

生物折射率三维无标记定量成像研究进展

杨泽文¹, 张璐^{1*}, 吕宁¹, 王慧君¹, 张镇西², 袁莉³¹西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 陕西 西安 710049;²西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049;³西安交通大学第一附属医院检验科, 陕西 西安 710061

摘要 折射率是生物样本最重要的光学属性,经常作为内源性“标记物”进行无标记定量成像。虽然通过测量光程差获取相位信息的传统定量相位成像方法已被广泛研究,然而其获取的相位结果是样本折射率与厚度的耦合产物,无法重建三维形态学信息。近年来,以光学投影层析方法为开端,研究人员率先开启了以三维折射率定量成像为目标的形态学特征重建方法研究。然而光学投影层析方法未考虑衍射效应,导致其精度不足。为解决该问题,基于散射反演求解的光学衍射层析技术应运而生,并在无标记生物三维成像方面展现出巨大的潜力。本文锁定生物折射率三维无标记定量成像研究,聚焦光学投影层析和光学衍射层析两种方法的发展历程,从正向测量模型、反演算法以及实现方法三方面进行综述,并对该研究未来的工作进行展望。

关键词 医用光学; 三维显微成像; 无标记成像; 折射率定量成像; 光学投影层析; 光学衍射层析; 散射反演

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202249.0507201

1 引言

细胞是生物体结构和功能的基本单位,其形态、化学组分、力学参数等与许多疾病的病理生理学相关^[1-2],一直以来都是生物医学基础研究和临床诊疗中的研究热点。对生物样本(细胞和组织)研究的中心是对其进行成像。光学显微成像技术作为人类观察微观生物世界最直接的途径,与超声成像(如 B 超)、X 射线成像(如拍胸片)、核磁共振成像(MRI)、电子显微镜成像等非光学成像技术相比,具有对生物样本损伤小、时空分辨率高以及易实现多模态复合等优点,是观测和研究生物样本的重要手段^[3]。但是,光学成像过程是一个信息获取与信息丢失并存的过程。传统的光电探测器仅能获得经时间平均的二维强度图像,不仅缺失了三维的结构信息,也丢失了除强度以外的光场参数。同时,生物细胞对可见光的吸收很少,因此其具有无色透明、对比度小的特点,难以被振幅型探测器件直接观察到^[4]。故而,

目前临床诊断和生物医学研究中通常需要使用化学试剂或荧光探针对细胞进行外源性标记。在目前的临床诊断中,对血液细胞进行检测的普遍方法是血涂片检测和基于荧光标记的流式细胞术,而组织病理学诊断的“金标准”则是对染色后的组织进行明场显微成像观察。在生物医学研究中,荧光显微技术得到了广泛应用。在该技术中,附着在特定分子结构上的荧光标记物被短波长激光激发后辐射出长波长荧光,从而可对原本透明的生物样本进行成像^[5]。进入 21 世纪以来,超分辨荧光显微技术突破了衍射极限,将成像分辨率提升至几十纳米,为亚细胞尺度的研究提供了技术手段^[6]。2014 年的诺贝尔化学奖被授予了超分辨荧光显微技术领域的杰出贡献者 Betzig、Hell 和 Moerner^[7-9]。目前的超分辨荧光显微成像方法有受激发射损耗显微成像(STED)^[8]、结构光照明显微术(SIM)^[10]、随机光学重建显微术(STORM)^[11]以及光激活定位显微术(PALM)^[7]等。

尽管标记的方式能够提高成像的对比度与特异

收稿日期: 2021-11-30; 修回日期: 2022-01-03; 录用日期: 2022-01-10

基金项目: 国家自然科学基金(61875160)

通信作者: *gingerluzhang@mail.xjtu.edu.cn

性,但标记过程中的光毒性会破坏细胞的天然状态,而光漂白则会影响对细胞的长时间观测。除此之外,很多生物细胞和组织很难甚至无法进行荧光标记,从而限制了荧光显微技术的应用范围^[12]。近年来,为了简化样本制备过程、减小荧光分子对待测物体的干扰并满足临床的成像需求,无标记光学成像成为了生物医学光学成像研究的热点^[3]。为了实现无标记光学成像,研究人员将目光投向了光与物质相互作用这一物理过程,期望利用经生物样本调制后的光场参数(如散射、偏振、频率、相位等)来获取待测物的有关信息。从光的波动性角度来看,生物样本完全可以由复折射率进行表征^[13]。将折射率作为生物样本内源性“标记物”的定量测量研究经历了一个漫长的阶段,其中的研究内容包括:a)悬浮液中细胞群的平均折射率;b)单细胞的等效折射率;c)单细胞的二维折射率成像;d)单细胞的三维折射率分布成像^[14]。在 a)中,假定悬浮液中的细胞具有相同的折射率,通过干涉法测量悬浮液相对于背景介质的折射率变化,或者通过光密度法测量悬浮液的光密度,以此得到细胞群的平均折射率^[15]。在 b)中,通常将细胞假定为一个充满蛋白质溶液的球形物体,用一个等效折射率代表一个细胞,然后将各种光学技术集成在微流控芯片上,对流过微流控芯片的单细胞进行等效折射率的测量^[16-17]。然而 a)和 b)的研究都不涉及成像过程,只用测得的一个折射率值来代表一个细胞群或一个细胞,能够提供的信息非常有限。而实际上,细胞内各处的折射率值都不尽相同,因此基于单细胞折射率的无标记二维成像与三维成像的研究引起了研究人员的兴趣。

目前的无标记二维成像方法包括激光散斑成像^[18]、偏振成像^[19-20]、受激拉曼散射成像^[21]以及定量相位成像(QPI)^[22-28]等。其中,通过测量光程差得到定量相位图像的 QPI 方法与生物样本折射率之间的联系最为紧密。近年来,QPI 已经成为一种强大的、无标记的“薄”生物样本定量成像方法^[22]。作为典型的 QPI 方法,基于干涉测量的数字全息显微技术得到了很多关注,本课题组 2018 年就曾对应用于生物细胞的数字全息技术进行了综述^[23]。然而,干涉测量装置通常需要使用激光光源,而由激光高相干性产生的散斑噪声通常会影响到成像质量,降低分辨率。为了避免激光散斑的影响,一些研究人员对低相干光源或白光光源的 QPI 产生了兴趣^[24-25]。除此之外,干涉测量装置往往有着复杂的

光学结构,成本高,并且对外界的干扰十分敏感。因此,除了基于干涉测量的 QPI 方法以外,还出现了许多非干涉 QPI 方法。非干涉 QPI 通过对成像这一物理过程进行分析,以计算的方式从多幅强度图像中定量地恢复相位,其中典型的有从多幅离焦强度图像中恢复相位的迭代法^[26](如 GS 算法和混合输入-输出算法)和光强传输方程法^[27],以及从多幅不同角度 LED 照明的强度图像中恢复出高分辨率相位图像的傅里叶叠层成像方法^[28]。当下的 QPI 已经能够定量地测量光经过“薄”生物样本的相位延迟,以达到衍射极限的横向分辨率对样本的内部状况进行分析,但与宏观物体的相位测量不同(在对诸如人脸、工件表面等宏观物体的相位进行测量时,通常会选取一个基准面,这样测得的相位为待测物体的表面轮廓),QPI 测量生物样本得到的相位是样本折射率在光传播路径上的累积。在只进行一次 QPI 测量的情况下,只有单一投影面的光程差是已知的,其中样本折射率与厚度信息相互耦合,无法得到样本的三维信息。故,QPI 获得的相位分布仍是二维分布,并不是真正意义上的三维成像。区别于传统的二维强度图像,有研究者将其称为“2.5 维成像”或“伪三维成像”。

为了获得更准确的形态学信息,如核形状、核干质量、核质比等,研究人员将生物样本的无标记三维成像作为了后续的研究目标^[29]。标记样本的三维成像一般采用共聚焦原理(如激光扫描共聚焦显微镜^[30])实现,即:在照明光路和探测光路的共轭位置放置一对针孔,尽可能地减少非焦平面的散射光,提高焦平面图像的分辨率和信噪比;接着以逐层扫描的方式对样本进行多次“光学切片”,实现三维成像。与直接探测标记样本荧光强度的方法不同,无标记样本的三维成像通过光与样本相互作用后的光场信息间接地得到待测样本的三维信息,主要包括光学相干层析(OCT)^[31-34]、光学投影层析(OPT)以及光学衍射层析(ODT)等方法。其中,常用的 OCT 系统是利用低相干干涉的方式去除光学切片层外的散射光,通过轴向扫描对来自不同深度的背向散射光进行基于强度的测量,从而获得有关物体三维结构的信息。目前,OCT 系统已在眼科、口腔科、皮肤科和心血管科得到了广泛的临床应用^[32-34]。OPT 的基本思想是对生物样本进行多个角度投影下的 QPI 测量,以滤波反投影的方法重建出样本的三维折射率分布,可以看作是经典的计算机断层扫描(CT)方法在可见光谱上的扩展^[35-36]。但是将 X 光

谱段的 CT 原理直接迁移到可见光谱上会出现一些问题: X 光的波长远小于生物结构的尺寸, 生物组织并不影响 X 光的直线传播, 因此 CT 中 X 光的直线传播近似是有效的; 但当可见光(390~780 nm) 穿过具有相似尺度结构的生物样本时, 光的波动特性就体现了出来, 会发生衍射效应, 产生显著的干扰, 因此 OPT 中光的直线传播近似便会失效^[37]。考虑到光与生物样本相互作用时的衍射效应, 基于波动方程的 ODT 被认为是可见光谱下对包含亚细胞结构生物样本进行三维定量成像的理想手段^[29,38]。经典的 ODT 方法使用单色光在不同角度下对待测样本进行照射, 以干涉的方式记录复散射场, 然后由复散射场测量结果重建出样本的三维折射率分布。从本质上看, ODT 就是对散射反演问题进行求解, 即已知散射场, 求解出待测物体的有关信息, 该问题在 OCT 和 OPT 中都未曾涉及。值得一提的是, ODT 研究中正向散射模型的建立以及相关的散射反演问题是通用的, 也被广泛应用于其他领域, 如声学、微波成像和雷达应用等^[39-41]。早在 1969 年, Wolf 等^[42]就发表了 ODT 的理论, 推出了 Born 一级近似下的傅里叶衍射定理, 得到了散射场与样本信息在傅里叶域中的线性关系。但是其中的“弱”散射和“薄”样本近似有着诸多限制, 因此 Devaney^[43]使用 Rytov 一级近似进行推导, 消去了其中的“薄”样本假设, 但仍要求样本内部折射率变化小, 即“弱”散射近似。由于多重散射的存在, 样本折射率分布与散射场之间的关系往往是非线性的。为了模拟更准确的散射过程, 研究人员提出了一些非线性散射近似模型, 如光束传播法(BPM)^[44]、离散偶极子近似(DDA)^[45-46]等, 这些模型在具有更高精度的同时也有着更复杂的计算度。在样本折射率的三维定量重建过程中, 基于线性散射模型的 ODT 反演算法首先被提出^[47]。如果直接根据傅里叶衍射定理进行反演, 就需要将散射场测量信息映射到样本的傅里叶域中, 此时测量数据的不足会使傅里叶逆变换过程中产生插值伪影问题^[48]。针对这一问题, 滤波反向传播法将傅里叶域中的信息映射转换到空间域中进行^[49-55]。除此之外, 实验中得到的往往都是有限角度照射下的散射场测量结果, 并且采用改变照明角度的方式进行散射反演也存在固有的缺失锥问题, 这些信息的缺失将无法支撑起有效的三维重建^[29,56]。因此, 一些研究人员将优化领域中的正则化法^[57-68]和机器学习法^[69-78]引入到 ODT 的研究中, 以解决有限角度、有限孔径测量条件下的散射反

演问题。而在 ODT 的实现方法中, 基于复散射场反演的 ODT 理论体系较为成熟, 通常使用数字全息同时记录散射场的振幅与相位, 以样本旋转方式或照明光角度旋转方式实现多角度测量^[38]。近年来, 研究人员意识到了部分相干光对分辨率提高以及成像质量改善的重要性, 并对部分相干照明的 ODT 原理及实现产生了极大兴趣^[79-80]。另外, 由于非干涉方法具有无散斑噪声、测量装置简单等优点, 基于非干涉的 ODT 理论也逐渐建立起来, 特别是近几年, 非干涉 ODT 的报道越来越多。基于非干涉的 ODT 测量装置简单, 因此这种依赖于物理过程理解的三维定量成像系统具有广阔的发展前景^[27,81-82]。随着 ODT 技术的不断进步与成熟, 其在生物医学研究中的应用也日益广泛, 目前在血液学^[83]、免疫学^[84]、感染性疾病^[85]、细胞生物学^[86]等领域都能看到它的身影。

本文将生物样本折射率三维定量成像的发展为主体进行综述。第 2 节从 OPT 和 ODT 正向的测量模型出发, 详细地推导了傅里叶中心切片定理和傅里叶衍射定理, 并对其物理意义进行了阐释。二者分别将相位测量结果、散射场测量结果与样本折射率分布联系起来, 指导了后续的反演过程。第 3 节将反演算法按发展递进关系分为四类进行介绍, 其中包括 OPT 与 ODT 共有的直接反演法和反向滤波法, 以及只用于 ODT 的正则化法和机器学习法。第 4 节对样本折射率三维定量成像的具体实现方法进行综述, 首先对基于数字全息测量的 ODT 加以说明, 介绍了样本旋转方式和照明光束旋转方式的实现方法, 之后对基于部分相干光和非干涉的 ODT 研究进行简单介绍。第 5 节总结全文并对未来的研究工作进行了展望。

2 正向测量模型: 从 OPT 到 ODT

前已述及, 生物样本的无标记光学成像不依赖于外源性的标记物, 而是凭借样本自身固有的光学属性改变光通过后的光场, 从而由二者相互作用后的光场特性对待测样本进行表征。这意味着将三维生物样本视作一个“黑箱”, 通过不同的方式进行多次测量, 然后以恰当的方法来恢复其三维结构信息。从光的波动性来看, 是生物样本的复折射率分布影响了入射光场, 故该“黑箱”的三维结构能够完全由其复折射率分布 $n(\mathbf{r}, \omega)$ 表征。这里, \mathbf{r} 代表空间位置, ω 为光波频率。复折射率的实部就是常规意义下的折射率, 反映了生物样本对光的折射; 虚部则代

表示了衰减,反映了生物样本对光的吸收。通常情况下, $n(\mathbf{r}, \omega)$ 有两个基本约束: 实部大于 1, 表示光在生物样本中的传输速度小于真空中的光速 c ; 虚部非负, 与能量守恒所要求的生物样本只吸收光的能量而不增加光的能量相对应。

建立了生物样本的数学表达之后, 无标记三维光学成像问题还包括两个方面: 正向的测量和反向的三维重建。本节将对正向的测量模型进行说明, 其中包括未考虑衍射效应的 OPT 和考虑衍射效应的 ODT。同时, 对傅里叶中心切片定理和傅里叶衍射定理这两个重要定理进行了推导, 它们将指导后续的反演过程。

