

生物细胞形态检测光学技术的新进展

卜敏 雷海娜 王亚伟

(江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013)

摘要 综述了近年来应用光学技术对细胞形态进行检测的新进展。简单介绍了包括图像识别技术、荧光显微技术在内的传统检测技术的最新进展,重点介绍了基于数字全息技术发展出的各种新型相位显微技术和其他新技术的最新发展动态。分别对傅里叶相位显微(FPM)、希尔伯特相位显微(HPM)的原理、技术特点及其成果进行了详细介绍。最后预测提出基于数字全息的细胞相位模式识别是细胞检测技术未来发展的趋势。

关键词 生物光学; 光学检测; 特征分析; 细胞

中图分类号 O439

OCIS 120.1880 170.1420

文献标识码 A

New progress on Detection of Biological Cells

Bu Min Lei Haina Wang Yawei

(College of Sciences Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract The recent advances in cells detection technology are summarized. The latest progresses of traditional detection techniques are introduced, including image recognition and fluorescence microscopy. Then the developments of phase microscopy based on digital holography are introduced. In particular, the principles, technical characteristics and productions about Fourier phase microscopy (FPM) and Hilbert phase microscopy (HPM) are recommended. Finally, it is forecasted that the cell-phase pattern recognition based on the digital holography is the future development trends of cells detection technology.

Key words photobiology; optics detection; features analysis; cell

1 引言

细胞大小和形态分布的检测技术涉及了众多学科,检测方法和仪器门类众多。目前,由于光学检测具有非侵入性、无电离辐射、可实时、可定量、具有多种操作模式等优点成为细胞检测的主要技术,其中镜检、荧光标记、新型显微识别、流式细胞术等多种方法成为细胞检测的主流。本文主要介绍了近几年国内外细胞检测技术的新思路和新方法,对新型相位显微技术进行了详细阐述,比较了各种细胞检测技术的优缺点,对细胞检测技术的发展前景做出了展望。

2 细胞传统检测技术的新发展

2.1 镜检及图像识别技术

镜检需要提取细胞、涂片、制备,在显微镜下得到细胞图像,依靠观测人员目视进行分析检验。随着光电技术和计算机图像处理技术的发展,图像的数字化处理逐步应用到细胞识别上,其自动化研究从20世纪90年代起成为国际研究的前沿和热点。

2003年,Liew A. W. C.等^[1]提出了对三维磁共振(MR)图像进行分割的自适应空间模糊C-均值(FCM)聚类算法,非常适合于医学图像中存在不确定性和模糊性的特点。2002年,Boscolo R.等^[2]将基于

收稿日期: 2009-08-08; 收到修改稿日期: 2009-11-04

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2008230)和江苏省六大人才高峰(06-E-059)资助课题。

作者简介: 卜敏(1977—),女,博士研究生,讲师,主要从事细胞光学检测方面的研究。E-mail: bumin@ujs.edu.cn

导师简介: 王亚伟(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事激光应用技术和光学检测方面的研究。

E-mail: jszjwyw@yahoo.com.cn

知识导引(knowledge-guided)的分割系统与一套熟练的主动轮廓模式相结合,利用一种高级过程的引导对不同的解剖结构进行分割。蔡永军等^[3]基于遗传算法成功识别了尿沉渣。基于小波变换的圆弧算法实现了红白细胞的识别和定量分析。Kumar 基于数学形态对图像中的白细胞做局部形态学处理,有效地分割出了白细胞的细胞质。图 1 为血细胞图像自动识别效果图^[4]。

