

# 生物细胞定量相位显微技术及相位恢复方法的新进展

徐媛媛<sup>1</sup> 王亚伟<sup>1,2</sup> 金卫凤<sup>1</sup> 季颖<sup>2</sup> 张力<sup>1</sup> 张琳琳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>江苏大学机械学院, 江苏 镇江 212013; <sup>2</sup>江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013

**摘要** 相位显微技术,尤其是定量相位显微技术,能够非侵入、无损伤地实现相位体形态结构成像,从而在生物细胞结构分析、类别识别和动力学行为研究中有极其重要的应用。根据相位显微成像光路特征对相位成像技术做了分类,对典型的同轴干涉和离轴干涉两类成像技术进行了特征评析,并且介绍了这两类技术中几种重要的相位恢复方法,对三维定量相位显微技术的最新研究现状也给予了简单介绍,最后展望了相位显微技术未来的发展趋势。

**关键词** 生物技术; 定量相位显微; 技术特征; 相位恢复

中图分类号 O438 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.020006

## New Progress on Quantitative Phase Microscopy and Phase Retrieval for Biological Cells

Xu Yuanyuan<sup>1</sup> Wang Yawei<sup>1,2</sup> Jin Weifeng<sup>1</sup> Ji Ying<sup>2</sup> Zhang Li<sup>1</sup> Zhang Linlin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

<sup>2</sup>Faculty of Science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

**Abstract** Phase microscopy, especially quantitative phase microscopy (QPM), as a non-invasive and non-destructive tool for imaging phase objects, plays an important role for the structure analysis, identification and dynamic behavior analysis of the biological cells. According to the optical path characteristics of phase microscopy imaging recorded, the typical QPM techniques in both cases of on-axis and off-axis interference are analyzed comparatively, and their several important phase retrieval methods are introduced. In addition, the latest research progress of three-dimensional (3D) QPM is given simply. At last, the trend of QPM is predicted.

**Key words** biotechnology; quantitative phase microscopy; technological characteristics; phase retrieval

**OCIS Codes** 170.0180; 100.5070; 170.1530

## 1 引言

细胞是生命体的结构单元,也是生命活动的基本单位。生物细胞的大小、形态以及结构特征与细胞的功能和活动相适应,对其特征识别技术的研究是生命科学的基础,也是现代生命科学的发展支柱。大部分生物细胞都是微小透明的,光波透过细胞时,其波长和振幅并不发生明显的改变,仅发生由于细胞内折射率或厚度不同而产生的相位变化,所以采用传统的普通显微镜难以直接观察到细胞<sup>[1-2]</sup>。为此,学术界提出固定和染色技术<sup>[3]</sup>,利用细胞内不同组分对不同的“染料”所具有的不同的亲和性(吸附作用),形成足够的反差或是产生不同波长的光谱而达到细胞成像的目的。然而染色往往会对活细胞的生物活性产生较大的影响,甚至杀死细胞,导致细胞的性能和行为发生变化。因此,需要通过其他途径来提高细胞结构的反差,从而实

收稿日期: 2013-10-10; 收到修改稿日期: 2013-11-04; 网络出版日期: 2014-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(11374130、11302086)、教育部高校博士学科点专项科研基金(20113227110018)、江苏省高校自然科学研究重大项目(09KJA140001)

作者简介: 徐媛媛(1987—),女,博士研究生,主要从事生物细胞相位成像理论与技术等方面的研究。

E-mail: yuanyuanxulark@126.com

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与光学检测等方面的研究。

E-mail: jszjwyw@sina.cn(通信联系人)

现细胞的无损伤成像。

通常情况下,细胞可看作相位物体,且光与细胞相互作用产生的相位变化与细胞的大小、形态和内部结构等密切相关,由此可通过相位场反演出细胞的形态等特征,进而用于细胞显微结构和动力学等行为的研究。然而这种相位变化必须转化到探测器可感知的强度(振幅)变化才可被显现出来。1942年,Zernike<sup>[4]</sup>利用光的衍射和干涉特性,根据空间滤波的原理改变物光波的频谱相位,成功地将相位差转换成振幅差而提出了相衬法(相衬对比显微技术),大大地提高了透明物体的可分辨性,揭开了细胞相位成像的新篇章。随后,Nomarski<sup>[5]</sup>基于偏振分光原理提出了微分干涉对比显微,可呈现出高分辨率的细胞图像,且具有很强的立体感。这两类典型的技术无需染色就可实现像细胞这类相位物体的可见,在生物医学等领域得到了广泛的应用,使得传统显微技术发生了一个质的飞跃。但是其中强度与相位之间的分布均呈非线性关系,致使它们只能用于定性分析,给细胞的测量带来了极大的不便。因此,随着对细胞的研究的深入,发展定量相位显微技术(QPM)成了一个必然的趋势,也成为了一个很吸引人的研究方向。特别是激光器、电荷耦合器件(CCD)、计算机等的出现以及数字全息的发展<sup>[6-7]</sup>,各式各样的定量相位显微成像技术随之发展起来,并在生物细胞的显微观察、结构信息的提取以及动力学行为等研究方面取得了丰硕的成果。