2.1 OPT

早期的研究人员在定量恢复生物样本的三维折射率分布时, 将经典 X 光 CT 原理扩展到了可见光谱范围^[87-88]。二者的共同点是: 它们都从一系列不同角度的二维投影图像中重建三维结构。这也是 OPT 名称的由来。但是 CT 和 OPT 在测量原理上略有不同: 经典 CT 的成像过程根据朗伯比尔定律测量 X 光经过样本后样本对 X 光的吸收, 测得的是

折射率的虚部; 而 OPT 则使用 QPI 测量样本引入的相位变化, 测得的是折射率的实部。故本节将样本折射率分布函数表示为实值函数 $\text{Re}\{n(\mathbf{r}, \omega)\}$, 并且由于 OPT 中不涉及光波频率的改变, 故可将该实值函数简写为 $n(\mathbf{r})$ 。

OPT 正向测量过程如图 1(a) 所示。假设频率为 ω_0 的单色光在背景介质(假定为无色散介质, 实值折射率为常数 n_m) 中沿直线传播, 照射绕着 z 轴旋转的生物样本, 进行多次 QPI 测量。QPI 得到的相位结果为光传播路径上样本折射率的线积分, 可以用三维 Radon 变换来描述这一过程, 即三维函数在二维空间内的投影。鉴于推导过程中入射光沿直线传播的假设, 三维 Radon 变换可以看作是一系列切片二维 Radon 变换的叠加, 由二维情况下推导出的结论也可以轻易拓展至三维, 因此后续的推导仅考虑二维情况。图 1(a) 中, 假设样本绕着 z 轴旋转, 可以不失一般性地选取位于 $z = z_s$ 处的 x - y 平面进行分析, 如图 1(b) 所示。图 1(b) 的左图表示在 $z = z_s$ 平面上, 生物样本切片在空间域中相位测量的过程, 右图为其在傅里叶域中的结果。

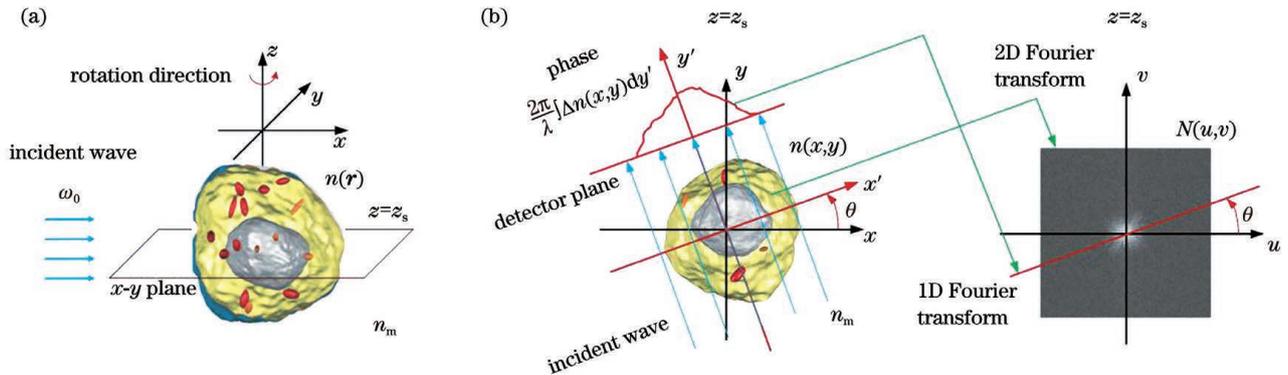


图 1 OPT 正向测量模型。(a) 正向的 QPI 测量过程; (b) 傅里叶中心切片定理示意图

Fig. 1 OPT forward measurement model. (a) Forward QPI measurement process; (b) illustration of Fourier-slice theorem

在选取平面的空间域中分别建立绝对坐标系 x - y 和相对坐标系 x' - y' 。由于入射光方向与样本旋转方向是相对的, 不妨假设入射光沿 y' 方向旋转照射, 而探测平面始终垂直于 y' 方向。相对坐标系的旋转角度用 θ 表示, 则 x' - y' 坐标满足如下关系:

$$\begin{cases} x' = x \cos \theta + y \sin \theta \\ y' = -x \sin \theta + y \cos \theta \end{cases} \quad (1)$$

对于 $z = z_s$ 平面上的二维样本切片 $n(x, y)$ 而言, 相位测量结果可以看作是样本折射率 $n(x, y)$ 与背景折射率 n_m 之差 $\Delta n(x, y)$ 沿入射光方向在 x' 轴上的一维投影, 表示为

$$\begin{aligned} \varphi(x', \theta) &= \frac{2\pi}{\lambda} \int \Delta n(x, y) dy' = \\ &= \frac{2\pi}{\lambda} \int \Delta n(x' \cos \theta - y' \sin \theta, x' \sin \theta + y' \cos \theta) dy', \end{aligned} \quad (2)$$

式中: $\varphi(x', \theta)$ 表示相位测量结果, 是关于坐标 x' 和旋转角度 θ 的函数; λ 为入射光在真空中的波长。相位测量结果 $\varphi(x', \theta)$ 也可以视作对 $\Delta n(x, y)$ 进行二维 Radon 变换, 用 $\mathfrak{R}_\theta\{(2\pi/\lambda)\Delta n(x, y)\}(x')$, 表示入射光旋转角度为 θ 时, $\Delta n(x, y)$ 沿 y' 方向投影到 x' 轴上的 Radon 变换结果, 其中: 符号 \mathfrak{R} 表示 Radon 变换。

在经典的 CT 成像原理中,这种以 x' 和 θ 为直角坐标系绘制出的 $\varphi(x', \theta)$ 二维函数图像称为正弦图。该正弦图包含了重构二维切片的必要信息。为了从正弦图的投影数据中重构出二维样本函数,需要将 $\varphi(x', \theta)$ 与 $\Delta n(x, y)$ 从数学上联系起来。首先对相位 $\varphi(x', \theta)$ 中的 x' 坐标进行一维傅里叶变换,即

$$\Phi(\xi, \theta) = \mathfrak{F}\{\varphi(x', \theta)\} = \int \varphi(x', \theta) \exp(-i2\pi\xi x') dx', \quad (3)$$

式中: $\Phi(\xi, \theta)$ 表示 $\varphi(x', \theta)$ 傅里叶变换后的结果; ξ 为变换后的坐标;符号 \mathfrak{F} 表示傅里叶变换。将式 (2) 代入式 (3), 并通过 Jacobian 矩阵进行 $dx' dy' = dx dy$ 的积分变量替换, 即

$$\Phi(\xi, \theta) = \frac{2\pi}{\lambda} \iint \Delta n(x, y) \exp[-i2\pi\xi(x \cos \theta + y \sin \theta)] dx dy. \quad (4)$$

再对 $\Delta n(x, y)$ 进行二维傅里叶变换, 即

$$N(u, v) = \mathfrak{F}\{\Delta n(x, y)\} = \iint \Delta n(x, y) \exp[-i2\pi(ux + vy)] dx dy, \quad (5)$$

式中: $N(u, v)$ 表示 $\Delta n(x, y)$ 二维傅里叶变换后的结果; u, v 表示变换后的坐标。

可以看出,式 (4) 与式 (5) 在形式上相似。可以令 $u = \xi \cos \theta$ 和 $v = \xi \sin \theta$, 使得 $\varphi(\xi, \theta)$ 和 $N(u, v)$ 相等, 即

$$\Phi(\xi, \theta) = \frac{2\pi}{\lambda} N(\xi \cos \theta, \xi \sin \theta). \quad (6)$$

式 (6) 是经典 CT 成像原理的核心, 也被称为傅里叶中心切片定理。它说明在旋转角度 θ 下, 一维相位测量结果的傅里叶变换与二维样本函数傅里叶域分布在同一角度直线上的结果是等效的。在图 1(b) 中体现为: 左图相位测量的一维傅里叶变换结果即为右图 $N(u, v)$ 在一条直线上的分布。这个定理意味着二维样本函数可以通过正弦图(即多个角度下的相位测量结果)中的数据进行重建。相应地, 样本的三维重建可以通过多个二维正弦图

$\sum_{z_s = -\infty}^{+\infty} \varphi(x', \theta) |_{z=z_s}$ 完成。

前面提到, OPT 测量模型假设 QPI 得到的是样本折射率实部沿投影方向的积分, 并没有考虑光波通过生物样本时的衍射效应; 而在 X 光照射情况下成立的直线传播假设, 在入射光波长增加到与生物样本结构尺寸近似时将不再适用, 二者相互作用时的衍射效应不能忽略。下一节将从光的波动性出发, 推导 ODT 中的傅里叶衍射定理。

2.2 ODT

与 OPT 直接使用 QPI 作为正向的测量过程不同, ODT 的正向测量过程是要得到光经过生物样本后的散射场结果, 其散射测量过程如图 2 所示。入射光照射到生物样本上, 在探测平面上对产生的散射场进行探测。在该过程中, 生物样本被视作一个散射体, 用有限体积内紧支撑的散射势 $V(\mathbf{r}, \omega) = k_m^2 [n_r^2(\mathbf{r}, \omega) - 1]$ 表示, 其中: $n_r(\mathbf{r}, \omega) = n(\mathbf{r}, \omega) / n_m(\omega)$ 称为样本的相对折射率, 为样本的复折射率 $n(\mathbf{r}, \omega)$ 与背景介质折射率 $n_m(\omega)$ 之比; $k_m = (\omega/c) n_m(\omega)$ 为背景介质的波数。

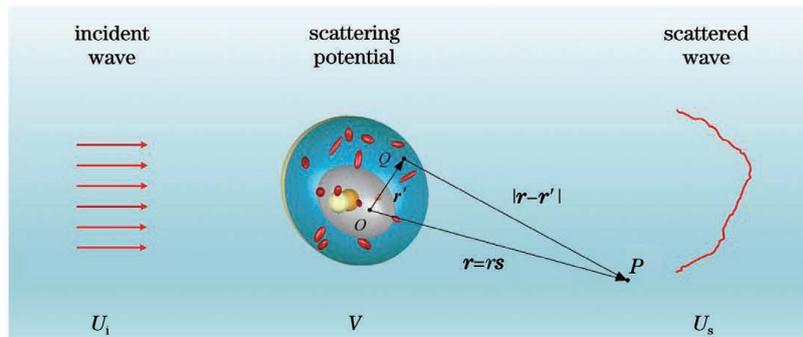


图 2 ODT 正向测量模型

Fig. 2 ODT forward measurement model

前面提到, ODT 的本质是求解散射反演问题, 即由散射场信息 $U_s(\mathbf{r}, \omega)$ 反演得到样本的三维信息

$V(\mathbf{r}, \omega)$ 。散射反演问题的解决往往需要尽可能多的散射实验次数, 以得到足够的数据进行三维重建,

用单一的散射实验数据进行反演就会简化为逆源问题,得到的解将不是唯一的^[13]。这意味着 ODT 的实现需要多次散射测量,而任意一次散射实验所产生的总场 $U(\mathbf{r}, \omega)$ 都满足非齐次 Helmholtz 方程

$$[\nabla^2 + k_m^2] U(\mathbf{r}, \omega) = -V(\mathbf{r}, \omega)U(\mathbf{r}, \omega)。 \quad (7)$$

值得注意的是,波动方程和 Helmholtz 方程虽然在时域和频域中呈对应关系,但 Helmholtz 方程更一般,适合用于描述光波在色散介质中的传播,而波动方程只适用于非色散和非衰减的背景介质^[13]。式(7)中的总场 $U(\mathbf{r}, \omega)$ 可以看作是入射场 $U_i(\mathbf{r}, \omega)$ 和散射场 $U_s(\mathbf{r}, \omega)$ 之和,即

$$U(\mathbf{r}, \omega) = U_i(\mathbf{r}, \omega) + U_s(\mathbf{r}, \omega)。 \quad (8)$$

假定入射波为平面波,则入射场 $U_i(\mathbf{r}, \omega)$ 在整个空间内都满足齐次 Helmholtz 方程

$$[\nabla^2 + k_m^2] U_i(\mathbf{r}, \omega) = 0。 \quad (9)$$

将式(7)、(8)、(9)联立,得到散射场满足的非齐次 Helmholtz 方程为

$$[\nabla^2 + k_m^2] U_s(\mathbf{r}, \omega) = -V(\mathbf{r}, \omega)U(\mathbf{r}, \omega)。 \quad (10)$$

式(10)的右边可以看作是产生散射场的诱导源。为了求解该式,通常引入格林函数将式(10)的微分方程转化为积分方程。其中格林函数满足

$$[\nabla^2 + k_m^2] G(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \omega) = -\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')， \quad (11)$$

式中: $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ 为狄拉克函数,代表了散射势中任意一点 Q 处 ($\mathbf{r} = \mathbf{r}'$) 的点源。而格林函数则描述了由该点源产生的场,求解式(11)得到其中的一个解为

$$G(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \omega) = \frac{1}{4\pi} \frac{\exp(ik_m |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}。 \quad (12)$$

式(12)中的格林函数描述了点源产生的场为一个向外辐射的球面波。将式(10)乘以 $G(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \omega)$, 式(11)乘以 $U_s(\mathbf{r}, \omega)$, 二者相减之后左右同时积分,并应用格林定理,即可得到散射场的表达式,将其代入式(8),就可以得到势散射的积分方程。该方程也被称为 Lippmann-Schwinger(LS)积分方程^[89], 即

$$U(\mathbf{r}, \omega) = U_i(\mathbf{r}, \omega) + \underbrace{\int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \omega)V(\mathbf{r}', \omega)U(\mathbf{r}', \omega)d^3r'}_{U_s(\mathbf{r}, \omega)}。 \quad (13)$$

在大多数有实际意义的情况下,式(13)不能得到解析解,通常的做法是采用微扰法对散射场进行近似,但前提是样本对光的散射要很弱^[90]。通过不同的级数展开方式可以得到两种常用的线性近似方法: Born 一级近似^[42] 和 Rytov 一级近似^[43]。其中 Born 一级近似可以看作是将式(13)等号右边积分号中的总场 $U(\mathbf{r}, \omega)$ 替换为入射场 $U_i(\mathbf{r}, \omega)$, 即

$$U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}, \omega) = \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \omega)V(\mathbf{r}', \omega)U_i(\mathbf{r}', \omega)d^3r'。 \quad (14)$$

该式可以解释为:入射场与散射势相乘作为一个诱导源,而格林函数作为一个点源响应函数,与该诱导源进行卷积形成散射场^[91]。下面考虑 Born 一级近似的情况,并对入射波作进一步的假设。假定入射波为单色平面波,频率为 ω , 振幅为 1 个单位,沿着单位矢量 $\mathbf{s}_0 = (s_{0x}, s_{0y}, s_{0z})$ 方向传播,则入射场的复振幅表示为 $U_i(\mathbf{r}, \omega) = \exp(ik_m \mathbf{s}_0 \cdot \mathbf{r})$ 。同时认为散射过程为弹性散射,即频率 ω 保持不变,故后续推导略去各个物理量中的频率符号 ω 。式(12)中的格林函数能够用二重积分表示为 Weyl 公式^[90], 即

$$G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{ik_m}{8\pi^2} \iint_{s_z} \frac{1}{s_z} \exp\{ik_m [s_x(x - x') + s_y(y - y') + s_z(z - z')]\} ds_x ds_y， \quad (15)$$