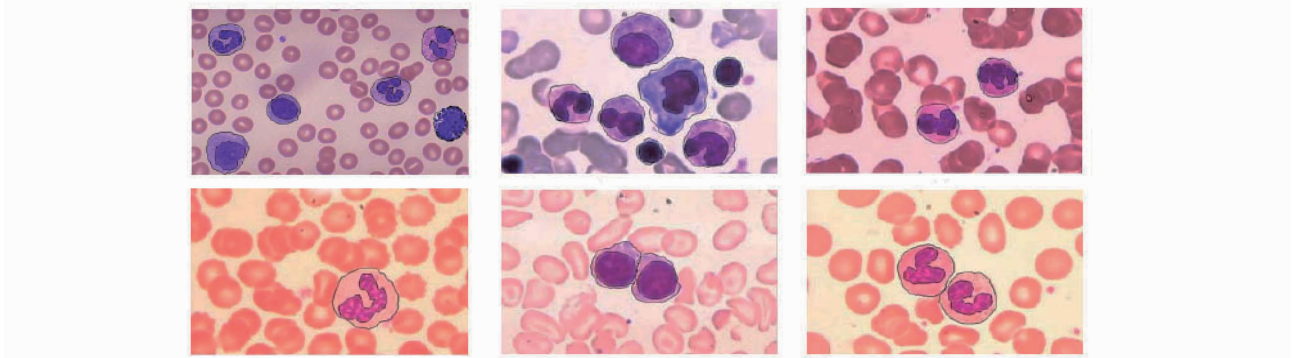


图 1 血细胞图像自动识别效果图

Fig. 1 Effect chart of blood corpuscle image by automatic diagnosis

2.2 荧光显微技术

荧光显微技术根据光致发光的原理,利用一定波长的光激发显微镜下标本内的荧光物质,呈现荧光图像。利用荧光强度分布的变化来反应细胞内物质的分布和变化。

2.2.1 多光子激光扫描显微技术

近 10 年来,随着非线性激光技术的进步,特别是飞秒激光器的出现,在激光共聚焦显微镜(LCSM)的基础上发展出多光子激光扫描显微镜(MPLSM)。目前技术比较成熟的是双光子扫描技术,即采用高功率超短脉冲的长波激光激发荧光物质,使一个荧光分子同时吸收两个长波光光子跃迁到第一激发单线态而发射荧光。由于只有在焦点处很小区域内的样品才能吸收足够的光子而发出荧光,因此 MPLSM 比 LCSM 具有更高的空间局域特点,可以获得更清晰的三维荧光图像。另外,由于采用的是能量较小的长波,穿透能力强且光毒性小,活体观测时间被延长。Jayne M. Squirrel 等^[5]采用多光子显微镜的近红外飞秒激光脉冲照射田鼠胚胎 24 h 后,胚胎的发育不受影响,如用 LCSM 技术则激光会大大减低胚胎活性。Konishi M. 等^[6]还将此技术与膜片钳技术结合,观察到少量的钙离子通过膜上的 L 类钙通道和肌质网释放通道来控制肌质网对钙的释放。

2.2.2 荧光寿命成像显微技术

在荧光寿命成像显微(FLIM)技术中,通过测量细胞内的荧光强度,计算出细胞内不同区域的荧光寿命分布,从而获得活细胞内生色团的荧光寿命。由于荧光寿命与生色团所处的微环境密切相关,利用荧光寿命成像可以由生色团荧光寿命的变化来获取活细胞中物质动态变化和相互作用的信息。荧光寿命成像方法不受激发光强度、荧光探针浓度以及光散射等因素的干扰,可以避免稳态荧光强度测量中的不利因素。

2.2.3 荧光共振能量转移显微技术

荧光共振能量转移为非辐射能量转移,可以发生在不同分子之间以及同一分子的不同生色团之间。在活细胞显微研究中,应用最多的是将绿色荧光蛋白作为活细胞蛋白质的标记分子,利用荧光共振能量转移显微技术(FRET)研究活细胞中蛋白质之间的相互作用。如 Vogt S. 等^[7]将 FRET 与 FLIM 结合,实时跟踪活细胞内物质相互作用的动态变化过程,获得皮秒和纳米量级的时间和空间分辨率。Dietrich Tomas 等^[8]把荧光共振能量转移技术用于单分子检测和核糖核酸(DNA)介导的电子转移过程,同时也用于 DNA 间的相互作用。

此外,全内反射荧光显微技术(TIRFM)、荧光偏振(FPIA)、荧光光谱(FCS)、荧光漂白恢复(FRAP)等技术也广泛地应用于细胞检测领域。例如 Kim H. D. 等^[9]用荧光光谱研究 Mg^{2+} 促进 RNA 三螺旋结合的构象变化,时间分辨率精确到了微量量级。1998 年 Warran C. W. Chan 等^[10]在把量子点作为荧光探针代替常规染料用于生物标记和细胞成像。如今量子点的应用给细胞成像和生物传感方面带来了飞跃发展^[11]。