本文将重点介绍各类典型的生物细胞定量相位显微成像技术,尤其是全场式的定量相位显微技术,并对其进行比较分析,然后简单阐述几种常见的相位恢复方法,最后对细胞相位显微技术的发展前景作了展望。

## 2 生物细胞定量相位显微成像技术

### 2.1 生物细胞二维定量相位显微技术

定量相位显微成像是依据相位成像原理而发展起来的,能够定量表示由细胞产生的相位变化<sup>[1]</sup>。相比其他的成像技术,定量相位显微成像技术具有许多独特的优势,能够非侵入地实现无损伤、高速度、高清晰、可定量的生物细胞成像,在显微领域内成为一类重要的光学测量技术。近十几年来,各种先进独特的相位显微成像技术相继被提出来,而且成功地被应用于生物细胞形态、结构以及动力学等方面的研究。根据实验几何装置的不同,定量相位显微成像技术可分为单点式与全场式两种。单点式以光学相干层析<sup>[8]</sup>为代表,通过逐点扫描可呈现出高分辨率、高对比度的细胞图像,但测量速度慢,测量范围较小,从而在生物细胞研究方面的一些应用受到限制。相比之下,全场式可同时提供大量样品点的信息,更具有实用价值。本文主要探讨全场式定量相位显微技术,该技术大部分都是基于干涉原理,根据干涉记录方式的不同,可分为同轴干涉和离轴干涉两大类。

#### 2.1.1 同轴干涉定量相位显微技术

同轴干涉指的是在传播方向相同的物光与参考光之间产生的干涉。在干涉图的频谱面上,会出现所谓的双孪像,致使同轴干涉在数字全息中的应用受到了极大的限制。直到1997年Yamaguchi等<sup>[9]</sup>首次将相移术引入到数字全息中,同轴全息干涉才逐步发展起来。同轴全息干涉能够充分利用CCD的空间分辨率,非常适合记录小尺度物体,其记录的不仅是物体的振幅信息,还包括物体的相位信息,在显微测量领域发挥着极其重要的作用。近几年来,许多基于同轴光路的定量相位显微技术被提出,例如美国麻省理工学院Popescu等<sup>[10-14]</sup>先后提出的傅里叶相位显微技术(FPM)<sup>[10]</sup>、空间光干涉显微技术(SLIM)<sup>[11-13]</sup>和白光傅里叶相位显微技术(wFPM)<sup>[14]</sup>,以及美国杜克大学Shaked等<sup>[15]</sup>提出的平行二步相移显微技术等。

傅里叶相位显微技术是Popescu等<sup>[10]</sup>于2004年基于相位对比显微和相移干涉原理所提出来的,其基本光路如图1(a)所示。该技术将通过同一样品的散射光与非散射光分别作为物光与参考光,且相互间发生干涉,并在傅里叶变换的频谱面上采用可编程的相位调制器(PPM)对散射光进行移相,从而可分时采集到4幅相移干涉图,并从中计算出物体的相位图像。该技术由于物光与参考光经过了相同的路径,使得整个相位显微系统具有高度的稳定性,可以处理长达几个小时的时间变化过程。遗憾的是,其采集速率较慢,为4 frame/min,仅适用于生物细胞慢现象的研究。为了研究细胞骨架动力学、细胞膜波动以及细胞器传输之类快现象,Lue等<sup>[16]</sup>发展了快速傅里叶相位显微技术(f-FPM),如图1(b)所示,其与傅里叶相位显微技术不同的是采用帧频高达千赫兹的液晶相位对比滤波器来控制交流分量与直流分量之间的相位差,使得采集速率提高了百倍以上,达10 frame/s以上,而且拥有衍射极限横向分辨率,光程的稳定性优于2 nm。

空间光干涉显微技术是由 Wang 等<sup>[11]</sup>于 2011 年提出的,它结合了 Zernike 相位对比显微和伽伯全息技术,其实验装置如图 1(c)所示。该技术的特殊之处在于将整个空间光干涉模块附加在相位对比显微镜的后面,对相位对比显微镜的成像场产生空间调制。在相位对比显微镜中,散射光与非散射光之间已引入  $\pi/2$  的相移,虽可获得透明物体的图像,但并不是可定量的,为此,再利用相位调制器进行移相,可获得多幅干涉图像,根据相移运算可计算出物体的相位图像,即实现了量化。值得注意的是该技术的另一个特殊之处在于采用相干长度近似为  $1.2 \mu\text{m}$  的卤素光源作为照明光源,消除了高相干性激光作为光源而引起的散斑效应,提高了图像的对比度。此技术有着与原子力显微镜相当的分辨精度,达到纳米量级,但其处理速度是原子力显微镜的 1000 倍以上,每秒十几帧,可很好地用于细胞动力学的测量以及神经元的动态成像等,而且该技术的干涉臂具有共几何光路特征,使得系统高度稳定。此外,该技术还可结合其他的技术,形成多模式的显微技术。2011 年我国教育部网站称此技术“给生物细胞分析和特征识别科学技术带来了突破性的革命”。