式中: \mathbf{r} 的坐标矢量为 (x, y, z) ; \mathbf{r}' 的坐标矢量为 (x', y', z') ; $\mathbf{s} = (s_x, s_y, s_z)$ 为沿 \mathbf{r} 方向的单位矢量,且三个分量之间满足 $s_x^2 + s_y^2 + s_z^2 = 1$ 。可以看出, s_z 只有在 $s_x^2 + s_y^2 \leq 1$ 时为实值,反之,则会出现

所谓的隐失波,这将使样本的三维重建复杂化。将式(15)中的格林函数和平面波入射场的表达式代入式(14)中,就可以得到 Born 一级近似下的散射场表达式为

$$U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}) = \frac{ik_m}{8\pi^2} \iiint d^3r' \iint_{s_z} \frac{1}{s_z} V(\mathbf{r}') \exp[ik_m (s_x x + s_y y + s_z z)] \times \exp\{-ik_m [(s_x - s_{0x})x' + (s_y - s_{0y})y' + (s_z - s_{0z})z']\} ds_x ds_y。 \quad (16)$$

用 $\tilde{V}(\mathbf{K})$ 表示对散射势 $V(\mathbf{r})$ 进行三维傅里叶变换:

$$\tilde{V}(\mathbf{K}) = \mathfrak{F}\{V(\mathbf{r})\} = \iiint V(\mathbf{r}) \exp[-i2\pi\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}] d^3r. \quad (17)$$

通常将探测平面垂直于入射方向 \mathbf{s}_0 放置在距离样本 l_D (为常数) 处, 则探测平面上任意一点的位置矢量可以表示为 $\mathbf{r}_D = (x_D, y_D, l_D)$ 。由式(16)得到探测平面上的散射场, 并利用式(17)将其改写为

$$U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}_D) = \frac{ik_m}{8\pi^2} \iint \frac{1}{s_z} \tilde{V} \left[\frac{k_m}{2\pi} (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \right] \cdot \exp[ik_m(s_x x_D + s_y y_D + s_z l_D)] ds_x ds_y. \quad (18)$$

对探测平面 (x_D, y_D) 上的散射场 $U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}_D)$ 进行二维傅里叶变换, 用 $\tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D) = \mathfrak{F}\{U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}_D)\}$ 表示, 即

$$\tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D) = \frac{ik_m}{8\pi^2} \iint dx_D dy_D \iint \frac{1}{s_z} \tilde{V} \left[\frac{k_m}{2\pi} (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \right] \times \exp[ik_m(s_x x_D + s_y y_D + s_z l_D)] \cdot \exp[-i2\pi(f_{Dx} x_D + f_{Dy} y_D)] ds_x ds_y, \quad (19)$$

式中: $\mathbf{f}_D = (f_{Dx}, f_{Dy}, f_{Dz})$ 为傅里叶变换后的坐标, 并且满足 $f_{Dx}^2 + f_{Dy}^2 + f_{Dz}^2 = k_m^2 / (4\pi^2)$ 。二维狄拉克函数 $\delta(f_x, f_y)$ 的表达式为

$$\delta(f_x, f_y) = \iint \exp(i2\pi f_x x_D + i2\pi f_y y_D) dx_D dy_D, \quad (20)$$

式中: $f_x = \frac{k_m}{2\pi} s_x - f_{Dx}, f_y = \frac{k_m}{2\pi} s_y - f_{Dy}$ 。通过式(20)对式(19)进行整理, 得到

$$\tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D) = \frac{ik_m}{8\pi^2} \iint \frac{1}{s_z} \tilde{V} \left[\frac{k_m}{2\pi} (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \right] \cdot \delta(f_x, f_y) \cdot \exp(ik_m s_z l_D) ds_x ds_y, \quad (21)$$

利用狄拉克函数的尺度变换和筛选性质, 可以得到

$$\tilde{V} \left(\mathbf{f}_D - \frac{k_m}{2\pi} \mathbf{s}_0 \right) = -2ik_m s_z \exp(-ik_m s_z l_D) \tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D). \quad (22)$$

式(22)即为 Born 一级近似下, 散射场与散射势在傅里叶域中的线性关系, 该式也被称为傅里叶衍射定理, 其物理解释如图 3 所示。观察式(22)中傅里叶域的坐标可以看到, 由 \mathbf{f}_D 所满足的关系 $f_{Dx}^2 + f_{Dy}^2 + f_{Dz}^2 = k_m^2 / (4\pi^2)$ 确定了一个半径为 $k_m / (2\pi)$ 的球面 (也被称作 Ewald 球^[89])。由于其中的 f_{Dx} 和 f_{Dy} 由探测平面的大小确定, 因此 f_{Dz} 在空间位

置上有所限制, 该限制使得 $\tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D)$ 在傅里叶域中分布在以半径为 $k_m / (2\pi)$ 的球面上, 在图 3 中表现为散射场的二维傅里叶变换被投影在散射势的三维傅里叶变换的一个球面上。同时, 该球面的球心偏移原点 (即零频) 的位置为 $-k_m \mathbf{s}_0 / (2\pi)$, 其大小为 $k_m / (2\pi)$, 方向则由入射光的方向 \mathbf{s}_0 确定。

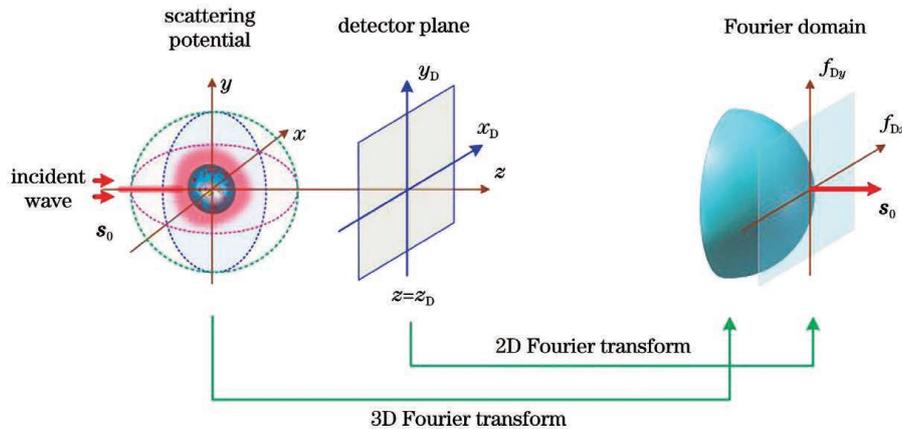


图 3 傅里叶衍射定理示意图
Fig. 3 Illustration of Fourier diffraction theorem

以上是在 Born 一级近似下,通过 Weyl 公式对格林函数进行展开的方式得到傅里叶衍射定理的过程,还有许多其他方法也可以得到相同的结论,比如卷积法^[13]和波矢量法^[92-93]。Born 一级近似要求样本产生的相位延迟较小,对光的吸收相当低,满足“薄”物体和“弱”散射的假设。对于较厚的物体,Rytov 一级近似更为合适。Rytov 一级近似下的散射场可以由 Born 一级近似的结果表示为

$$U_s^{(\text{Rytov})}(\mathbf{r}, \omega) = U_i(\mathbf{r}, \omega) \left\{ \exp \left[\frac{U_s^{(\text{Born})}(\mathbf{r}, \omega)}{U_i(\mathbf{r}, \omega)} \right] - 1 \right\}. \quad (23)$$

将式(23)代入 LS 积分方程,同样可以得到 Rytov 一级近似下的傅里叶衍射定理^[53],即

$$\begin{aligned} \tilde{V} \left(\mathbf{f}_D - \frac{k_m}{2\pi} \mathbf{s}_0 \right) = \\ - 2ik_m s_z \exp(-ik_m s_z l_D) \tilde{\varphi}_s^{(\text{Rytov})}(\mathbf{f}_D) \exp(ik_m l_D), \end{aligned} \quad (24)$$

式中: $\tilde{\varphi}_s^{(\text{Rytov})}(\mathbf{f}_D)$ 为 Rytov 一级近似下,散射场复相位的傅里叶变换。此外,已有人证明,在极短波长条件下,由 Rytov 近似得到的傅里叶衍射定理与傅里叶中心切片定理是等效的^[43]。

在以上的推导中,Born 一级近似假设样本为“薄”样本和“弱”散射;Rytov 一级近似虽然未对样本的厚度进行约束,但要求样本的折射率变化小,亦即“弱”散射近似。这两种线性模型的有效性仅限于“弱”散射样本。为了克服这一局限性,研究人员提出了一些考虑多重散射样本的非线性模型,如 BPM^[44]、DDA^[45-46]以及 LS 方程的非线性近似模型^[41]等。其中,基于 LS 方程的非线性近似模型通过对式(13)进行一些非线性近似来实现对散射过程更为精确的表示。而在 BPM 中,非均匀样本沿着传播方向被虚拟地分割成许多层“薄”切片,每一层切片都视作对光进行着相位调制。因此,BPM 通过逐层反复使用基于相位调制的傍轴波动方程来模拟光在样本中的传播。与 ODT 正向测量模型不同,BPM 中不再使用散射势表征样本,而是寻求一个直接将样本的折射率分布与测量得到的光场联系起来的方程,从而使得 BPM 模型非线性。非线性散射模型在散射效应较强时具有更高的精度,但付出的代价是比线性模型更加复杂的计算度^[29]。

本节从 OPT 和 ODT 正向的测量模型出发,介绍了傅里叶中心切片定理和傅里叶衍射定理,其中,傅里叶中心切片定理将相位测量结果与样本实值折射率分布函数联系起来,而傅里叶衍射定理则将

散射场测量结果与样本的散射势(等效于复值折射率分布)联系起来。这两个定理允许从相位测量结果或散射场测量结果中获取样本的有关信息。

3 三维折射率定量成像的反演算法

在得到测量结果之后,需要通过算法对样本三维折射率分布进行定量反演。本节根据反演算法发展的递进关系,将其分为四类(直接反演法、反向滤波法、正则化法以及机器学习法)进行介绍。

3.1 直接反演法

顾名思义,直接反演法就是直接利用傅里叶中心切片定理或傅里叶衍射定理,对多个角度下的相位测量结果或散射场测量结果进行二维傅里叶变换,再将变换结果映射到待测物的三维傅里叶域中,最后经傅里叶逆变换即可得到样本的三维折射率分布。其中涉及的从多个角度获取测量结果的方式主要有两种:样本旋转和照明光束旋转^[56]。在样本旋转方式中,如图 4(a)所示,入射光与探测器固定不动,只有样本本身旋转;在照明光束旋转方式中,如图 4(b)所示,样本和探测器固定不动,只有照明方向改变。这两种测量方式的具体实现方法将在第 4 节中进行介绍,本部分主要介绍这两种测量方式对反演过程的影响。

对于 OPT 成像而言,QPI 的相位测量过程仅对入射光垂直于探测平面的情况成立,因此 OPT 中的多角度测量实际上只涉及样本旋转这一种方式。由傅里叶中心切片定理可知,每一个角度下得到的相位信息对应于傅里叶域中的一个平面,当样本旋转时,包含信息的平面也随之旋转。OPT 的直接反演法就是用多角度相位测量的傅里叶变换结果填充样本函数的空间频域,再对其进行傅里叶逆变换,得到样本函数的空间分布。但是如果采用这种直接填充的方法,通常会因为投影角度不足而需要在矩阵中对傅里叶域缺失的数据进行插值,因此会受到插值伪影的影响。

对于考虑衍射效应的 ODT 成像而言,散射场是存在于全空间中的,正向散射、侧向散射以及背向散射都蕴含含有物体的信息。图 4(c)就表示了单次全空间散射场测量结果中所包含的信息,这里为了直观地说明,将实际上为三维的 Ewald 球在二维表示。根据傅里叶衍射定理,散射场的二维傅里叶变换结果映射在散射势傅里叶域的一个球心位于 $-k_m \mathbf{s}_0 / (2\pi)$ 、半径为 $k_m / (2\pi)$ 的球面上。其中:实线表示透射模式,即探测点位置矢量方向与入射光

方向夹角小于 90° ; 虚线代表反射模式, 即探测点位置矢量方向与入射光方向的夹角大于 90° ^[35,94]。这种球面映射使得样本旋转方式和照明光束旋转方式在傅里叶域的信息填充区域不同。图 4(d) 为样本旋转方式下, 全空间散射场信息在散射势傅里叶域中的填充情况。其中 Ewald 球随着样本的旋转而旋转, 覆盖形成了两个球形的支撑区: 中间由透射模式覆盖形成的球形区域对应透射型衍射层析成像, 外围由反射模式覆盖形成的壳形区域则对应反射型衍射层析成像^[94]。图 4(e) 为照明光束旋转方式下, 全空间散射场信息在散射势傅里叶域中的填充情

况。由于该旋转方式下探测面不改变, 因此入射光在 $\pm 90^\circ$ 范围内旋转时, Ewald 球随着球心的旋转而平移。当入射光旋转角度超过 90° 时, 反射模式和透射模式互换, 从而形成了图 4(e) 所示的两个支撑区: 中间由透射模式覆盖形成的“苹果核”区域为透射型支撑区, 外围由反射模式覆盖形成的区域则对应反射型支撑区。可以看出, 在照明光束旋转方式下, 会出现图 4(e) 所示的缺失锥问题, 即无论采用透射模式还是反射模式, 总会有中间的低频分量没有被表示^[29,56]。这也是 X 光 CT 和磁共振成像中常见的问题^[95-96]。

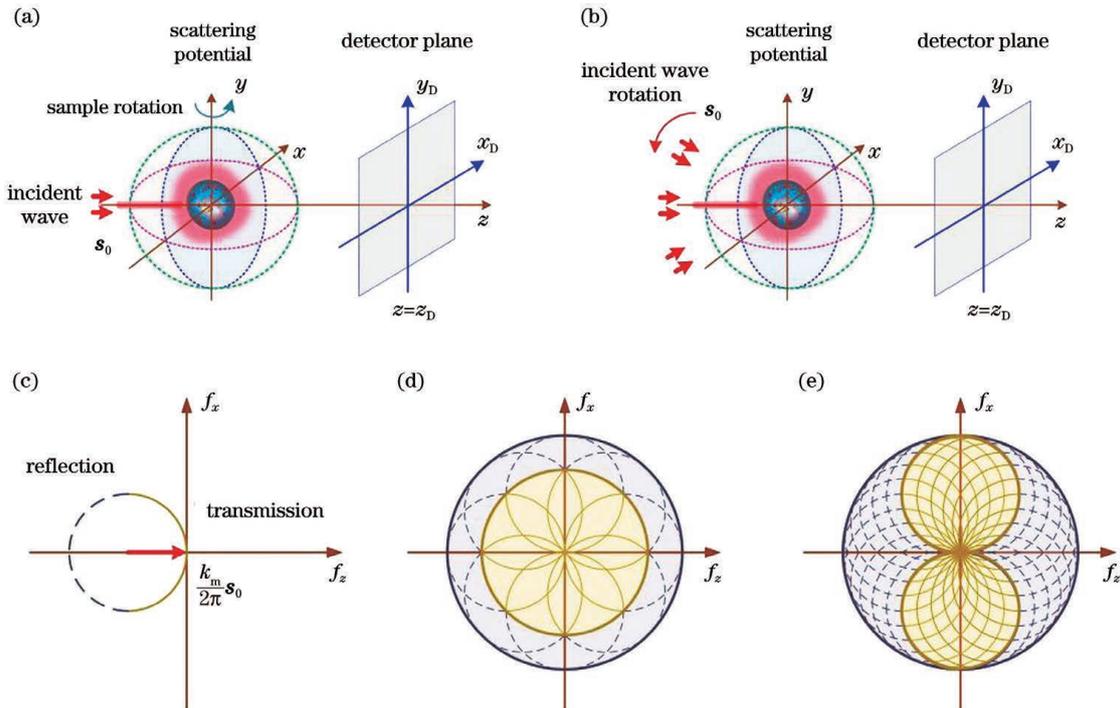


图 4 不同旋转方式下频域的映射。(a) 样本旋转方式; (b) 照明光束旋转方式; (c) 单次测量频域的映射; (d) 样本旋转方式下频域的映射; (e) 照明光束旋转方式下频域的映射