3 细胞现代检测技术

3.1 数字全息技术

数字全息技术的基本原理是用光敏电子成像器件代替传统全息记录材料记录全息图,用计算机模拟再现取代光学衍射来实现所记录波前的数字再现,实现了全息记录、存储和再现全过程的数字化。近年来随着电子、材料和传感器技术的发展,数字全息技术有了全新的面貌。

由于生物细胞具有光学穿透性的特征,因此由相位分布能够准确地反演出细胞形体的三维形态。数字全息与显微技术结合用于生物细胞的微结构观察成为一个吸引人的研究方向。由于该方法具有精度高、速度快、可全场、实时在线等优点,其研究发展极其迅速,短短 10 多年便出现了许多成果^[12]。其中相位对比显微术(PCM)和微分干涉对比显微(DIC)只能进行定性分析,但由于其成像速度快、操作方便在临床医学领域广泛应用。

3.1.1 傅里叶相位显微

傅里叶相位显微(FPM)具有提取定量相位图像的特征,并且在几秒到一个细胞生命周期内具有亚纳米级的光程灵敏度。该方法是基于把定场分解为平均场和空间变化场的原理发展而来。其特点为:1)干涉臂经过了相同光程(即具有共传输路径的特点)使系统具有高度稳定性。2)干涉场由显微镜的输出图像进行傅里叶变换之后得到,进一步缩小了干涉场的光程,提高了横向分辨率和机械稳定性。3)采用低相干光源,经不同器件多次反射产生的条纹得到抑制,提高了系统的灵敏度^[13]。

图 2 为傅里叶相位显微镜的基本光路。虚线之前由超辐射二极管发出低相干场作为光源照射到样品上,为了保证全空间的相干性,二极管发出的光被耦合到单模光纤中,并随后进行了校正处理,使得照射到样品上的光波基本上是平面波。由样品出射的平均场 E_0 (即非散射光,虚线)和空间变化场 E_1 (即散射光,实线)由倒置显微镜收集并通过视频端口成像于成像屏(IP)。虚线之前的整套装置相当于平面波照射虚像点光源(VSP)在 IP 上得到放大的像。校正镜片(CL)置于 IP 屏上,其焦距大小使得 VSP 成像在无穷远处。校正后图像通过傅里叶透镜(FL)实现一个标准的 $4-f$ 几何模式的傅里叶变换,得到 E_0 和 E_1 的干涉场,投影到二维液晶阵列组成的可编程相位调制器(PPM)上。起偏器 P 调整场的偏振方向与 PPM 液晶分子的轴向一致。PPM 以 $\pi/2$ 为增量进行四步相移调节空间变化场 E_1 。PPM 的中心调制区域是直径为 8 pixel 的圆,保证 E_0 在像平面上是均匀的。相位图的重建率受到 PPM 的限制。

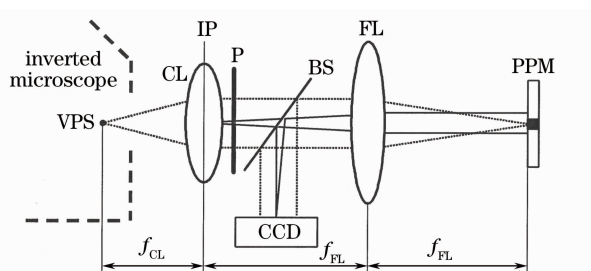


图 2 FPM 基本光路

Fig. 2 Experimental setup of FPM

CCD 记录的光强图像,同时是相位增量的函数,表示为

$$I(x, y, n) = |E_0|^2 + |E_1(x, y)|^2 + 2|E_0||E_1(x, y)| \cos[\Delta\phi(x, y) + n\pi/2], \quad n = 0, 1, 2, 3 \quad (1)$$

式中 $\Delta\phi$ 为 E_0 与 E_1 的相位差,由四步相移知所接收的光强决定

$$\tan \Delta\phi = [I(3) - I(1)]/[I(2) - I(0)]. \quad (2)$$

反演得出显微图像的相位 ϕ 的分布

$$\phi(x, y) = \arctan \frac{\beta(x, y) \sin[\Delta\phi(x, y)]}{1 + \beta(x, y) \cos[\Delta\phi(x, y)]}, \quad (3)$$