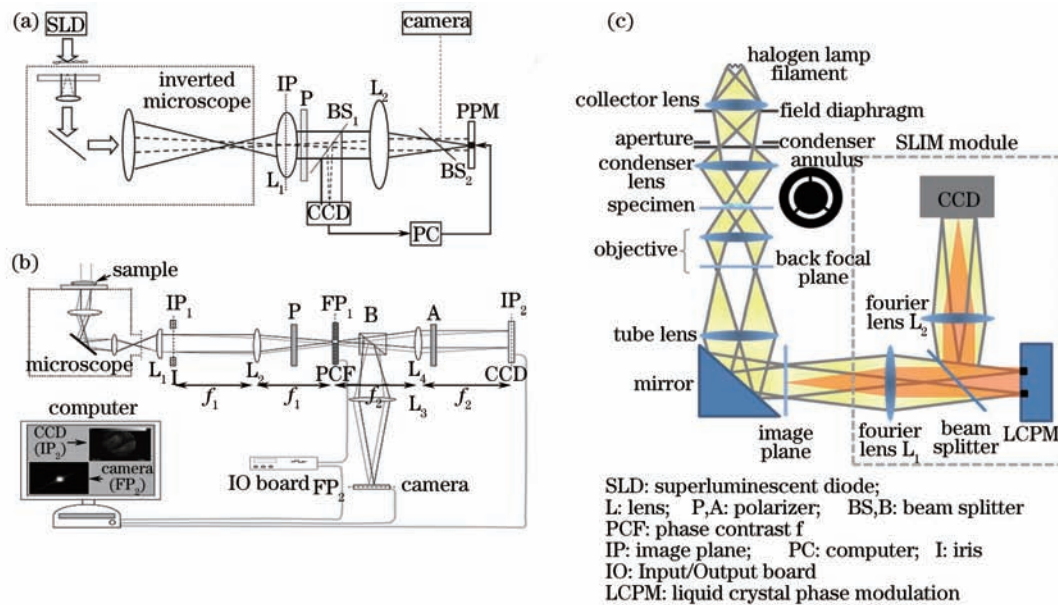


图 1 光路示意图。(a) FPM<sup>[10]</sup>; (b) f-FPM<sup>[16]</sup>; (c) SLIM<sup>[11]</sup>

Fig.1 Experimental setup of (a) FPM<sup>[10]</sup>; (b) f-FPM<sup>[16]</sup>; (c) SLIM<sup>[11]</sup>

上述的这些相位显微技术都是采用透过同一样品的散射光与非散射光,并借助相移器移相而进行四步相移干涉,从而实现相位成像。其实,还有很多同轴定量相位显微技术是基于典型的马赫-曾德尔(M-Z)光路或是迈克耳孙干涉等光路提出的,而且仅需两幅干涉图就可实现目的,如 Shaked 等<sup>[15]</sup>提出的平行同轴二步相移技术,就是由一个修改的马赫-曾德尔干涉仪和一个由 Wollaston 棱镜和两透镜组成的分束器系统组成的。此技术利用参考臂上的  $1/4$  波片将线偏振光转换为圆偏振光,并与物光经分束镜会合,但这两者并不存在角向偏移,经过分束器系统后每一光束被分离出两个垂直的偏振分量,最后经单次曝光在 CCD 上可获得相位相差  $\pi/2$  的两幅同轴干涉图像。此技术仅需两步相移,且是同步的,相比上述的方法,有利于实时测量。

### 2.1.2 离轴干涉定量相位显微技术

离轴干涉,是指具有一定夹角的物光与参考光发生的干涉,形成载频干涉条纹,是数字全息中常采用的记录方式。在显微测量方面,其特点是从单幅载频干涉图中获得被测样品的信息,包括相位分布,因此应用离轴式数字全息显微技术可快速实现生物细胞的成像及其动态过程的测量。

目前,对生物细胞数字全息相位显微术的研究处于领先地位的主要有瑞士的 CuChe 等<sup>[17-20]</sup>、德国的 Kemper 等<sup>[21-23]</sup>、美国的 Man 等<sup>[24-25]</sup>和意大利的 Ferraro 等<sup>[26-27]</sup>。Marquet 等<sup>[18]</sup>于 2005 年首次将数字全息显微技术应用于培养液中活细胞的定量测量,其显微装置基于典型的马赫-曾德尔干涉光路,采用的是一种透射模式,如图 2(a)所示。值得注意的是,透过细胞的物光与参考光经分束镜会合,但它们的传播方向是存在一定夹角的,从而形成离轴干涉。通过获取干涉图,采用菲涅耳衍射数值再现得到细胞的相位显微图像,其纵