Fig. 4 Frequency domain mapping under different rotation modes. (a) Illustration of sample rotation; (b) illustration of incident wave rotation; (c) frequency domain mapping of one single measurement; (d) frequency domain mapping of sample rotation mode; (e) frequency domain mapping of incident wave rotation mode

ODT 直接反演法的理论基础是 2.2 节中介绍的傅里叶衍射定理, 其利用了 Born 一级近似和 Rytov 一级近似下傅里叶域中散射场与散射势的线性关系, 即式(22)和式(24)。该方法首先对散射场进行傅里叶变换, 然后将变换结果映射到傅里叶域中相应的 Ewald 球上, 最后进行傅里叶逆变换, 得到样本的折射率分布^[42-43]。值得注意的是, Born 一级近似下的直接反演法使用的是散射场的复振幅信息, 包括了振幅项与未处理的相位项。而 Rytov 一级近似下的反演则需要散射场的复相位项, 同时要对其进行相位解包裹处理, 以消除 2π 相位跳

转的模糊性^[37,48]。这种直接反演方法同样由于测量角度不足, 需要在傅里叶域中进行插值处理, 会受到插值伪影的影响^[47-48]。为了减小这种影响, Sung 等^[97]利用迭代约束算法对 Rytov 近似下的直接反演法进行改进, 基于目标函数为非负的先验知识进行约束, 即生物样本的折射率不低于介质的折射率。

除了插值伪影问题之外, 实际成像系统的孔径限制、探测器的尺寸限制等因素都会限制散射场的测量角度, 并不能达到全空间的散射场测量。因此, 尽管直接反演法的实现过程简单, 计算速度快, 但是

它高度依赖于测量数据的特性,使得其实际应用效果差,未得到广泛应用。

3.2 反向滤波法

为了消除直接反演法中的插值伪影问题,借鉴 CT 中滤波反投影算法的思路,研究人员提出了反向滤波法,将测量信息映射转化到空间域中执行,从而避免了由傅里叶逆变换造成的影响。反向滤波法

包括 OPT 中的滤波反投影法^[87-88,98-100]以及 ODT 中的滤波反向传播法^[49-55]。

由于 OPT 与 CT 原理的相似性,由 CT 中的滤波反投影算法^[35]可以直接推出适用于 OPT 的滤波反投影算法。接着 2.1 节的 OPT 正向测量模型进行分析,将 $\Delta n(x, y)$ 表示为 $N(u, v)$ 的二维傅里叶逆变换,即

$$\Delta n(x, y) = \mathfrak{F}^{-1} \{N(u, v)\} = \iint N(u, v) \exp [i2\pi(ux + vy)] \, dudv, \quad (25)$$

式中: \mathfrak{F}^{-1} 表示傅里叶逆变换。令 $u = \xi \cos \theta$ 和 $v = \xi \sin \theta$, 通过 Jacobian 矩阵得到 $dudv = \xi d\xi d\theta$, 变换式(25)中的积分符号,得到

$$\Delta n(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^{+\infty} N(\xi \cos \theta, \xi \sin \theta) \exp [i2\pi\xi(x \cos \theta + y \sin \theta)] \, \xi d\xi d\theta. \quad (26)$$

将式(5)所示的傅里叶中心切片定理应用于式(26),并利用对称性,可以得到

$$\Delta n(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi} \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} |\xi| \Phi(\xi, \theta) \exp [i2\pi\xi(x \cos \theta + y \sin \theta)] \, d\xi d\theta, \quad (27)$$

式(27)中的 $|\xi|$ 可以看作是空间频域中的一个斜坡滤波器,用来补偿采样密度的下降,这也是滤波反投影算法名称的由来。但是斜坡函数在定义域的两端趋近于 ∞ , 不可积的特性使得其傅里叶逆变换没有定义,因此通常需要采用加窗的方法来对其进行限制。Vertu 等^[98]使用 sinc 函数对 $|\xi|$ 进行了调制,而 Fauver 等^[99]则使用 Hann 窗调制来衰减噪声的影响。除此之外,CT 中解决有限角度投影问题的研究也可以被应用于 OPT 中^[101], 如, Charrière 等^[87]就将 CT 中的迭代约束算法应用在 OPT 的研究中,以减小缺失投影角度的影响。

滤波反投影法的优点在于其算法实现速度快,但正如之前所说,它的理论依据 OPT 假设光沿直线传播,并没有考虑光的波动性。这对于折射率变化小的物体是很好的近似,如体外弱散射的细胞^[98-100],而对于比成像系统景深厚得多的样本^[95],这种不准确的假设会显著影响三维重建的分辨率。

考虑到光的波动特性,对应于 OPT 中的滤波反投影法,Devaney^[49]提出了滤波反向传播法。假定样本绕 y 轴旋转,旋转角度为 θ , 将 $\tilde{V}(\mathbf{K})$ 在球面坐标系中进行傅里叶逆变换,并变换积分符号,可以得到

$$V(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-k_m/(2\pi)}^{k_m/(2\pi)} df_{Dx} \int_{-k_m/(2\pi)}^{k_m/(2\pi)} df_{Dy} \frac{|f_{Dx}|}{s_z} \tilde{V}(\mathbf{K}) \exp(i2\pi\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}), \quad (28)$$

式中: $\mathbf{K} = \mathbf{f}_D - k_m \mathbf{s}_0 / (2\pi)$; 系数 $1/2$ 补偿了样本绕着 y 轴旋转 2π 角度所造成的对称覆盖。将式(22)代入式(28),可以得到

$$V(\mathbf{r}) = -ik_m \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-k_m/(2\pi)}^{k_m/(2\pi)} df_{Dx} \int_{-k_m/(2\pi)}^{k_m/(2\pi)} df_{Dy} |f_{Dx}| \tilde{U}_s^{(\text{Born})}(\mathbf{f}_D) \exp(-ik_m s_z l_D) \times \exp [i(2\pi\mathbf{f}_D - k_m \mathbf{s}_0) \cdot \mathbf{r}]. \quad (29)$$

式(29)便是 Born 一级近似下,绕单轴旋转样本的三维滤波反向传播算法。该算法的实现方法为:首先使用一个斜坡滤波器 $|f_{Dx}|$ 对测量到的散射场数据进行滤波处理,再通过式(28)将滤波后的结果填充到散射势的空间域中,随后不断地旋转样本,将不同角度下的信息贡献加和,从而得到样本的散射势表达。同样,将式(24)代入式(28),也会得到

Rytov 一级近似下的滤波反向传播算法。实现步骤也类似,不同的是需要将散射场数据进行 Rytov 变换,替换为复相位信息^[48]。通过以上分析可以看出,与 OPT 的滤波反投影算法类似,滤波反向传播算法将傅里叶域中的信息填充转化到了空间域进行,这种处理方式减小了插值伪影的影响。但是,滤波反向传播算法的推导是基于样本的旋转进行的,

在照明光束旋转方式下不适用,并且,空间域的信息填充也需要大量的测量数据作为支撑。因此,研究人员对滤波反向传播算法进行了扩展和改进,例如:Vouldis 等^[53]提出了一种能够融合多个入射方向的改进算法。Kostencka 等^[51,55]提出了扩展聚焦深度的滤波反向传播算法,使用严格的衍射理论扩展了聚焦深度,将修正后的数据进行 Rytov 变换,以此来提高离轴特征的重建精度;此外,该团队还给出了照明光束旋转下滤波反向传播方法的表达^[48]。Udpa 研究小组^[50,52]认为滤波反向投影法需要对散射场数据旋转 360°,这会造成冗余;此外,他们还探索了由旋转 270°测量数据反演的可能性。

综上所述,反向滤波法将测量信息的填充从傅里叶域转化到了空间域,减小了傅里叶逆变换造成的插值伪影的影响。它与 3.1 节中介绍的直接反演法都是线性反演方法,这种线性方法的计算量相对较小,速度较快。但是 OPT 中假设样本不产生散射,而 Born 一级近似和 Rytov 一级近似则基于“弱”散射进行假设。这几种模型的有效性都仅限于“无”散射或“弱”散射样本,而在实际中,多重散射下的不适用性会影响样本三维重建的精度。除此之外,线性反演方法也依赖于测量数据的完整性,而实际的测量条件往往会对数据的获取有所限制,通常测量得到的是有限视场或缺少角度的结果。因此,如何从稀疏数据中反演多重散射样本信息成为了进一步的研究目标。

3.3 正则化法

为了克服“弱”散射这一局限,研究人员进行了一些非线性反演模型的研究,其中包括对比源反演法^[102-103]、共轭梯度法^[39,104]、光束传播法^[59]、递归 Born 近似法^[105]以及通过求解 LS 方程的迭代正向散射法^[60-61,106]。在稀疏数据反演方面,优化领域的正则化法被引入到 ODT 研究中。通常情况下,优化方法旨在通过最小化成本函数来满足保真度准则,使用待测物估计进行模拟计算得到复值场(或强度),再将其与测量的复值场(或强度)进行比较,就可以得到成本函数。由于这些算法采用的是精确的模拟求解器,并包括促进稀疏性的正则化器,所以它们通常优于传统 ODT 算法,特别是在缺失或不完整数据集的情况下(例如缺失锥问题)^[63]。并且,由于正则化法易与非线性反演模型相结合,因此,基于正则化法的 ODT 也被期望获得测量条件限制下多重散射样本的高精度三维重建^[58-62]。

为了使用优化理论解决 ODT 这一散射反演问

题,首先需要将该问题进行数学化表达。ODT 中正向的散射测量过程可以被建模成^[107]

$$\mathbf{g} = \mathbf{S}(\mathbf{V}) + \boldsymbol{\eta}, \quad (30)$$

式中: \mathbf{g} 表示由成像系统所记录的离散化散射测量结果,表现为具有 $M(=M_x \times M_y)$ 个像素的矩阵;若散射场通过数字全息的方式进行复振幅的测量,则 $\mathbf{g} \in \mathbb{C}^M$;若仅对散射场强度进行测量,则 $\mathbf{g} \in \mathbb{R}^M$ 。 $V \in L_2(\mathbb{R}^3)$ 表示连续紧支撑的三维散射势; $\mathbf{S}(\cdot): L_2(\mathbb{R}^3) \rightarrow \mathbb{R}^M$ 表示 ODT 正向的散射测量过程,是由样本散射势到散射场测量结果的无噪声映射过程,该过程可以是线性的散射模型,也可以是非线性的。 $\boldsymbol{\eta}$ 为误差项,代表了随机噪声, $\boldsymbol{\eta} \in \mathbb{R}^M$ 。为了数值化求解反演问题和恢复散射势 V ,需要对散射势 V 和操作符 $\mathbf{S}(\cdot)$ 也进行离散化,离散化后的散射测量模型为

$$\mathbf{g} = \mathbf{S}(\mathbf{V}) + \boldsymbol{\eta}, \quad (31)$$

式中: $\mathbf{V} \in \mathbb{R}^N$ 为离散化的散射势表达,其中 $N(=N_x \times N_y \times N_z)$ 代表了体素的个数; $\mathbf{S}(\cdot): \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}^M$ 为离散化的散射过程操作符。

在反演问题的变分方法中,通常将重建散射势的过程转化为求解优化问题

$$\hat{\mathbf{V}} = \arg \min_{\mathbf{V} \in \mathbb{R}^N} \{D[\mathbf{S}(\mathbf{V}), \mathbf{g}] + \tau R(\mathbf{V})\}, \quad (32)$$

式中: $\hat{\mathbf{V}}$ 为散射势的估计值; $D(\cdot): \mathbb{R}^M \times \mathbb{R}^M \rightarrow \mathbb{R}$ 表示度量正向散射模型 $\mathbf{S}(\mathbf{V})$ 与散射测量结果 \mathbf{g} 之间的差异,该项也被称为数据保真项; $R(\cdot): \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}$ 表示利用待测样本的先验知识对求解过程添加特定的约束,该项即为正则化项;标量 $\tau(\tau > 0)$ 为正则化系数,控制着数据保真项与正则化项之间的平衡。在绝大多数情况下,数据保真项都使用 l_2 范数表示,即

$$D[\mathbf{S}(\mathbf{V}), \mathbf{g}] = \sum_{p=1}^P \|\mathbf{S}_p(\mathbf{V}) - \mathbf{g}_p\|_2^2, \quad (33)$$

式中:下标 p 表示第 p 次测量; P 表示总测量次数。

构建优化问题的模型之后,就利用迭代算法使成本函数最小化,最终达到收敛。在优化过程中,通常需要加入一些先验知识使迭代收敛,其中最为基本的就是非负性约束,其依据是样本的折射率与背景介质折射率之差非负^[29]。非负性约束由 Gerchberg-Papoulis(GP)算法率先引入,该约束的实现方法比较简单,并且很容易与其他约束相结合^[64]。Charbonnier 等^[108]认为如果未知目标属于由尖锐边缘分割的分段平滑区域所组成的函数类,

那么约束目标函数的梯度可以在保留尖锐边缘的同时平滑噪声,据此他们提出了一种使用分段光滑约束的半二次非凸正则化方法,并称之为“边缘保持(EP)正则化法”。Delaney 等^[109]将 EP 正则化扩展到了小角度 CT 成像应用中;Sung 等^[58,65]则将其应用到 ODT 的研究中,并提出了一种基于非负性约束和 EP 正则化的 ODT 恢复方案。这种方法能够将式(32)的目标函数表示为

$$\hat{\mathbf{V}} = \|\mathbf{S}(\mathbf{V}) - \mathbf{g}\|_2^2 + \alpha \sum_n \psi(\|\nabla \mathbf{V}\|_2) + \beta \|P(\mathbf{V})\|_2^2, \quad (34)$$

式中: ψ 表示 EP 正则化项的势函数,由样本边缘满足的定义条件确定,其中一个势函数可以定义为 $\psi(t) = \sqrt{t + \epsilon^2}$, ϵ 为一个任意小的数,使得 $t = 0$ 时,导数 $\psi'(t)$ 有定义^[58]; $\nabla \mathbf{V}$ 为离散化散射势的梯度,对其在全空间内取 l_2 范数,由势函数计算并加和就形成了 EP 正则化项; $P(\cdot)$ 代表对角算子,该项保证 \mathbf{V} 非负; α 和 β 分别为 EP 正则化项和非负性约束项的正则化参数。

另外,全变分(TV)正则化是医学成像领域最常用的正则化方法之一,如 MRI 中的压缩感知重建^[110]采用的就是 TV 正则化。TV 正则化法与 EP 正则化法的区别在于 TV 正则化法直接采用目标梯