式中 $\beta(x, y) = |E_1(x, y)|/|E_0|$, 由于 E_0 基本上看作是平面波,所以参数 β 可以用(1)式的 4 个光强乘以一个常数因子 $\gamma = 1/(4|E_0|^2)$ 得到

$$\beta(x, y) = \frac{I(x, y, 0) - I(x, y, 2) + I(x, y, 3) - I(x, y, 1)}{4|E_0|^2 \{ \sin[\Delta\phi(x, y)] + \cos[\Delta\phi(x, y)] \}}. \quad (4)$$

Gabriel Popescu 等^[14]利用 FPM 分解低相干光学图像,得到了如图 3(a)所示的红细胞间接核分裂期间色码定量相位图,空灵敏度达到了波长的 1/5000,且稳定时间达到了几个小时,有利于定量分析细胞动力学,如形状变化或增长分裂。图 3(b)所示的为伪彩色显示定量相形象全血涂片,复原了圆盘状的红细胞。考虑到血红蛋白折射率,可以提供红细胞信息。加入一种高通量的程序可以筛选各种异常红细胞和潜在其

他血液成分。Niyom Lue 等^[15]发展了快速傅里叶相显微镜(f -FPM),采集率提高百倍以上。横向分辨率和路径长度达到了 2 nm 和 10 frame/s 以上,为研究活细胞的结构和动力学拓宽了方法,证明了用数字化的振幅和相位信息研究亚细胞结构的可行性。

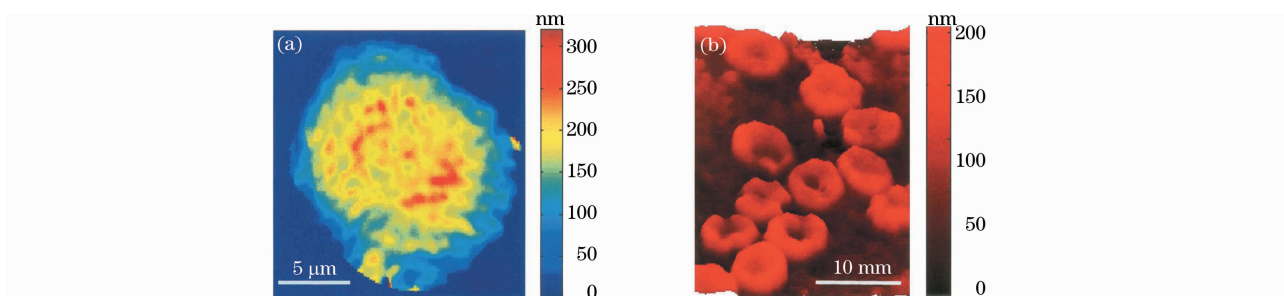


图 3 403 显微镜下 FPM 图像。(a) 未分裂的海拉细胞的相位图,(b) 全血图片的相位图

Fig. 3 FPM images obtained with a 403 microscope objective. (a) phase image of a HeLa cell undergoing mitosis, (b) phase image of whole blood smear

3.1.2 希尔伯特相位显微

希尔伯特相位显微(HPM)作为对 FPM 的一种补充,基本光路如图 4 所示。这种技术把在时域中用复数分析信号的概念推广到空间域中,并只从记录的一张空间干涉图中测出定量的相位图。由于其单次拍摄特性,HPM 的识别时间只受记录设备 CCD 的限制,因此可用于毫秒级时间内定量出纳米级的光程变化。

实验装置采用的是 He-Ne 激光器,装置的上下两个壁上各器件的参数是一样的,放大率 $M=20$ 的 CCD 置于透镜的共傅里叶平面上,并得到样品场的放大像。参考光相对样品光束有一个微小的倾斜,并在相对 CCD 的 x 和 y 轴 45° 方向得到相同的条纹结构。这样像平面内的光强分布为

$$I(X) = I_R + I_S(x) = 2[I_R I_S(x)]^{1/2} \cos[qx + \phi(x)], \quad (5)$$

式中 I_R 为参考光辐照度的分布, I_S 为样品光辐照度的分布, q 为条纹的空间频率, ϕ 为与物体有关的在空间上的变化相位。(5)式类似于迈克尔逊的时间干涉仪和其他 q 对应于由声光调制器或移动平面镜得到的频率变化的干涉仪。对于透明物体, I_S 几乎与 x 无关。调整系统的放大率,空间频率 q 要求不小于装置的数值孔径满足的最大频率,其衍射极限分辨率保持不变。正弦曲线项因此可以通过傅里叶高通滤波器分离。与实函数 $u(x)$ 有关的复数分析信号为

$$z(x) = \frac{1}{2}u(x) + i \frac{P}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{u(x')}{x-x'} dx', \quad (6)$$