向分辨率达到亚波长量级,较好地展示了数字全息量化成像的效果。此外,该装置相比原来经典的干涉相位显微装置,结构简单,易于操作。德国 Kemper 等<sup>[21]</sup>将一种非衍射重建的再现方法应用于一离轴数字全息显微中,成功地研究了胰腺癌细胞和人类红细胞等物体的三维结构图,而且其纵向分辨能力极高,达到 5 nm,实验装置如图 2(b)所示。该技术还可结合其他高分辨率技术,如荧光技术,为活细胞的功能成像和结构分析提供新的可能,有望在生命科学研究和生物光子学等显微应用方面成为一种通用的显微器件。然而此技术需要独立的相干参考光波与物光波干涉,一方面会造成低的相位稳定性,另一方面需要精确调整物光波与参考光波之间的比率。针对此问题,Kemper 等<sup>[22]</sup>于 2011 年提出了一种基于迈克耳孙光路的数字全息显微术,其实验装置如图 2(c)所示。照明光源透过样品,并经显微物镜放大后被耦合进由两反射镜 M1、M2 与分束镜 BS2 组成的迈克耳孙干涉仪。通过改变反射镜 M2 的角度,可获得合适的载波条纹,此显微装置结构简单,能够无接触的、长时间地对活细胞成像,且具有亚细胞的分辨率。为了提高相位的稳定性,相比其他的自干涉或是共光路干涉装置,此系统不需要额外的元器件,如时域相移装置、透镜、空间光调制器等,仅需迈克耳孙干涉仪就可实现目的。由于采用的是几乎相同的光学路径长度内的干涉仪,该系统适用于短相干长度低成本的照明光源,可提高成像的对比度。此外,空间载波条纹也不受物光波校正的影响。此系统有望被应用到层析相位显微中。

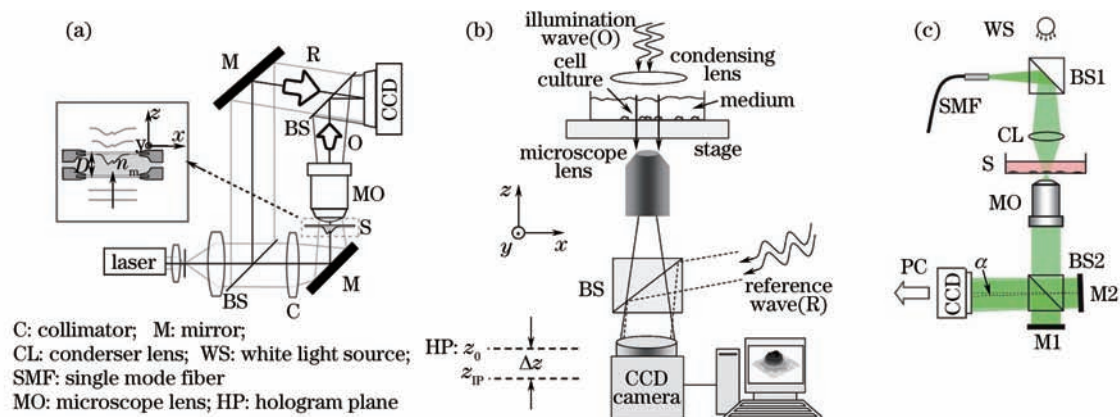
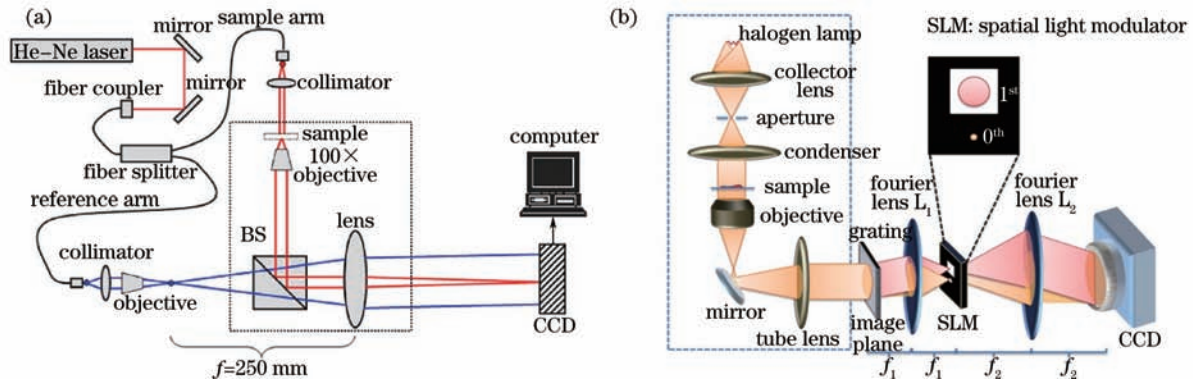


图 2 文献(a) [18], (b) [21], (c) [22] 中离轴数字全息光路示意图

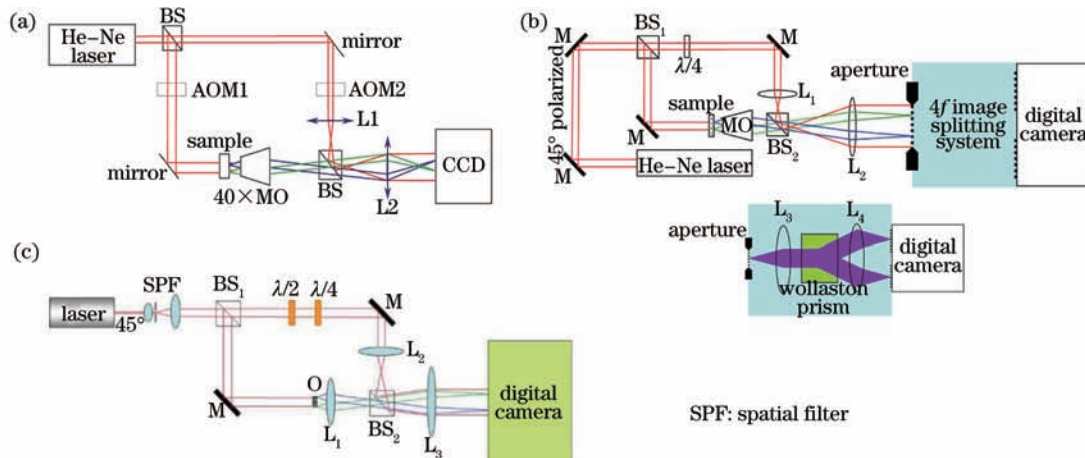
Fig.2 Experimental setup of off-axis digital holographic in (a) Ref. [13], (b) Ref. [21], (c) Ref. [22]