度函数的 l_1 范数(各向异性 TV)或 l_2 范数(各向同性 TV)作为约束,而非目标梯度函数的势函数。作为一个非常强大的正则化器,TV 正则化能够恢复原始信号,在很大程度上提高重构质量。但它只适用于内部函数近似为分段常数的样本,若将其直接应用于生物微结构的研究,则会导致重建失效^[66]。Pan 团队^[57]将 TV 正则化方法应用于 ODT 算法研究中,采用梯度下降法结合数据一致性步长对有限角度数据进行层析重建。Krauze^[67]在 TV 正则化中应用一种相对简单的方法来生成光滑边缘的有限对象支持,从而减小了由“缺失锥问题”造成的伪影,提高了重建质量。

Lim 等^[64]用肝细胞作为实验对象采用非负性约束、EP 正则化和 TV 正则化这三种正则化方法进行重建,并将正则化后的重建精度与无正则化处理的重建精度进行了对比,对比结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出:在未使用正则化的情况下,重建结果的折射率值被低估;使用三种正则化方法之后,低估的问题有所缓和,但非负性约束仍存在低估和噪声处理不足的问题;TV 正则化可以显著平滑噪声,同时使细胞内部结构的边缘尖锐清晰,但该方法不能正确地重建纹理较多的样本;EP 正则化牺牲了一定的去噪能力,但却进一步锐化了边缘。

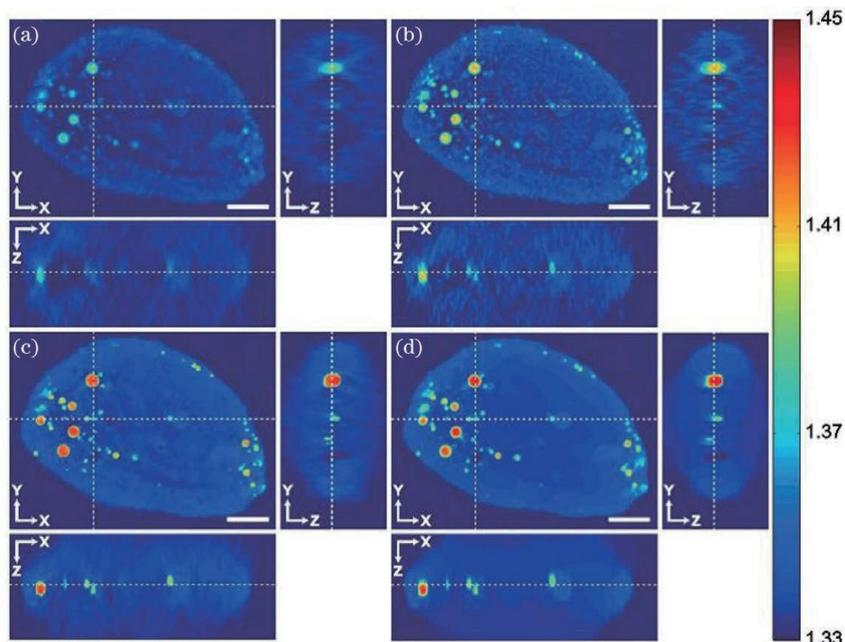


图 5 肝细胞三维折射率分布定量成像结果对比^[64]。(a)直接反演;(b)非负性约束;(c)EP 正则化;(d)TV 正则化
Fig. 5 Comparison of three-dimensional refractive index distribution quantitative imaging results of hepatocyte cells^[64].

(a) Direct inversion; (b) non-negativity constraint; (c) EP regularization; (d) TV regularization

除此之外,Kamilov 等^[59]还将压缩感知理论中的一个重要组成部分——稀疏正则化,引入到了

ODT 的研究中,以解决有限角度测量所固有的稀疏性,期望在少量测量数据下也能实现高精度重建。

该团队同时构建了通用的 ODT 反演框架,将正则化法扩展到了仅强度测量中,允许从仅强度测量中重建多重散射样本^[68]。Li 研究团队^[63]为了避免由相位模糊造成的局部极小值,在 TV 正则化中提出了一种新的相位保真准则。该准则通过在凸优化过程中匹配解包裹后的光学相位延迟,避免了输出场和样本折射率分布之间的非一一对应,从而在冷初始化的情况下实现精确重构。

基于正则化的 ODT 重建算法将反演问题与各种正则化器结合在一起,通过迭代的方式搜索样本的解,因此对于计算的要求很高。由样本大小、计算能力、正则器设计决定的处理时间不等^[72]。除此之外,正则化法也需要对散射模型的特征有所了解,这使得问题变得具有挑战性^[70]。

3.4 机器学习法

近几年,受机器学习成功求解病态反演问题的启发,一些研究人员将机器学习方法引入到 ODT 的研究中,探索利用数据驱动模型来克服目前 ODT 反演算法中遇到的问题^[78]。在机器学习中,通常根据真实基准值的有无将其分为有监督学习、无监督学习和半监督学习。有监督学习的训练过程是将真实基准与模型输出结果进行对比,通过二者的误差对模型进行迭代更新;无监督学习通常没有一个与输入数据相匹配的基准,而是通过输入数据自身对模型的参数进行更新。

在有监督学习下的 ODT 研究中,最为主要的是获取真实的基准值。Psaltis 团队^[76]将机器学习中的神经网络与稀疏正则化相结合,并将其应用在 BPM 中^[75]。该方法将样本建模为一组切片,每个切片表示一层网络,三维样本的每个体素由一个网络节点表示。其中的训练数据由从不同角度获取的全息图组成,而真实的基准值则由 BPM 模型计算得出。神经网络模型通过最小化训练数据和 BPM 计算值之间的差异来预测样本的三维折射率分布,并添加了一个稀疏性约束,以加强解的平滑性^[76]。之后,Qiao 等^[77]利用 l_1 损耗函数和 TV 正则化对其进行了改进。Psaltis 团队^[70]建立了具有多个不同折射率分布的模拟红细胞模型,并将其作为真实基准值;之后使用 DDA 方法对细胞模型进行散射场计算,再对计算出的散射场进行 Rytov 重建,并将重建后的结果输入到一个名为残差 U-net 的深度神经网络中进行训练。采用网络输出结果与模拟细胞模型之间的误差对网络进行更新,从而得到一个输入数据为 Rytov 重建结果、输出数据为改

进重建结果的网络模型。同样,Park 团队^[72]将未经正则化的重建结果作为输入集,将 TV 正则化提高分辨率的重建结果作为基准,对一个卷积神经网络进行训练,得到了两种重建结果之间的转化。之后,他们使用二氧化硅微球进行了验证实验,认为深度学习模型可以去除沿轴向拉长的伪影,并且在三个量化指标(结构相似性、均方误差和 Pearson 相关系数)方面与 TV 正则化方法高度一致,从而在减少正则化附加的计算时间的同时,提高了重建结果的分辨率。值得注意的是,虽然使用训练好的网络模型对重建结果进行分辨率增强不费时,但是在训练网络模型过程中可能要增加计算复杂度。同时可以看出,有监督学习模型通常需要一个基准来训练网络,但目前的研究仍使用幻影模型^[69]或是特定类型的细胞^[70]作为基准来进行模拟和训练,使得其缺乏通用性。

在实际情况下,真实基准值的难以获取使得无监督学习 ODT 展现出了一定优势。其中深度图像先验(DIP)作为一种独立于数据的方法,可以在无监督训练的情况下处理大量反图像重建问题。因此,Zhou 等^[71]将 DIP 引入到 ODT 的研究中,使用 DIP 作为未经训练的深度卷积神经网络来生成重建后的样本。在迭代的重建过程中,DIP 只是对网络的参数进行优化更新,而不是直接更新对象体素。与其他有监督的学习方法相比,该方法不需要任何预先训练或特定数据集的假设,但是该方法每次实验都需要数小时的计算。为了解决缺失锥问题,Park 团队^[74]提出了一个无监督深度学习框架,该框架通过最优运输驱动的 Cycle-GAN 来学习缺失投影视图的概率分布。他们将该深度学习模型与传统方法的运算时间在相同条件下进行了对比,结果表明,深度学习模型 27.33 s 的用时多于 Rytov 重建的 1.37 s 和非负性约束的 14.08 s,但明显少于 TV 正则化的 604.86 s。除此之外,该团队还使用微球和细胞进行了算法的对比实验,实验结果说明该模型在缺失投影角度下的重建分辨率优于 Rytov 重建、非负性约束和 TV 正则化法。

尽管机器学习方法在 ODT 的研究中也有了一些应用,但是也可以看出,这方面的研究比较少,该领域依然处于发展的早期阶段,使用机器学习的方法在测量数据有限的情况下提高 ODT 重建精度仍是一个有前景的研究领域。

4 三维折射率定量成像的实现方法

从以上讨论可以看出,OPT 需要使用多角度下

的相位测量结果进行样本的三维重建,而 ODT 则需要使用多角度散射场的测量结果对样本进行反演重建。二者都需要量化的相位信息作为支撑,但直接使用振幅型探测器件仅能得到光强信息,因此,目前的 OPT 和 ODT 研究都是以定量相位成像技术为基础的。类似于 QPI 分为干涉法和非干涉法^[111],本节将 OPT 和 ODT 中的测量方法也分为干涉法和非干涉法进行说明。

4.1 干涉法

数字全息作为干涉式 QPI 中最为普遍的形式,

也被广泛应用在 OPT 与 ODT 的研究之中。图 6 所示为常用的离轴式数字全息测量系统,该装置基于 Mach-Zehnder 干涉仪设计而成,其中激光光束被偏振分光棱镜(PBS)分为物光和参考光。物光束通过样本后的散射光由物镜收集,然后在像平面上与参考光束干涉形成条纹图,并由相机进行记录。多角度下的测量主要有两种实现方式:样本旋转[如图 6(a)所示]和照明角度旋转[如图 6(b)所示]。这两种情况下的光路配置大体相似,仅在需要改变测量角度的地方略有不同。

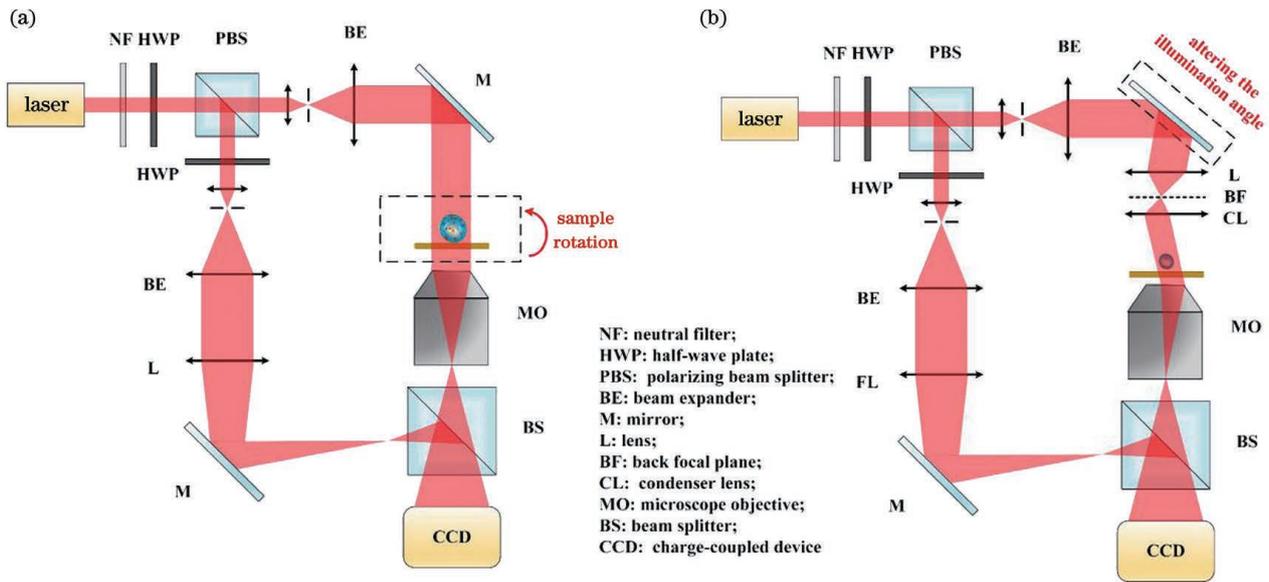


图 6 基于数字全息的 ODT 测量。(a)样本旋转方式;(b)照明角度旋转方式

Fig. 6 ODT measurement based on digital holography. (a) Sample rotation; (b) incident wave rotation

在样本旋转方式的实现方面,Charrière 等^[87]将样本放置在微毛细管中,通过对微管的旋转实现样本的旋转。同样,Fauver 等^[99]也设计了一个基于微毛细管的旋转工作台,由步进电机控制着微管旋转,但额外引入的微管类似于一个圆柱形透镜,会产生杂散光。因此,Charrière 等^[100]随后使用了膜片钳技术,将微管置于折射率匹配液中进行旋转。类似地,Kuš 等^[112]将中空的光纤作为细胞或细胞组的“试管”,再将其放入精确的旋转光纤支架中,在折射率匹配液中进行旋转操作。另外,还有一些研究团队利用细胞在微流体中的翻转现象,通过控制流速的方式对细胞的旋转角度进行控制,从而实现多角度下的测量^[113-115]。除了间接地旋转样本外,还可以对细胞进行直接操控。例如,Habaza 等^[116]使用全息光镊技术,利用多个动态控制的光阱对悬浮液中的单细胞进行了 180° 旋转测量。随后,该团队利用介电泳力,在微流体通道中对细胞进行捕获和旋

转。这种方法允许单个细胞围绕着任一轴旋转 360°,从而可以在整个傅里叶域中填充信息^[117]。

样本旋转方式的优点在于傅里叶域的信息覆盖范围大且对称,为反演重构提供了更多的支撑信息,从而获得了与横向分辨率相同的轴向分辨率^[95]。但是,样本旋转方式也有许多缺点,如:1)样本旋转更容易产生由旋转稳定性引起的误差,即理论旋转角度与实际旋转角度不匹配,这会大大降低最终样本重建的质量^[118];2)要实现样本旋转就需要对样本进行直接或间接的物理操作,有干扰甚至破坏样本的风险;3)样本旋转方式下的数据采集时间较长,这使得很难甚至无法将其应用于动态过程的研究;4)样本旋转方式对于非生物固体来说比较方便,如光纤^[119],而将其应用于生物细胞则需要特殊的制备方式。这些问题会对以生物医学为导向的研究,特别是对活体生物的研究,造成许多麻烦^[48,56]。

在照明角度旋转中,Feld 团队^[88]使用一个安装

在检流计上的倾斜镜,通过改变施加在其上的电压值来机械地倾斜镜面,以改变对样品的照明角度,从而得到了照明角度从 -60° 到 60° 变化的测量结果;之后也有一些团队采用了这种方式^[120-121]。然而,这种技术也有其自身的缺点,如:1)高电压下的电噪声和定位误差引起的位置抖动,使得测量系统存在机械不稳定性^[122];2)扫描镜的机械稳定时间相对较长,对于1 inch(1 inch=2.54 cm)和10%满量程角度变化的扫描镜,稳定时间通常为3 ms,影响了测量时间^[123]。为了克服机械旋转镜的局限性,Kuś等^[124]采用液晶空间光调制器(SLM)来控制照明光束的角度。SLM的优点在于其波前校正功能和高的机械稳定性,但SLM固有的液晶响应慢和高昂的成本也限制了它的应用。因此,Park团队^[122,125]提出了基于数字微镜器件(DMD)的主动照明控制方法,该方法消除了以上SLM的限制。DMD包含