式中的积分可以由 $u(x)$ 的希尔伯特变换得到。因此复分析信号 z 的相位由 $\Phi(x) = \arctan\{\text{Im}[z(x)]/\text{Re}[z(x)]\}$

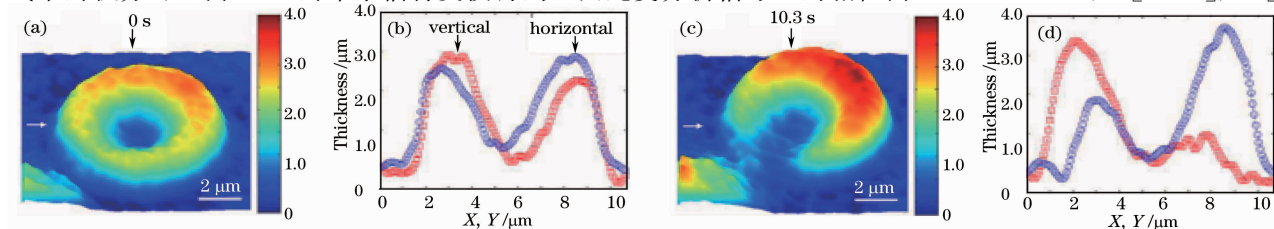


图 5 红细胞形体变化的定量分析。(b)和(d)分别是(a)和(c)上标注的箭头方向测量的结果

Fig. 5 Quantitative assessment of the shape transformation associated with the red blood cell.

(b), (d) measured results along the profiles indicated by the arrows in Fig. 5(a) and (c), respectively

(x)] 确定。由于表示的是频率 q 的快速相位调制,因而图像具有很高的空间调制性,在相位图上得到了 well-defined 包裹点,能更方便解包裹。最后,物体的相位简单表述为 $\phi(x) = \Phi(x) - qx$ 。

Takahiro Ikeda 等^[16]利用 HPM 技术还原出血涂片上红细胞,分辨率达到了 $5 \mu\text{m}$ 。Gabriel Popescu 等^[17]利用 HPM 技术测量溶血细胞内血红蛋白的流出过程,在毫秒量级上达到了亚细胞水平的空间灵敏度。图 5 选取了 2 个发生溶血现象的红细胞,在 10 s 的过程中,细胞动态厚度剖面在 2 个观测方位上的厚度变化情况可由相位测量实时测出。

3.1.3 衍射相位显微

衍射相位显微(DPM)结合了 HPM 的单个拍摄特性和 FPM 的共传输路径的几何形态。这样,得到的定量相位图在亚纳米级光程上具有固有的稳定性,并且其识别速度只受到探测器的限制^[18]。图 6 表示的是 DPM 基本光路^[19]。

选用 YAG 激光器的二级谐波辐射作为倒置显微镜的照明光,在输出端得到样品放大的像,并且这个显微图像就像是被实光源照射的一样。中继镜 RL 用于对 VPS 产生出来的光进行校正,并把显微图像复制到成像屏 IP 上。相栅 G 置于 IP 上,使之产生包含图像全部空间信息的多级衍射。用 L_1 - L_2 标准空间滤光透镜系统筛选出零级和 1 级衍射级,分别作为样品光场和参考光场,具体来说,零级衍射光束通过置于 L_1 的傅里叶平面上的空间滤光器 SF 进行低通滤光,使得到的 CCD 屏上的光场近似为均匀场;空间滤光器允许全部的 1 级衍射光频率信息通过,而阻止其他级。并在 CCD 屏上得到最终的干涉图。由于两光束经过了相同的光学路径,因而大大地降低了纵向相位噪声。

3.1.4 谐波相分散显微技术

在谐波相分散显微(PDM)技术中,两束波长不同的光波入射到迈克尔逊干涉仪待测物置于样品臂上。两个不同波长的外电压差信号由扫描参考臂来测得,而两波长的差值从干涉图中计算出来。这种技术随后推广到了三维系统中,称作相分散光学层析照相术参考^[20]。A. Ahn 等^[21]利用基于马赫-曾德尔干涉仪的谐波相分散显微技术得到直径为 $40 \mu\text{m}$ 聚苯乙烯珠的相位分散图及洋葱表皮细胞的相位分散图,如图 7 所示,简化了光学校正过程,降低了迈克尔逊干涉仪中由于微小偏移引起的重影效应。