在离轴式数字显微技术中,Ikeda 等<sup>[28-29]</sup>提出了应用希尔伯特变换从全息图中提取相位信息的方法。代表性的技术有希尔伯特相位显微(HPM)<sup>[28]</sup>、衍射相位显微(DPM)<sup>[29]</sup>以及它的一些延伸技术,如傅里叶变换光散射技术(FTLS)<sup>[30]</sup>和白光衍射相位显微技术(wDPM)<sup>[31-33]</sup>。

希尔伯特相位显微技术起初是作为傅里叶相位显微的一种补充技术出现的,采用的是马赫-曾德尔干涉仪装置<sup>[28]</sup>,基本光路如图 3(a)所示。该技术将时域中复解析信号的概念运用到空间域当中,对采集到的空间干涉调制图首先通过高通滤波分离出干涉项,然后采用希尔伯特变换就可获取高横向分辨率的定量相位图像。此技术具有单次拍摄的特性,采样时间只受记录装置(CCD)的限制,因而可以在毫秒级或更短的时间内精确地定量出纳米级光程变化,为透明结构如生物细胞的快速动态变化的研究与分析提供了强有力的工具。此技术已成功运用于红细胞和海拉细胞的结构和动力学的研究,而且结合其他的装置可实现细胞平均折射率和膜张力等参量的测量。然而 HPM 是一种双光路(物光与参考光分离)干涉显微技术,对环境的扰动较敏感,会给测量结果造成一定的影响。为此,具有共几何光路和离轴干涉单次拍摄特征的衍射相位显微技术被提出<sup>[29]</sup>。随后,又考虑到激光照明产生散斑噪声的影响,在 DPM 的基础上开发了白光衍射相位显微技术,此技术不仅保留了 DPM 的优势,而且具有高的空间相位敏感度,其基本光路如图 3(b)所示。其特殊之处在于位于成像屏上的相位光栅产生包含样品图像完整空间信息的多个衍射级,并利用空间滤波器分离出 0 级和 1 级衍射场,且保证了它们经过相同的路径,最后在 CCD 上形成离轴干涉图像。这样得到的定量相位图像不仅具有亚纳米光程稳定性,而且仅需毫秒级采样时间。相比上文所述的数字全息显微技术常用的再现方法,该运算量也大大减小了,所以能够很好地用于生物活细胞的定量研究和实时监测,包括亚结构分析以及形态参数测量。

图3 光路示意图。(a)HPM<sup>[28]</sup>; (b)wDPM<sup>[31]</sup>Fig.3 Experimental setup of (a) HPM<sup>[28]</sup> and (b)wDPM<sup>[31]</sup>

在相位测量方面,还有另一种相移干涉技术。相移干涉不仅适用于同轴干涉,也适用于离轴干涉。在近几年来,美国 Chalut 等<sup>[34-35]</sup>就离轴干涉先后基于二步相移提出了异步数字全息<sup>[34]</sup>和双通道干涉显微技术<sup>[35]</sup>,他们的光路图分别如图 4(a)、(b)所示。两技术都是采用马赫-曾德尔干涉仪光路,不同的是异步数字全息在干涉臂上分别放置声光调制器 AOM1 与 AOM2 来产生相移,而双通道干涉显微则是利用参考臂上的 1/4 波片和由两透镜和 Wollaston 棱镜组成的 4f 成像系统来产生相移。另外,异步数字全息采用的是帧转移 CCD,可以在毫秒时间范围内连续记录两相移图像,而双通道干涉显微经单次曝光可同时获得两相移图像。此类技术相比常用的同轴四步相移技术需要的测量更少,采集速率更快,可适用于毫秒范围内快现象的研究,相比平行同轴二步相移干涉,无需单独测量参考场的强度,更加简单,是生物细胞动力学行为研究的又一类前沿技术。

图4 光路示意图。(a) 异步数字全息<sup>[34]</sup>; (b) 双通道干涉<sup>[35]</sup>; (c) 轻微离轴干涉<sup>[36]</sup>;Fig.4 Experimental setup of (a) asynchronous digital holography<sup>[34]</sup>, (b) double-channel interferometry<sup>[35]</sup> and (c) slightly off-axis interferometry