有数百万个独立可切换的微镜,能够以几千赫兹到几万赫兹的速度对入射光束进行强度调制。随后,该团队继续发展了基于DMD的多角度数字全息测量系统,并将其与结构光技术相结合,应用于生物医学研究中^[126-129]。这一基于干涉测量的ODT成像系统的视场为 $2\text{ mm}\times 1.75\text{ mm}\times 0.2\text{ mm}$,空间分辨率为 $170\text{ nm}\times 170\text{ nm}\times 1400\text{ nm}$,其成像结果如图7所示。其中:图7(a)为正常结肠组织切片经H&E染色后的明场图像;图7(b)是对未经染色结肠组织进行ODT成像的结果;图7(c)~(e)分别是胰腺、大肠和小肠的ODT成像结果。虽然DMD的响应速率不再是一个问题,但是DMD中的每个微镜只有开和关两种状态,因此工作时相当于一个振幅型光栅,会产生多个衍射级,导致测量条纹的对比度有限,从而降低了重建精度。Zhou团队^[123]使用两个DMD进行了实验,其中一个用于照明角度的

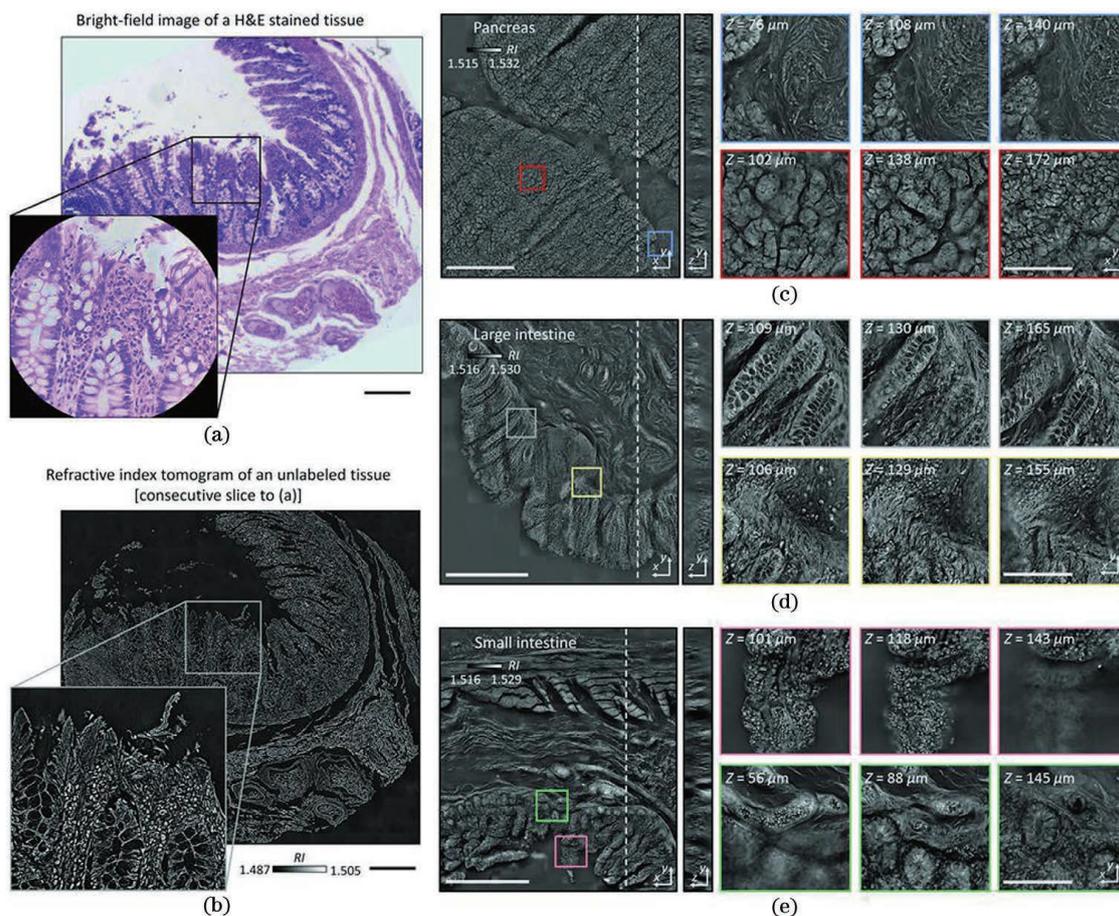


图7 典型的干涉式ODT成像结果^[129]。(a)正常结肠组织H&E染色后的明场图像;(b)未染色结肠组织的ODT成像;(c)~(e)100 μm 厚组织切片的三维折射率定量图像,(c)胰腺,(d)大肠,(e)小肠

Fig. 7 Representative ODT imaging results based on interference measurement^[129]. (a) Bright-field image of a normal colon tissue slice stained with H&E; (b) an unstained colon tissue slice imaged with ODT; (c)~(e) three-dimensional refractive index quantitative images of 100 μm thick tissue slices, (c) pancreas, (d) large intestine, (e) small intestine

控制,而另一个则用来进行空间滤波。通过同步两个 DMD,可以选择任意照明角度下的一阶衍射光束,从而动态地去除衍射噪声。

在测量过程中,旋转照明角度的方式不会干扰样本,但其测量的角度通常是有限的,并且会出现前面提到的缺失锥问题。除此之外,以上提到的都是基于离轴数字全息的方式进行多角度测量的方法,在实际中也存在种种障碍,例如:对测量环境的要求很高,波长级的微小变化都会导致光程差测量不准确;激光光源的相干噪声也会影响成像质量,进而影响最终的重建结果;相位解包裹算法可能无法操作,从而产生严重的伪像,包括相位不连续等。

鉴于同轴数字全息具有较高的抗环境振动能力,Sung 团队^[130]和 Park 团队^[131]采用物光和参考光共光路的方式对散射场进行了多角度测量,分别对 HeLa 细胞和肝细胞进行了折射率分布的三维重建,他们认为同轴方式具有更低的相位波动和更高的分辨率。然而,同轴数字全息通常会牺牲一般性,对样本或入射光引入假设或近似,这可能会导致成像伪影^[132]。

另外,为了避免激光相干噪声造成的影响,部分相干光也成为了一个研究热点。对于部分相干照明的 ODT 而言,可以通过相干门控的方式创造“光学切片”的效果,对不同深度的样本进行选择性的成像^[29]。这主要有两种方法:一种类似于 OCT^[31],使用宽带光源形成时间部分相干照明;另一种是利用动态散斑场^[133]或共聚焦激光扫描^[134]的空间部分相干照明。在干涉成像中,测量的是散射场与参考场的互相关函数,而时间部分相干的宽带光源具有较短的时间相干长度,能够得到较窄的时间互相关函数,其宽度决定了深度的选择性^[29]。Popescu 团队^[79]对弱散射物体和宽带光之间的相互作用进行了理论描述,将 ODT 理论扩展到白光照明和成像,而不局限于散射平面的测量。该团队使用传统的相位对比显微镜与一个干涉模块来测量量化的相位结果,再通过轴向扫描焦平面,得到了一系列相位图像,以此重建样本的轴向尺寸,最终达到了 350 nm 的横向分辨率和 900 nm 的轴向分辨率。这种方法利用时间相关和点扩散函数对测量的复振幅进行反卷积,需要点扩散函数的先验知识。同时,反卷积操作往往耗时且对噪声敏感。随后,该团队提出了一种基于 Wolf 方程的快速成像方法,直接将折射率分布与样品厚度在时空域解耦,而不需要进行傅里叶变换^[135]。同时,该团队也将同轴和白光方法结

合起来构成了一个测量系统,该系统具有纳米路径的长度稳定性、无散斑以及可以达到衍射极限分辨率的优点,并且能够对“厚”样本进行切片成像^[136]。Park 团队^[137]提出了一种基于 Mach-Zehnder 干涉仪的通用离轴角度扫描部分相干 ODT 技术,但大视场上的干涉条件很难维持,因此该团队随后使用铁电液晶空间光调制器来保持大视场的相干性^[138]。

4.2 非干涉法

干涉法是一种精确的相位测量方法,但是它往往会使测量装置复杂化,从而在一定程度上限制了它的应用。因此,使用更简单的层析成像装置实现相同的性能受到了研究人员的关注。但不采用干涉的方式,测量过程中只有强度信息被记录下来。类似于 QPI 中的非干涉法从强度图像中恢复相位,ODT 中的非干涉法需要从强度图像中恢复出样本的三维结构,这类方法主要包括两种:一种类似于光强传输方程,从多幅离焦图像中恢复;另一种类似于傅里叶叠层成像,从不同角度 LED 照明的图像中恢复。

第一种方法可以看作是光强传输方程这一非干涉式 QPI 的三维扩展,就是将二维平面上的强度传输转化为三维体上的强度传输,以此来实现衍射层析成像^[27]。早在 30 多年前,Streibl^[139]就在傍轴 Born 近似下,得到了宽场透射显微镜相位和吸收光学传递函数的表达式,但直到最近才有了具体应用。Jenkins 等^[140]提出了一种层析反卷积相位显微镜的方法,该方法类似于三维荧光反卷积显微镜中焦外模糊被去除的方法。该方法将离焦反卷积与物体旋转相结合,采集离焦序列图像后基于线性化模型进行三维反卷积来恢复样本的折射率。由于该方法采用部分相干照明,因此与商业显微镜相兼容,大大降低了预期成本。Waller 团队^[141]利用 Born 一级近似和弱目标近似,建立了线性三维差分相位对比模型;该模型的部分相干传递函数将样品的复折射率分布与不同离焦时的强度测量联系起来,可以用于样本折射率实部和虚部的三维恢复。Soto 等^[142-144]通过高速聚焦的电可调透镜进行轴向扫描,采用一种用于非傍轴部分相干光学显微镜的直接反卷积方法重建了样本的三维折射率分布。Lasser 团队^[145]基于三维部分相干成像理论解释了白光深度分辨相位成像,并通过一个定制的棱镜同时采集 8 个平面的强度图像,从中恢复出了三维相位信息,得到了 350 nm 和 560 nm 的横向和轴向分辨率。除此之外,该测量装置也可以与超分辨显微镜相结合,达到超分辨的成像效果。

另一类非干涉式 ODT 可以看作是傅里叶叠层成像原理在三维上的扩展^[146-147]。傅里叶叠层成像的概念由 Zheng 等^[148]于 2013 年提出;该方法使用 LED 阵列对“薄”样本进行不同角度的照明,然后在傅里叶平面上进行信息的拼接,从而可以得到高分辨率的样本图像,并可以恢复出丢失的相位信息。傅里叶叠层成像中 LED 阵列的多角度照明恰好适应了 ODT 要求的多角度测量,因此一些研究团队对基于 LED 阵列照明的 ODT 重构方法进行了研究。Waller 团队^[81]基于 BPM 方法迭代更新每个 LED 光照角度下的三维复透射率函数,实现了非线性的三维反卷积,消除了平面外模糊。Sentenac 团队^[149]提出了一种能够基于不同入射角下的强度图

像重建样本复折射率的通用反演方案,并从横向分辨率、三维重建(反射和透射)、对比度检测和多重散射等 4 个方面研究了仅强度 ODT 的性能,他们认为仅强度 ODT 表现出了与基于场的 ODT 相同的分辨率和对比度增益。Zuo 等^[82]建立了一个 LED 多角度照明下的正向成像模型,对亮场和暗场下测得的散射场进行了描述,并结合一级 Born 近似和一级 Rytov 近似,使用仅强度测量图像拼接得到了待测物体的三维频谱;待算法收敛后进行傅里叶逆变换,实现了视场为 $1.33 \text{ mm} \times 1.33 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm}$ 、横向分辨率为 390 nm 、轴向分辨率为 899 nm 的三维折射率定量成像。该成像模型对 HeLa 细胞的成像结果如图 8 所示。

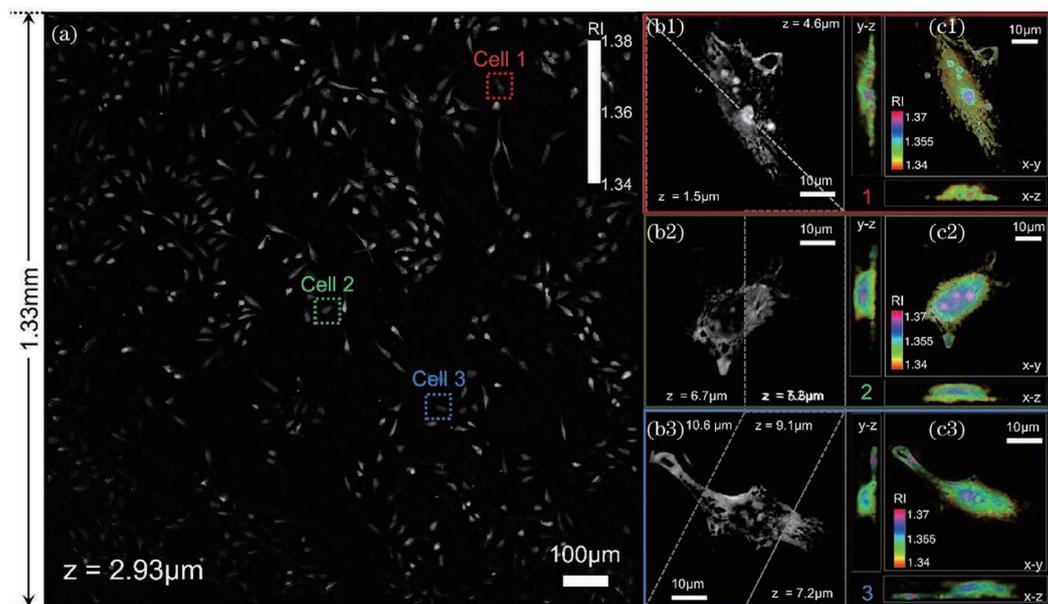


图 8 典型的非干涉式 ODT 成像结果^[82]。(a) HeLa 细胞在 $z = 2.93 \mu\text{m}$ 处的折射率定量图像;(b1)~(b3) 三个 HeLa 细胞在不同深度处的结果;(c1)~(c3) 三个 HeLa 细胞渲染后的结果

Fig. 8 Representative ODT imaging results based on non-interference measurement^[82]. (a) Quantitative refractive index image of HeLa cells at $z = 2.93 \mu\text{m}$; (b1)–(b3) results of three HeLa cells at different depths; (c1)–(c3) rendered results of three HeLa cells

5 结束语

以折射率作为生物样本内源性“标记物”,对其进行三维定量成像的研究得到了越来越多的关注。在光线通过生物样本的假设下,OPT 使用多角度测量的定量相位结果对样本的三维折射率分布进行定量重建。这种方法在早期的三维定量成像中被普遍使用,但是它忽略了衍射效应,因此重建精度不高,目前仅被用于一些需要快速计算的场合。取而代之的是基于波动方程的 ODT 方法,该方法通过求解散射反演问题,从散射场中获得待测物的折射