3.2 其他光学方法

3.2.1 光学相干层析

光学相干层析(OCT)是 1991 年由 D. Huang 等^[22]首次提出的。如图 8 所示,典型的 OCT 装置以一个迈克尔逊干涉仪为核心,巧妙利用低相干光的相干长度非常短的这一特性,用相干门选通的办法获得了样品内部返回的各层微弱反射和散射信号,从而实现了高分辨层析成像的目的。

3.2.2 近场扫描光学显微术

近场扫描光学显微术(SNOM)属于扫描探针显微镜(SPMs)的一种。所有的 SPMs 实质上均根据扫描隧道显微镜(STM)发展起来的。近场光学主要探测的是束缚在物体表面的非辐射场,当使用纳米尺度的探头在样品近邻扫描时,理论上可以将衍射场的非辐射分量记录下来并转换为传导分量,从而极大地拓宽系统频带,因此可以获得超高分辨率。它突破了衍射分辨极限,能够在介观和纳米尺度的材料表面收集光学信

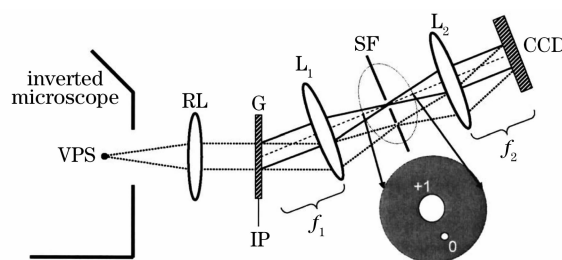


图 6 DPM 基本光路

Fig. 6 Experimental setup of DPM

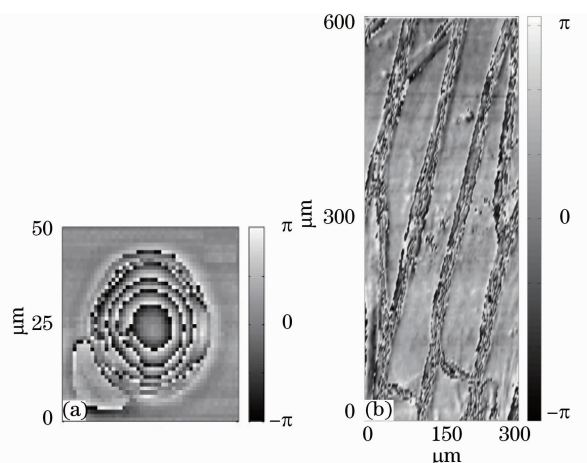


图 7 (a)甘油中的聚苯乙烯颗粒的相位分布图, (b)洋葱表面细胞的相位分布图

Fig. 7 (a) Phase-dispersion image of a polystyrene sphere in glycerol, (b) phase-dispersion image of cells of onion skin

息。

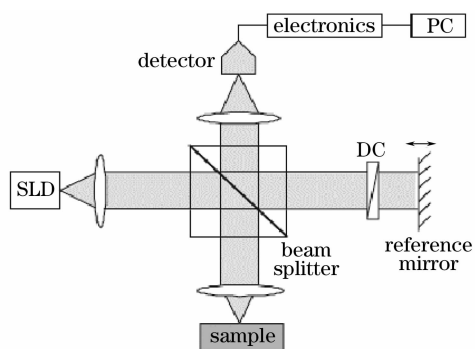


图 8 OCT 典型装置示意

Fig. 8 Experimental setup of OCT

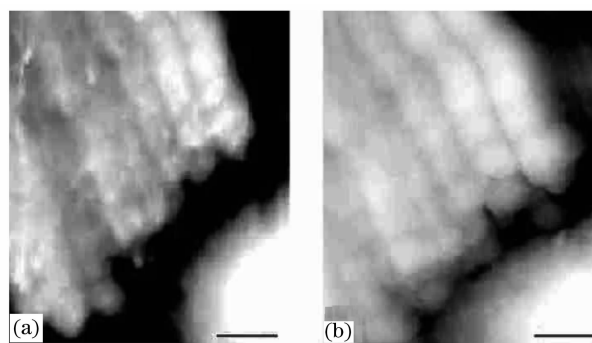


图 9 肺细胞在水中(a)和空气中(b)成像

Fig. 9 Shear force images of lung cell membrane recorded in air (a) and water (b)