通常情况下,离轴干涉需要物光与参考光之间的夹角足够大,以保证各级衍射像的频谱在空间上是分离的,这也就导致了离轴干涉不能充分利用 CCD 的空间带宽。若将经两步相移所获得的干涉图样相减来消除零频分量(背景光),那么物光与参考光之间的夹角只需满足实像与共轭像的频谱分离即可,由此提出了介于传统离轴干涉和同轴干涉之间的轻微离轴干涉。图 4(c)是 Shaked 等<sup>[36]</sup>于 2009 年基于马赫-曾德尔干涉仪光路而提出的轻微离轴干涉。其特殊之处在于通过旋转参考臂上的两波片对参考光产生不同的相移,在 CCD 上获得两相移干涉图,采用上述的方法提取出定量相位信息。此技术仅需两步相移,相比常用的同轴干涉需要的测量更少,有利于实时测量,相比离轴干涉需要的载频量更小,优化了空间分辨率。不足的是采用两波片来产生相移,导致了干涉图是分时获得的,相比离轴干涉减慢了其采集速率。

在我国,20 世纪 90 年代初由中国科学院上海光学精密机械研究所最先开展数字全息领域的研究工作以来,Gao 等<sup>[37]</sup>基于离轴光路提出了同步相移干涉显微,其基本光路如图 5(a)所示。根据偏振相移原理,由

该技术可以得到相移量为  $\pi/2$  的两干涉图样。此外,考虑到装置的稳定性,他们又提出了同步相移共光路干涉显微装置<sup>[38]</sup>,其基本光路如图 5(b)所示。此装置中物光与参考光经过相同的路径,具有很好的稳定性,可对活细胞这类运动物体或其动态过程进行实时测量。

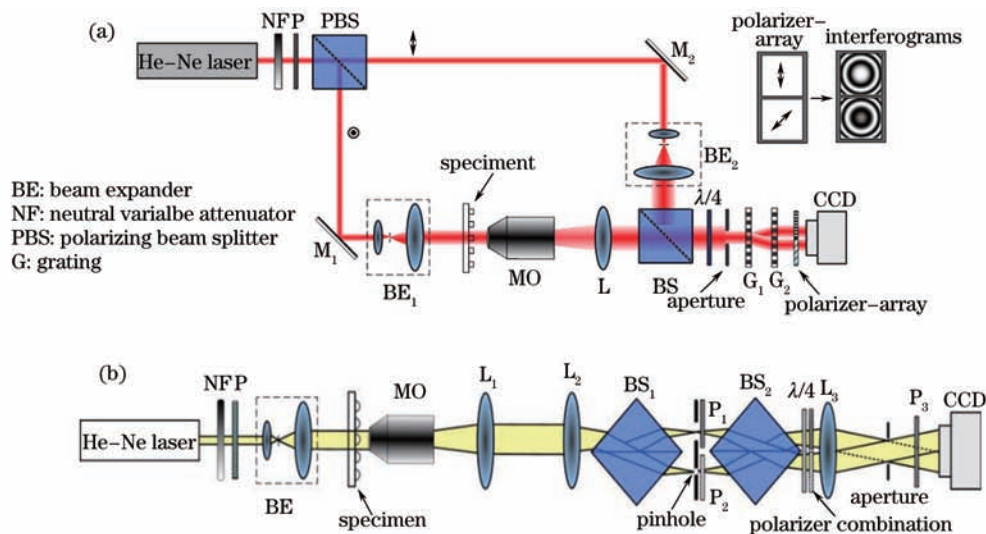


图 5 光路示意图。(a) 基于光栅衍射分光的同步相移<sup>[37]</sup>; (b) 基于分光棱镜分光的同步相移<sup>[38]</sup>

Fig.5 Simultaneous two-step phase-shifting experimental setup of (a) beam division by a grating pair<sup>[37]</sup>; (b) beam division by a cube beamsplitter<sup>[38]</sup>

## 2.2 生物细胞三维定量相位显微技术

生物细胞的定量相位信息反映的是细胞与周围环境折射率差与细胞厚度的乘积,是一个沿光传播方向的积分整体变化量,并不能反映每一点的情况,呈现的仅是一个二维分布,而对生物细胞有用的信息往往是单个变化的量,即细胞的厚度信息和细胞内各点的折射率。细胞的厚度信息可以呈现细胞的轮廓和形态;细胞各点的折射率可以反映细胞内的精细结构和组成成分,由于细胞内各组成物质的折射率不同,所以折射率分布的变化往往可作为诊断疾病的一种依据<sup>[39]</sup>。