率分布。经典的 ODT 方法以干涉的方式测量散射场的振幅与相位,根据多角度测量的散射场进行折射率三维重建,其中所涉及的多角度测量往往通过样本旋转或者照明光束旋转的方式实现。在样本旋转方式下,散射场测量结果在频域上的信息覆盖范围大且对称,但是这种方式会对样本产生干扰,且旋转的稳定性较差;而照明光束旋转方式虽然规避了旋转样本的复杂操作与旋转角度误差,但其测量角度有限,并且存在固有的缺失锥问题。除此之外,经典 ODT 中的 Born 一级近似和 Rytov 一级近似都是基于“弱”散射假设,以此得到的线性反演模型在

多重散射样本中不适用。针对 ODT 反演过程中遇到的多重散射、有限角度测量以及有限孔径等问题,研究人员建立了非线性的反演模型,并结合正则化法进行了研究。近些年,在其他研究领域大放异彩的机器学习方法也被引入到 ODT 研究中,用于解决上述问题中的一些方面。另外,随着近些年部分相干理论的发展,基于部分相干光照明的 ODT 原理也逐渐建立,使用部分相干干涉和非干涉法测量的 ODT 研究呈现出了逐年上升的趋势。

综上所述,目前对无标记生物样本三维折射率分布进行定量成像已经有了一些研究,但该类研究尚处于初级阶段,具体表现为:1)需要结合部分相干照明理论建立更为准确的散射测量模型,从理论层面提高成像分辨率;2)尚需克服稀疏数据的限制,研究更为有效的折射率三维重建反演算法,并在重建精度以及计算速度等方面进行提高;3)细胞内部折射率对于化学物质或蛋白质分子来说是非特异性的,可以结合荧光标记的方法,在细胞生物学和疾病诊断中对细胞折射率进行更深入的分析。

以上三方面集中在科学问题的解决上。至于应用层面,人们在研究各种光学成像技术时,期望的目标之一就是将其转化到临床,因此该研究需要进一步实现实用化、器件化以及临床化。除此之外,可以将其应用进一步扩展至其他领域,如水环境监测、食品安全监测、材料表征、病毒学和单分子分析等。

参 考 文 献

- [1] Stubbington M J T, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, et al. Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease[J]. *Science*, 2017, 358(6359): 58-63.
- [2] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting [J]. *Cell*, 2018, 175(1): 266-276.
- [3] Fu L, Luo Q M. Progress and prospect of biomedical optical imaging [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2020, 50(11): 1222-1236.
付玲, 骆清铭. 生物医学光学成像的进展与展望 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50(11): 1222-1236.
- [4] Tuchin V V. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*[M]. 3rd ed. Bellingham: SPIE, 2015.
- [5] Lichtman J W, Conchello J A. Fluorescence microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 910-919.
- [6] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy [J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [7] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [8] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [9] Lord S J, Conley N R, Lee H L D, et al. A photoactivatable push-pull fluorophore for single-molecule imaging in live cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(29): 9204-9205.
- [10] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [12] Schnell U, Dijk F, Sjollem K A, et al. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 152-158.
- [13] Devaney A J. *Mathematical foundations of imaging, tomography and wavefield inversion*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- [14] Liu P Y, Chin L K, Ser W, et al. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(4): 634-644.
- [15] Bateman J B, Wagman J, Carstensen E L. Refraction and absorption of light in bacterial suspensions [J]. *Kolloid-Zeitschrift Und Zeitschrift Für Polymere*, 1966, 208(1): 44-58.
- [16] Song W Z, Zhang X M, Liu A Q, et al. Refractive index measurement of single living cells using on-chip Fabry-Pérot cavity [J]. *Applied Physics Letters*, 2006, 89(20): 203901.
- [17] Flynn R A, Shao B, Chachisvilis M, et al. Two-beam optical traps: refractive index and size measurements of microscale objects [J]. *Biomedical Microdevices*, 2005, 7(2): 93-97.
- [18] Briers D, Duncan D D, Hirst E R, et al. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18: 066018.

- [19] He H H, Liao R, Zeng N, et al. Mueller matrix polarimetry: an emerging new tool for characterizing the microstructural feature of complex biological specimen [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2019, 37(11): 2534-2548.
- [20] Gao R J, Wang C H, Ning J X, et al. Polarization microscopy imaging of biological cells based on Mueller matrix [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811023.
高瑞娟, 王春华, 宁金星, 等. 基于 Mueller 矩阵的生物细胞偏振显微成像 [J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811023.
- [21] Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1368-1370.
- [22] Park Y, Depeursinge C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine [J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(10): 578-589.
- [23] Zhang L, Zhao C H, Kang S B, et al. Progress on methods of quantitative phase measurement and retrieval for biological cells [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207009.
张璐, 赵春晖, 康森柏, 等. 生物细胞定量相位测量与恢复方法研究进展 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207009.
- [24] Wang Z, Millet L, Mir M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [25] Bhaduri B, Pham H, Mir M, et al. Diffraction phase microscopy with white light [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(6): 1094-1096.
- [26] Fienup J R. Phase retrieval algorithms: a personal tour [J]. *Applied Optics*, 2012, 52(1): 45-56.
- [27] Zuo C, Li J J, Sun J S, et al. Transport of intensity equation: a tutorial [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 135: 106187.
- [28] Zheng G A, Shen C, Jiang S W, et al. Concept, implementations and applications of Fourier ptychography [J]. *Nature Reviews Physics*, 2021, 3(3): 207-223.
- [29] Jin D, Zhou R J, Yaqoob Z, et al. Tomographic phase microscopy: principles and applications in bioimaging [J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2017, 34(5): B64-B77.
- [30] Claxton N S, Fellers T J, Davidson M W. Laser scanning confocal microscopy [J]. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 2006, 21(1): 1-37.
- [31] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography [J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [32] Tomlins P H, Wang R K. Theory, developments and applications of optical coherence tomography [J]. *Journal of Physics D*, 2005, 38(15): 2519-2535.
- [33] Fujimoto J, Swanson E. The development, commercialization, and impact of optical coherence tomography [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(9): OCT1-OCT13.
- [34] Lu D X, Fang W H, Li Y Y, et al. Optical coherence tomography: principles and recent developments [J]. *Chinese Optics*, 2020, 13(5): 919-935.
陆冬筱, 房文汇, 李玉瑶, 等. 光学相干层析成像技术原理及研究进展 [J]. *中国光学*, 2020, 13(5): 919-935.
- [35] Kak A C, Slaney M. Principles of computerized tomographic imaging [M]. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001.
- [36] Sharpe J. Optical projection tomography [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, 6: 209-228.
- [37] Müller P, Schürmann M, Guck J. ODTbrain: a Python library for full-view, dense diffraction tomography [J]. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16: 367.
- [38] Balasubramani V, Kuś A, Tu H Y, et al. Holographic tomography: techniques and biomedical applications [J]. *Applied Optics*, 2021, 60(10): B65-B80.
- [39] Chaumet P C, Belkebir K. Three-dimensional reconstruction from real data using a conjugate gradient-coupled dipole method [J]. *Inverse Problems*, 2009, 25(2): 024003.
- [40] Abubakar A, Habashy T M, Pan G D, et al. Application of the multiplicative regularized Gauss-Newton algorithm for three-dimensional microwave imaging [J]. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 2012, 60(5): 2431-2441.
- [41] Colton D, Kress R. Inverse acoustic and electromagnetic scattering theory [M]. Heidelberg: Springer, 1998.
- [42] Wolf E. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data [J]. *Optics Communications*, 1969, 1(4): 153-156.
- [43] Devaney A J. Inverse-scattering theory within the Rytov approximation [J]. *Optics Letters*, 1981, 6(8): 374-376.
- [44] van Roey J, van der Donk J, Lagasse P E. Beam-propagation method: analysis and assessment [J].

- Journal of the Optical Society of America, 1981, 71 (7): 803-810.
- [45] Draine B T, Flatau P J. Discrete-dipole approximation for scattering calculations [J]. Journal of the Optical Society of America A, 1994, 11(4): 1491-1499.
- [46] Girard J, Maire G, Giovannini H, et al. Nanometric resolution using far-field optical tomographic microscopy in the multiple scattering regime [J]. Physical Review A, 2010, 82(6): 061801.
- [47] Pan S, Kak A. A computational study of reconstruction algorithms for diffraction tomography: interpolation versus filtered-backpropagation [J]. IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing, 1983, 31(5): 1262-1275.
- [48] Kostencka J, Kozacki T. Space-domain, filtered backpropagation algorithm for tomographic configuration with scanning of illumination [J]. Proceedings of SPIE, 2016, 9890: 9890F.
- [49] Devaney A J. A filtered backpropagation algorithm for diffraction tomography [J]. Ultrasonic Imaging, 1982, 4(4): 336-350.
- [50] Paladhi P R, Sinha A, Tayebi A, et al. Improved backpropagation algorithms by exploiting data redundancy in limited-angle diffraction tomography [J]. Progress in Electromagnetics Research B, 2016, 66: 1-13.
- [51] Kostencka J, Kozacki T. Computational and experimental study on accuracy of off-axis reconstructions in optical diffraction tomography [J]. Optical Engineering, 2015, 54: 024107.
- [52] Paladhi P R, Sinha A, Tayebi A, et al. Class of backpropagation techniques for limited-angle reconstruction in microwave tomography [C]. AIP Conference Proceedings, 2015, 1650: 509-518.
- [53] Vouldis A T, Kechribaris C N, Maniatis T A, et al. Three-dimensional diffraction tomography using filtered backpropagation and multiple illumination planes [J]. IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, 2006, 55 (6): 1975-1984.
- [54] Wedberg T C, Stamnes J J, Singer W. Comparison of the filtered backpropagation and the filtered backprojection algorithms for quantitative tomography [J]. Applied Optics, 1995, 34 (28): 6575-6581.
- [55] Kostencka J, Kozacki T, Kuś A, et al. Accurate approach to capillary-supported optical diffraction tomography [J]. Optics Express, 2015, 23 (6): 7908-7923.
- [56] Dardikman G, Shaked N T. Review on methods of solving the refractive index-thickness coupling problem in digital holographic microscopy of biological cells [J]. Optics Communications, 2018, 422: 8-16.
- [57] LaRoque S J, Sidky E Y, Pan X C. Accurate image reconstruction from few-view and limited-angle data in diffraction tomography [J]. Journal of the Optical Society of America A, 2008, 25(7): 1772-1782.
- [58] Sung Y, Dasari R R. Deterministic regularization of three-dimensional optical diffraction tomography [J]. Journal of the Optical Society of America A, 2011, 28(8): 1554-1561.
- [59] Kamilov U S, Papadopoulos I N, Shoreh M H, et al. Optical tomographic image reconstruction based on beam propagation and sparse regularization [J]. IEEE Transactions on Computational Imaging, 2016, 2(1): 59-70.
- [60] Liu H Y, Liu D H, Mansour H, et al. SEAGLE: sparsity-driven image reconstruction under multiple scattering [J]. IEEE Transactions on Computational Imaging, 2018, 4(1): 73-86.
- [61] Soubies E, Pham T A, Unser M. Efficient inversion of multiple-scattering model for optical diffraction tomography [J]. Optics Express, 2017, 25(18): 21786-21800.
- [62] Mudry E, Chaumet P C, Belkebir K, et al. Electromagnetic wave imaging of three-dimensional targets using a hybrid iterative inversion method [J]. Inverse Problems, 2012, 28(6): 065007.
- [63] Smith-Dryden S, Fan S L, Saleh B E A, et al. Optical diffraction tomography by use of optimization and phase-based fidelity criterion [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2021, 27(4): 6800709.
- [64] Lim J, Lee K, Jin K H, et al. Comparative study of iterative reconstruction algorithms for missing cone problems in optical diffraction tomography [J]. Optics Express, 2015, 23(13): 16933-16948.
- [65] 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.
- [66] Krauze W, Makowski P, Kujawińska M, et al. Generalized total variation iterative constraint strategy in limited angle optical diffraction tomography [J]. Optics Express, 2016, 24 (5): 4924-4936.
- [67] Krauze W. Optical diffraction tomography with finite object support for the minimization of missing cone artifacts [J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(4): 1919-1926.

- [68] Pham T A, Soubies E, Goy A, et al. Versatile reconstruction framework for diffraction tomography with intensity measurements and multiple scattering [J]. *Optics Express*, 2018, 26(3): 2749-2763.
- [69] Nguyen T, Bui V, Nehmetallah G. 3D optical diffraction tomography using deep learning [C] // *Imaging and Applied Optics 2018*, June 25-28, 2018, Orlando, Florida. Washington, D.C.: OSA, 2018: DW2F.4.
- [70] Lim J, Ayoub A B, Psaltis D. Three-dimensional tomography of red blood cells using deep learning [J]. *Advanced Photonics*, 2020, 2: 026001.
- [71] Zhou K C, Horstmeyer R. Diffraction tomography with a deep image prior [J]. *Optics Express*, 2020, 28(9): 12872-12896.
- [72] Ryu D H, Ryu D, Baek Y S, et al. DeepRegularizer: rapid resolution enhancement of tomographic imaging using deep learning [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2021, 40(5): 1508-1518.
- [73] Dong D S, Shi K B. Solving the missing cone problem by deep learning [J]. *Advanced Photonics*, 2020, 2: 020501.
- [74] Chung H, Huh J, Kim G, et al. Missing cone artifact removal in ODT using unsupervised deep learning in the projection domain [J]. *IEEE Transactions on Computational Imaging*, 2021, 7: 747-758.
- [75] Waller L, Tian L. Machine learning for 3D microscopy [J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 416-417.
- [76] Kamilov U S, Papadopoulos I N, Shoreh M H, et al. Learning approach to optical tomography [J]. *Optica*, 2015, 2(6): 517-522.
- [77] Qiao H, Wu J M, Li X X, et al. GPU-based deep convolutional neural network for tomographic phase microscopy with ℓ_1 fitting and regularization [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23: 066003.
- [78] Di J L, Tang J, Wu J, et al. Research progress in the applications of convolutional neural networks in optical information processing [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(16): 1600001. 邸江磊, 唐隼, 吴计, 等. 卷积神经网络在光学信息处理中的应用研究进展 [J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(16): 1600001.
- [79] Kim T, Zhou R J, Mir M, et al. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells [J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(3): 256-263.
- [80] Lee K R, Shin S, Yaqoob Z, et al. Low-coherent optical diffraction tomography by angle-scanning illumination [J]. *Proceedings of SPIE*, 2019, 10887: 108870A.
- [81] Tian L, Waller L. 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope [J]. *Optica*, 2015, 2(2): 104-111.
- [82] Zuo C, Sun J S, Li J J, et al. Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 128: 106003.
- [83] Koo S E, Jang S, Park Y, et al. Reconstructed three-dimensional images and parameters of individual erythrocytes using optical diffraction tomography microscopy [J]. *Annals of Laboratory Medicine*, 2019, 39(2): 223-226.
- [84] Lee M, Lee Y H, Song J, et al. Deep-learning based three-dimensional label-free tracking and analysis of immunological synapses of chimeric antigen receptor T cells [J]. *eLife*, 2020, 9(1): e49023.
- [85] Tougan T, Edula J R, Takashima E, et al. Molecular camouflage of plasmodium falciparum merozoites by binding of host vitronectin to P47 fragment of SERA5 [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 5052.
- [86] Horstmeyer R, Chung J, Ou X Z, et al. Diffraction tomography with Fourier ptychography [J]. *Optica*, 2016, 3(8): 827-835.
- [87] Charrière F, Marian A, Montfort F, et al. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 178-180.
- [88] Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, et al. Tomographic phase microscopy [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(9): 717-719.
- [89] Lippmann B A, Schwinger J. Variational principles for scattering processes: I [J]. *Physical Review*, 1950, 79(3): 469-480.
- [90] Born M, Wolf E. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light [M]. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- [91] Debailleul M, Simon B, Georges V, et al. Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples [J]. *Measurement Science and Technology*, 2008, 19(7): 074009.
- [92] Popescu G. Quantitative phase imaging of cells and tissues [M]. New York: McGraw-Hill, 2011.
- [93] Zhou R J, Kim T, Goddard L L, et al. Inverse scattering solutions using low-coherence light [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4494-4497.
- [94] Jiang G, Jing W, Cheng B B, et al. Relationship