Lei F. H. 等^[23]在液体环境下测量了一些生物试样的拓扑和近场光学像,使 SNOM 在生物领域内有了更广泛的应用,图 9 显示了人体肺细胞在水中成像和空气中成像的分辨区别,分辨率达 $2 \mu\text{m}$ 。此外,基于散射理论的流式细胞技术(FCM)、基于激光捕捉的光镊技术^[24](OT)、基于量子激发的正电子断层发射(PET)技术等都在研究组织和细胞成像中发挥作用。

4 细胞检测现有技术与发展趋势分析

现在各种成像技术和图像识别方法已经为细胞成像提供了选择,研究者可以根据科研需要选择不同观察手段^[25],从而促进生命科学的进步与发展。但是,现有的各种手段和实际应用的要求还有一定的差距,以介绍的 3 种方法为例:

1) 虽然目前计算机图像处理技术众多,但是由于生物图像的复杂性,只有融合各种方法才能得到较为满意的分割。而且由于细胞的特殊性(大小、透过率和取向等),上述的处理技术只能得到大量细胞分布的统计规律,且精确度低。若想广泛地应用于细胞个体形态的检测还有需进一步优化改进。

2) 荧光技术是目前医学研究中较为成熟的技术,但其主要应用领域在于免疫学和遗传学的分子研究,着重用于分析细胞内部的物质组成、结构特征和细胞生理过程中物质分布的变化。该方法对于样本制备、实验环境、观察周期有较高的要求,并不适合临床要求的对细胞进行实时快速的形态学分类检测。

3) 虽然 OCT 具有很多明显的优点^[26],但是该技术多用于生物组织成像^[27],细胞由于粒径小且多具有光透性,对 OCT 具有局限性。

总之,现有的图像识别技术还不能准确地对各种细胞实现快速识别,且还要求样本制备,不能对活细胞进行实时检测。各种基于荧光和近场原理的显微技术代价昂贵,且对样本要求较高,处理速度有限。测量过程中活细胞形态的变化影响着检测结果。

一项好的临床细胞检测技术要满足以下 4 点:1) 取样方便,制备简单,能对活细胞进行实时监测,避免对细胞形态的破坏;2) 技术本身具有无侵入性,无破坏性;3) 响应时间快,操作方便,成本低廉;4) 专注于细胞的形态结构,精度高,重码率低,有效减少二次重检。从这个角度看数字全息技术广泛地应用于细胞形态特征的检测,而不需要额外的造影剂。这些技术把编码在图像相位中的信息转换为最终图像的光强分布。因此穿过给定样品的相位变化就可以看作是额外的造影剂,因为它包含了样品厚度和折射率信息。例如成熟红血球的结构非常特别,其没有细胞核和主要的细胞器官,因而作为光学中均匀介质的典范,它们可以获得与其光学厚度成正比的局部光学相位改变。因此,测定红细胞的定量相位图可以获得精确度达到波长数量级的细胞光学轮廓。这种纳米级的形态信息可得到细胞的物理特性和健康状况。所以基于现有的光全息方法对细胞相位模式识别进行研究,预计可以为临床细胞检测打开新的局面。