三维定量相位成像技术主要用来测量生物细胞折射率的三维分布,探索细胞内的结构信息。通常情况下,需要结合层析成像技术,通过多角度照明<sup>[40]</sup>、旋转样品<sup>[41]</sup>或是多波长扫描<sup>[42]</sup>等方式,得到一系列的图像,经过合适的重建方法计算出折射率的层析结果。例如 Charriere 等<sup>[41]</sup>于 2006 年基于数字全息显微提出标准衍射层析技术,并测量了放置在玻璃微量吸管中的花粉分子的折射率分布。图 6(a)是其基本光路,设定物光波的传播方向为  $z$  轴,样品旋转轴为  $x$  轴,CCD 拍摄面为  $xy$  平面。为了满足所需最大空间分辨率,以  $2^\circ$  为步进角度旋转样品,获得以覆盖  $180^\circ$  的各个方向的相位图。然后对这一系列相位图采用常用的滤波反投影重建方法即可计算出三维折射率层析结果。图 6(b)为花粉分子的折射率层析图,其精度优于 0.01,三维空间分辨率优于  $1 \mu\text{m}$ 。此外,Choi 等<sup>[43]</sup>在生物细胞折射率三维重建方面也做出了许多的研究,于 2007 年基于相移干涉显微提出了层析相位显微技术,如图 6(c)所示。他们采用时域马赫-曾德尔干涉仪光路,通过转动电流镜(GM)来改变样品的照明角度,且 CCD 记录下每一角度下的 4 幅相移干涉图,从而计算出相位图。同样对不同照明角度下得到的相位图采用滤波反投影重建方法得到样品的折射率。此技术已成功获得了海拉细胞和人类结肠癌细胞的三维折射率分布。

层析成像技术能够实现细胞尺度生物样品折射率的三维重构,对其内部结构进行高分辨成像,但需要逐点扫描,一定程度上也限制了其发展。为此,无需横向扫描的全场光学相干层析技术被推出,该技术采用并行探测技术,相比逐点扫描,其成像速度显著提高。2010 年,Choi 等<sup>[44]</sup>应用基于 Linnik 干涉光路的全场光学层析技术测量了单个细胞的折射率分布,同时获得了细胞的物理厚度和光学厚度。

生物细胞折射率和厚度分布的测量除了可以应用层析成像技术外,其实也有许多其他的方法,如 Lue 等<sup>[45]</sup>提出首先利用希尔伯特相位显微获取细胞的定量相位信息,然后采用共聚焦反射显微获得细胞的物理轮廓信息,最后由这两者全场式地计算出细胞的轴向平均折射率;又如 Rappaz 等<sup>[46]</sup>提出通过改变细胞周围的环境

液,分别获取对应的定量相位图像,从而同时求解出细胞的轴向平均折射率和物理厚度,但细胞的高速运动会影响测量结果。总之,细胞的三维定量相位显微技术还处于初步发展阶段。

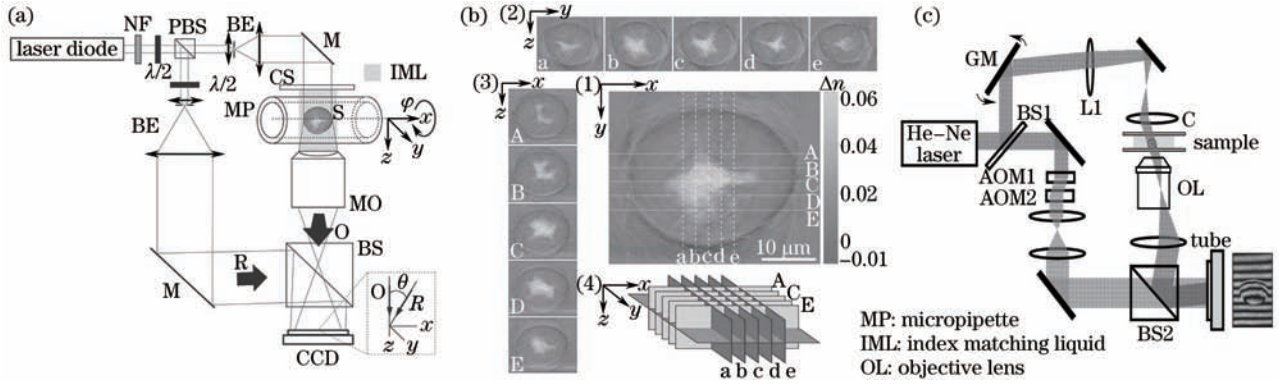


图6 (a),(c)文献[41]、[43]中层析光路示意图;(b)花粉分子折射率层析图<sup>[41]</sup>

Fig.6 Experimental setup of tomographic phase microscopy in (a) Ref. [41] and (c) Ref. [43]; (b) refractive index tomography of a pollen cell<sup>[41]</sup>

### 3 相位恢复方法

在光学成像中,探测器只能记录光场的强度信息。通常相位信息的获取需要通过相应的运算才能从强度信息中再现出来,此过程称为相位恢复。相位恢复是细胞定量相位成像中一个重要的环节。大部分的定量相位显微成像技术都是基于干涉显微法,记录的是干涉图样。根据干涉记录方式的不同,采用的相位恢复方法不同。如同轴干涉大多基于相移技术,而离轴干涉方法众多,可以根据数字全息衍射再现、条纹法、相移技术、傅里叶变换、希尔伯特变换、小波变换以及近期提出的微分法等方法实现相位提取。

#### 3.1 同轴干涉相移法

同轴干涉相移法<sup>[10-14]</sup>,是指在同轴干涉中引入相移技术,然后从相移干涉图样中确定被测样品的相位分布。通过各种相移调制器改变其中一相干场的相位,通常选取参考光,经干涉可在不同时刻采集到多幅干涉图(一般至少三幅以上),然后再利用相移算法对多幅干涉图进行处理来获得样品的相位信息。其中四步相移技术应用最为普遍,说明如下。

