yinjia³, Xiao Xi², Wang Hao², Pan Feng^{1*}

¹Key Laboratory of Precision Opto-Mechatronics Technology, School of Instrumentation & Optoelectronic Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

²Department of Radiation Oncology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

³Medical Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Abstract

Objective Cancer is a disease caused by the uncontrolled growth and division of malignant cancer cells. Since the 21st century, the incidence and mortality of cancer have been increasing rapidly worldwide, making it a medical problem that affects countries worldwide. The pathological mechanism of cancer and the study of various therapeutics based on inducing cancer cell death both greatly benefit from research on the morphology and function of cancer cells at the single-cell level, particularly research on the process of cancer cell death. Digital holographic microscopy, a quantitative phase imaging technique, offers a nondestructive, unlabeled, and noncontact quantitative measurement tool for biological research. It can also provide nondestructive quantitative imaging of living cells. In this paper, digital holographic tomography was used in the three-dimensional quantitative detection of bladder cancer cell vacuolation. This work can broaden the field of application for digital holographic tomography in the biomedical industry, offer new perspectives on how to study the morphological changes that occur during cancer cell apoptosis, and investigate potential new cancer treatment approaches.

Methods This study focuses on the vacuolar structure of cancer cells existing in the process of paraptosis. First, the hologram of bladder cancer cells with vacuoles inside was obtained using digital holographic microscopy. Then, the amplitude and phase of cells were obtained by filtering, digital focusing, angular spectrum propagation, and phase unwrapping. Their three-dimensional morphology and spatial locations were reconstructed using the diffraction tomography reconstruction algorithm combined with nonnegative constraints. Finally, morphological parameters such as the surface and volume of the vacuoles were calculated according to the number of pixels in the image.

Results and Discussions Digital holographic tomography was used in this study to produce three-dimensional reconstruction results of four bladder cancer cells with vacuoles (Figure 8). Four morphological parameters, including the volume, surface, surface to volume, and the ratio of vacuoles volume to cell volume, were calculated (Table 1). Digital holographic tomography, as a technique for three-dimensional quantitative imaging, was used to examine cancer cells with vacuoles. It can quantitatively determine the volume, position, and other morphological parameters of the vacuoles. By combining with the biomedical research, it can be used to observe the changes in three-dimensional shape and volume of tumor cells' internal vacuoles induced by drugs, to explore the correlation between the expression of some proteins and the morphological characteristics of vacuoles, to provide a more comprehensive and profound understanding of the process of paraptosis of cancer cells and to find new methods for cancer treatment.

Conclusions The application of digital holographic tomography to bladder cancer cell vacuolation imaging is described in this research. The results have shown that digital holographic tomography can accurately reconstruct the three-dimensional shape and space position of the vacuolation in bladder cancer cells. The above research progress is of great significance for studying the paraptosis process of cancer cells as well as the related mechanisms and treatment strategies of drug-induced paraptosis of cancer cells.

Key words medical optics; holography; microscopy imaging; tomography; cancer cell vacuolization