参 考 文 献

- 1 A. W. C. Liew, Hong Yan. An adaptive spatial fuzzy clustering algorithm for 3-D MR image segmentation[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2003, **22**(9): 1063~1075
- 2 R. Boscolo, M. S. Brown, M. F. McNitt-Gray. Medical image segmentation with knowledge-guided robust active contours [J]. *Radiographics*, 2002, **22**(2): 437~448
- 3 Cai Yongjun, Liu Weiling, Yu Qilian. Application of genetic neural network to recognition of urine sediment[J]. *Chin. Med. Equip. J.*, 2004, **25**(11): 1~2
蔡永军,刘伟玲,虞启琏. 遗传神经网络在尿沉渣识别中的应用[J]. *医疗卫生装备*, 2004, **25**(11): 1~2
- 4 Tang Xuemin. Research of automatic recognition system of blood cell image[D]. Beijing: Tsinghua University, 2004. 33~35
汤学民. 血液细胞图像自动识别系统的开发[D]. 北京: 清华大学, 2004. 33~35
- 5 Jayne M. Squirrell, David L. Wokosin, John G. White *et al.*. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability[J]. *Nature Biotechnol.*, 1999, **17**(8): 763~762
- 6 M. Konishi, T. Yamashita, S. Nakayama *et al.*. Calcium waves in skinned cardiac myocytes evoked by two photon excitation photolysis of caged calcium[J]. *Jpn. J. Physiol.*, 2001, **51**(1): 127~132
- 7 S. Vogt, B. Lai, L. Finney *et al.*. Imaging trace elements in cells with X-ray fluorescence microscopy[J]. *Microsc. Microanal.*, 2007, **13**: 40~41
- 8 Thomas Dietrich, Martha Nunn, Bess Dawson-Hughes *et al.*. Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and gingival inflammation[J]. *Am. J. Clinical Nutrition*, 2005, **82**(3): 575~580
- 9 H. D. Kim, G. U. Nienhaus, H. Taekjip *et al.*. Mg²⁺-dependent conformational change of RNA studied by fluorescence correlation and FRET on immobilized single molecules[J]. *PNAS*, 2002, **99**(7): 4284~4289
- 10 Warren C. W. Chan, Shuming Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. *Science*, 1998, **281**(5385): 2016~2018
- 11 C. Seydel. Quantum dots get wet [J]. *Science*, 2003, **300**(5616): 80~81
- 12 J Leach, D. Howard, S. Roberts *et al.*. Manipulation of live mouse embryonic stem cells using holographic optical tweezers [J]. *J. Mod. Opt.*, 2009, **56**(4): 448~452
- 13 A. Y. M. Ng, C. W. See, M. G. Somekh. Quantitative optical microscope with enhanced resolution using a pixelated liquid crystal spatial light modulator[J]. *J. Microsc.*, 2004, **214**(3): 334~340
- 14 Gabriel Popescu, Lauren P. Deflores, Joshua C. Vaughan. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(21): 2503~2505
- 15 Niyom Lue, Wonshik Choi, Gabriel Popescu. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy[J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(10): 1836~1842
- 16 Takahiro Ikeda, Gabriel Popescu, Ramachandra R. Dasari *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(10): 1165~1167
- 17 Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Catherine A. Best *et al.*. Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, **10**(6): 0605031
- 18 N. Lue, W. Choi, K. Badizadegan *et al.*. Confocal diffraction phase microscopy of live cells [J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(18): 2074~2076
- 19 Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Ramachandra R. Dasari *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(6): 775~777
- 20 C. Yang, A. Wax, R. R. Dasari *et al.*. Phase dispersion optical tomography[J]. *Opt. Lett.*, 2001, **26**(10): 686~688
- 21 A. Ahn, C. Yang, A. Wax *et al.*. Harmonic phase-dispersion microscope with a Mach-Zehnder interferometer[J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(7): 1188~1190
- 22 D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin *et al.*. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, **254**(5035): 1178~1181
- 23 F. H. Lei, K. Khalid Q-enhanced shear force near-field optical microscopy on biological imaging in liquid[J]. *J. Chin. Electr. Microsc. Soc.*, 2006, **25**(4): 298~306
- 24 Zhang Xiaohui, Guo Yan, Wu Jianguang *et al.*. Application of optical tweezers in biological research [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, **46**(6): 24~31
张晓晖,郭彦,吴建光等. 光镊技术在生命科学研究中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2009, **46**(6): 24~31
- 25 Shiao-Wen Tsai, Yi-Yun Chen, Jiunn-Woei Liaw. Compound cellular imaging of laser scanning confocal microscopy by using gold nanoparticles and dyes[J]. *Sensors*, 2008, **8**: 2306~2316
- 26 N. Lue, W. Choi, G. Popescu *et al.*. Synthetic aperture tomographic phase microscopy for 3D imaging of live cells in translational motion[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(20): 16240~16246
- 27 Li Lanqun, Wei Huajiang, Guo Zhouyi. Determination of tissue optical properties using optical coherence tomography[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2008, **45**(5): 53~59
李兰权,魏华江,郭周义. 光学相干层析成像技术确定组织光学特性[J]. *激光与光电子学进展*, 2008, **45**(5): 53~59