- between radar imaging and diffraction tomography [J]. *Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 2018, 37(4): 486-492, 500.
- 江舸, 经文, 成彬彬, 等. 雷达成像和衍射层析的内在联系梳理 [J]. *红外与毫米波学报*, 2018, 37(4): 486-492, 500.
- [95] Rangayyan R, Dhawan A P, Gordon R. Algorithms for limited-view computed tomography: an annotated bibliography and a challenge [J]. *Applied Optics*, 1985, 24(23): 4000-4012.
- [96] Weerasinghe C, Yan H. An improved algorithm for rotational motion artifact suppression in MRI [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 1998, 17(2): 310-317.
- [97] 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.
- [98] Vertu S, Yamada I, Delaunay J J, et al. Tomographic observation of transparent objects under coherent illumination and reconstruction by filtered backprojection and Fourier diffraction theorem [J]. *Proceedings of SPIE*, 2008, 6861: 686103.
- [99] Fauver M, Seibel E, Rahn J R, et al. Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography [J]. *Optics Express*, 2005, 13(11): 4210-4223.
- [100] Charrière F, Pavillon N, Colomb T, et al. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba [J]. *Optics Express*, 2006, 14(16): 7005-7013.
- [101] Tam K C, Perez-Mendez V. Tomographical imaging with limited-angle input [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1981, 71(5): 582-592.
- [102] van den Berg P M, van Broekhoven A L, Abubakar A. Extended contrast source inversion [J]. *Inverse Problems*, 1999, 15(5): 1325-1344.
- [103] Abubakar A, van den Berg P M. The contrast source inversion method for location and shape reconstructions [J]. *Inverse Problems*, 2002, 18(2): 495-510.
- [104] Belkebir K, Chaumet P C, Sentenac A. Superresolution in total internal reflection tomography [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2005, 22(9): 1889-1897.
- [105] Kamilov U S, Liu D H, Mansour H, et al. A recursive born approach to nonlinear inverse scattering [J]. *IEEE Signal Processing Letters*, 2016, 23(8): 1052-1056.
- [106] Zhang T, Godavarthi C, Chaumet P C, et al. Far-field diffraction microscopy at $\lambda/10$ resolution [J]. *Optica*, 2016, 3(6): 609-612.
- [107] Soubies E, Soulez F, McCann M T, et al. Pocket guide to solve inverse problems with GlobalBioIm [J]. *Inverse Problems*, 2019, 35(10): 104006.
- [108] Charbonnier P, Blanc-Feraud L, Aubert G, et al. Deterministic edge-preserving regularization in computed imaging [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1997, 6(2): 298-311.
- [109] Delaney A H, Bresler Y. Globally convergent edge-preserving regularized reconstruction: an application to limited-angle tomography [J]. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 1998, 7(2): 204-221.
- [110] Lustig M, Donoho D, Pauly J M. Sparse MRI: the application of compressed sensing for rapid MR imaging [J]. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2007, 58(6): 1182-1195.
- [111] Cacace T, Bianco V, Ferraro P. Quantitative phase imaging trends in biomedical applications [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2020, 135: 106188.
- [112] Kuś A, Dudek M, Kemper B, et al. Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19: 046009.
- [113] Sung Y, Lue N, Hamza B, et al. Three-dimensional holographic refractive-index measurement of continuously flowing cells in a microfluidic channel [J]. *Physical Review Applied*, 2014, 1: 014002.
- [114] Merola F, Memmolo P, Miccio L, et al. Tomographic flow cytometry by digital holography [J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(4): e16241.
- [115] Funamizu H, Aizu Y. Three-dimensional quantitative phase imaging of blood coagulation structures by optical projection tomography in flow cytometry using digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 24: 031012.
- [116] 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.
- [117] Habaza M, Kirschbaum M, Guernth-Marschner C, et al. Rapid 3D refractive-index imaging of live cells in suspension without labeling using dielectrophoretic cell rotation [J]. *Advanced Science*, 2016, 4(2): 1600205.
- [118] Belashov A V, Petrov N V, Semenova I V. Accuracy of image-plane holographic tomography with filtered backprojection: random and systematic

- errors[J]. *Applied Optics*, 2016, 55(1): 81-88.
- [119] Gorski W, Osten W. Tomographic imaging of photonic crystal fibers[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(14): 1977-1979.
- [120] Su J W, Hsu W C, Chou C Y, et al. Digital holographic microtomography for high-resolution refractive index mapping of live cells[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(5): 416-424.
- [121] Kuś A, Krauze W, Kujawińska M. Focus-tunable lens in limited-angle holographic tomography [J]. *Proceedings of SPIE*, 2017, 10070: 1007009.
- [122] Shin S, Kim K, Yoon J, et al. Active illumination using a digital micromirror device for quantitative phase imaging[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(22): 5407-5410.
- [123] Jin D, Zhou R J, Yaqoob Z, et al. Dynamic spatial filtering using a digital micromirror device for high-speed optical diffraction tomography [J]. *Optics Express*, 2018, 26(1): 428-437.
- [124] Kuś A, Krauze W, Kujawińska M. Limited-angle holographic tomography with optically controlled projection generation [J]. *Proceedings of SPIE*, 2015, 9330: 933007.
- [125] Shin S, Kim K, Kim T, et al. Optical diffraction tomography using a digital micromirror device for stable measurements of 4D refractive index tomography of cells [J]. *Proceedings of SPIE*, 2016, 9718: 971814.
- [126] Shin S, Kim D, Kim K, et al. Super-resolution three-dimensional fluorescence and optical diffraction tomography of live cells using structured illumination generated by a digital micromirror device[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 9183.
- [127] Lee C, Kim S, Hugonnet H, et al. Label-free three-dimensional observations and quantitative characterisation of on-chip vasculogenesis using optical diffraction tomography[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(3): 494-501.
- [128] Oh J, Ryu J S, Lee M, et al. Three-dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(3): 1257-1267.
- [129] Hugonnet H, Kim Y W, Lee M, et al. Multiscale label-free volumetric holographic histopathology of thick-tissue slides with subcellular resolution [J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3: 026004.
- [130] Hsu W C, Su J W, Tseng T Y, et al. Tomographic diffractive microscopy of living cells based on a common-path configuration [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(7): 2210-2213.
- [131] Kim Y, Shim H, Kim K, et al. Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells[J]. *Optics Express*, 2014, 22(9): 10398-10407.
- [132] Nguyen T H, Edwards C, Goddard L L, et al. Quantitative phase imaging with partially coherent illumination [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(19): 5511-5514.
- [133] Somekh M G, See C W, Goh J. Wide field amplitude and phase confocal microscope with speckle illumination [J]. *Optics Communications*, 2000, 174(1/2/3/4): 75-80.
- [134] Redding B, Bromberg Y, Choma M A, et al. Full-field interferometric confocal microscopy using a VCSEL array[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4446-4449.
- [135] Chen X, Kandel M E, Hu C F, et al. Wolf phase tomography (WPT) of transparent structures using partially coherent illumination[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 142.
- [136] Nguyen T H, Kandel M E, Rubessa M, et al. Gradient light interference microscopy for 3D imaging of unlabeled specimens[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 210.
- [137] Lee K, Shin S, Yaqoob Z, et al. Low-coherent optical diffraction tomography by angle-scanning illumination [J]. *Proceedings of SPIE*, 2019, 10887: 108870A.
- [138] Park C, Lee K, Baek Y, et al. Low-coherence optical diffraction tomography using a ferroelectric liquid crystal spatial light modulator [J]. *Optics Express*, 2020, 28(26): 39649-39659.
- [139] Streibl N. Three-dimensional imaging by a microscope[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1985, 2(2): 121-127.
- [140] Jenkins M H, Gaylord T K. Three-dimensional quantitative phase imaging via tomographic deconvolution phase microscopy[J]. *Applied Optics*, 2015, 54(31): 9213-9227.
- [141] Chen M, Tian L, Waller L. 3D differential phase contrast microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(10): 3940-3950.
- [142] Soto J M, Rodrigo J A, Alieva T. Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy [J]. *Optics Express*, 2017, 25(14): 15699-15712.
- [143] Rodrigo J A, Soto J M, Alieva T. Fast label-free microscopy technique for 3D dynamic quantitative imaging of living cells [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(12): 5507-5517.

- [144] Soto J M, Mas A, Rodrigo J A, et al. Label-free bioanalysis of *Leishmania infantum* using refractive index tomography with partially coherent illumination[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(9): e201900030.
- [145] Descloux A, Grubmayer K S, Bostan E, et al. Combined multi-plane phase retrieval and super-resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(3): 165-172.
- [146] Park J, Brady D J, Zheng G A, et al. Review of bio-optical imaging systems with a high space-bandwidth product[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3: 044001.
- [147] Zhang S H, Zhou G C, Cui B Q, et al. Review of Fourier ptychographic microscopy: models, algorithms, and systems[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(14): 1400001.
张韶辉, 周国城, 崔柏岐, 等. 傅里叶叠层显微成像模型、算法及系统研究综述[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(14): 1400001.
- [148] Zheng G A, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739-745.
- [149] Unger K D, Chaumet P C, Maire G, et al. Versatile inversion tool for phaseless optical diffraction tomography[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2019, 36(11): C1-C8.

Progress of Three-Dimensional, Label-Free Quantitative Imaging of Refractive Index in Biological Samples

Yang Zewen¹, Zhang Lu^{1*}, Lü Ning¹, Wang Huijun¹, Zhang Zhenxi², Yuan Li³

¹ State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

² Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

³ Clinical Lab, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract

Significance Optical microscopic imaging is vital for observing and studying biological cells and tissues. Fluorescent probes and other chemical reagents are commonly used for exogenous labeling of cells in clinical diagnosis and biomedical research because biological samples absorb little visible light, making them colorless and translucent. Although these labeling methods can improve imaging contrast and specificity, phototoxicity destroys samples to some extent and photobleaching affects long-term observation. Furthermore, many subcellular structures, such as lipids, are extremely difficult to label, which limits labeling methods' applications. Hence, optical imaging methods for label-free samples are considered to be an important research field for simplifying the time-consuming sample preparation process and for reducing biological interference from fluorescent reagents on samples to meet clinical requirements. The interaction of light and samples can become a promising solution using an optical microscopic imaging method to obtain morphological and biological features of label-free samples. Considering light as electromagnetic waves, biological samples can be characterized by their complex refractive index. The quantitative measurement of the refractive index has experienced a long period of development as an endogenous "label" of biological samples, which includes: a) the average refractive index of a cell population suspended in a medium; b) the effective refractive index of a single cell; c) the two-dimensional (2D) refractive index mapping imaging of a single cell; and d) the three-dimensional (3D) refractive index distribution imaging of a single cell. Among them, a) and b) are not involved in the imaging process, and only one refractive index value is measured to represent a cell population or a single cell, which can provide very limited information. As a result, researchers are interested in label-free 2D imaging and 3D imaging based on a sample's refractive index. For label-free "thin" biological samples, quantitative phase imaging (QPI) is a powerful quantitative imaging method. Currently, QPI's ability to analyze the interior information of samples can reach the diffraction limit at lateral resolution. However, because the phase results are the integral of the samples' refractive index along the light propagation direction, the 3D refractive index distribution of the samples cannot be obtained.

Researchers have set label-free 3D imaging of biological samples as their next goal to obtain more accurate morphological information, such as nuclear shape, dry mass, and nucleo-cytoplasmic ratio. In recent years, optical projection tomography (OPT) has pioneered the study of morphological feature reconstruction aiming at the 3D quantitative imaging of refractive index. However, OPT does not consider the diffraction effect, resulting in its inaccuracy. To solve this problem, based on the solution of inverse scattering, optical diffraction tomography (ODT) was developed that has shown great potential in 3D imaging of label-free biological samples. Although many corresponding advances have been made in the 3D quantitative imaging of refractive index, there are still a series of challenges in the area of improving the feasibility and performance. To rationally guide the successive development in this field, it is necessary to give a summary of existing research.

Progress This study introduces research on the 3D quantitative imaging of refractive index in label-free biological samples. In Section 2, the forward measurement model from OPT to ODT is detailed. The Fourier-slice theorem in OPT (Fig. 1) is derived using the approximation of straight-line propagation of light, which relates the phase results of QPI to the refractive index of samples. After considering the diffraction effect, based on the Helmholtz equation, the Born approximation and Rytov approximation are used to obtain the Fourier diffraction theorem in ODT (Fig. 3), which relates the scattering field to the refractive index of samples. The following inversion algorithms are guided by the two approximations. In Section 3, the inversion algorithms of 3D refractive index quantitative imaging are divided into four categories according to the progression of development. The first is a direct inversion (Fig. 4), which obtains the 3D refractive index distribution of samples from phase or scattering field data at different angles using the Fourier-slice theorem or the Fourier diffraction theorem directly. The filtering methods (filtering back-projection method in OPT and filtering backpropagation method in ODT) then transfer the filling of measurement information from the Fourier domain to the spatial domain to reduce the influence of interpolation artifacts. Subsequently, regularization and machine learning approaches from the optimization area are brought into ODT to overcome the approximation of “weak” scattered and “thin” samples, and obtain the refractive index of multiple-scattering samples from sparse data. Section 4 summarizes the implementation methods of 3D refractive index quantitative imaging. The measurement based on the digital holographic is first explained and then the implementation methods of the sample rotation mode and incident wave rotation mode are introduced (Fig. 6). The ODT based on partially coherent light and non-interference is then introduced. Section 5 summarizes the previous sections and puts forward the prospect of future research work.

Conclusion and Prospect The use of the refractive index as an endogenous label in 3D quantitative imaging for label-free biological samples is gaining popularity. However, some of the following improvements still need to be made: 1) a more accurate scattering measurement model should be established to improve the imaging resolution at the theoretical level; 2) there is still a necessity to overcome the limitation of sparse data, develop a more effective refractive index 3D reconstruction inversion algorithm, and improve the reconstruction accuracy and calculation speed; 3) as the refractive index is nonspecific for biological features, in-depth analysis of the refractive index in samples is required. At the application level, this study requires mature equipment to advance clinical procedures. Furthermore, its applications can be expanded to other domains of study, including water environment monitoring, food safety, material characterization, virology, and single-molecule analysis.

Key words medical optics; three-dimensional microscopic imaging; label-free imaging; refractive index quantitative imaging; optical projection tomography; optical diffraction tomography; inverse scattering