假设物光波和参考光波在记录平面的复振幅分别为  $O(x,y)$ ,  $R(x,y)$ ,采用相位调制器每以  $\pi/2$  为增量调制参考场的相位变化,则在记录平面上采集到的4幅干涉图样可分别表示为

$$I(x,y,n) = |O|^2 + |R|^2 + 2|O||R| \times \cos[\varphi(x,y) + n\pi/2] = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos[\varphi(x,y) + n\pi/2], \quad n = 0, 1, 2, 3, \quad (1)$$

式中  $I_s$  和  $I_r$  分别为样品光和参考光在记录平面的强度。根据四步相移运算可知,由样品引起的相位信息  $\varphi(x,y)$  可由下式决定

$$\tan \varphi = \frac{I(x,y,3) - I(x,y,1)}{I(x,y,0) - I(x,y,2)}. \quad (2)$$

通过相位解包裹就可恢复出正确的相位信息。此方法非常简单,但是多次采集图像,比较耗时,另一方面在真实的实验中很难保证每步相移的准确性,而且也很难保证在相移的变换过程中,相关物理量不会发生变化。因而此方法仅适用于静态样品的观察和分析。

针对上述问题,Meng等<sup>[47]</sup>提出了二步相移干涉的恢复方法,仅需两幅相移干涉图就可再现被测样品的相位信息,但需满足两个条件:1)参考光强是已知的;2)参考光强的强度至少是物光光强的两倍之多。这也就极大地限制了其应用。为此,Shaked等<sup>[48]</sup>提出了同步二步相移干涉的方法。同步指的是两干涉图是经一次曝光而采集到的,因而此方法可以对运动物体或动态过程进行实时测量,但不足的是需脱机测量参考光的强度。由记录的两干涉图和测量得到的参考光的强度,根据复数运算,则相位信息可由下式得到:

$$\begin{cases} F = [(I_1 - I_0) + j(I_2 - I_0)] / \sqrt{2I_r} \\ \varphi = \arctan[\text{Im}(F) / \text{Re}(F)] \end{cases}, \quad (3)$$

式中  $I_0 = I_r + I_s$  表示背景光的强度,  $\text{Im}$  与  $\text{Re}$  分别表示虚部和实部。若未置样品时, 两相干场存在相位差, 那么还需重复上述的过程, 测量未置样品时的相位, 然后将有、无样品时的相位相减才能正确地恢复相位。

### 3.2 离轴干涉频域变换法

离轴干涉, 又称载频干涉, 其干涉图样的零频分量(背景光)、实像和共轭像在频谱面上是分离的, 主要方法如下。

傅里叶变换法是由 Takeda 等<sup>[48]</sup>提出的, 被广泛地应用与载频干涉图处理过程中。离轴干涉的光强分布可写成

$$I(x, y) = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos[\varphi(x, y) + 2\pi f_x x] = a(x, y) + b(x, y)\exp[j2\pi f_x x] + b^*(x, y)\exp[-j2\pi f_x x], \quad (4)$$

此处假定条纹沿  $y$  方向,  $f_x$  为引入的空间载频,  $a(x, y) = I_s + I_r$  为背景光强,  $b(x, y) = \frac{1}{2} \cdot 2\sqrt{I_s I_r} \exp[j\varphi(x, y)]$ ,

\* 表示复共轭。对(4)式进行傅里叶变换, 有

$$I(f, x) = A(f, y) + B(f - f_x, y) + B^*(f + f_x, y). \quad (5)$$

由于光载波的调制作用, (5)式右边三项彼此是分离的。采用中心频率为  $f_x$  的滤波器, 并通过频移可得到  $B(f, y)$ , 从而消除了背景光强和共轭像, 然后对其进行傅里叶逆变换得到  $b(x, y)$ , 从而可以解出被测样品的相位分布:

$$\varphi(x, y) = \arctan \frac{\text{Im}[b(x, y)]}{\text{Re}[b(x, y)]}. \quad (6)$$

希尔伯特变换法<sup>[28-32]</sup>, 是另一种常用的积分变换法, 与傅里叶变换类似, 都要经过滤波, 但又有很大的区别: 傅里叶变换法不仅消除零级背景光强的影响, 还消除了共轭像的干扰, 而希尔伯特变换法经高通滤波仅消除背景光强, 然后进行希尔伯特变换就可实现相位提取。

(4)式中包含样品信息的干涉项相对于背景光强来说是一高频项, 因此可通过高通滤波法分离出干涉项:

$$u(x) = 2\sqrt{I_s I_r} \cos[\varphi(x, y) + 2\pi f_x x]. \quad (7)$$

然后对(7)式进行希尔伯特变换, 并引入复解析信号概念, 则与干涉项  $u(x)$  有关的复解析信号为

$$z(x) = \frac{1}{2}u(x) + jH[u(x)], \quad (8)$$

式中  $H$  表示希尔伯特变换。此时, 复分析信号  $z$  的相位  $\Phi(x) = \arctan\{\text{Im}[z(x)]/\text{Re}[z(x)]\}$ , 从而样品引起的相位变化可以简单地表示为  $\varphi = \Phi(x) - 2\pi f_x x$ 。

此频域积分变换法充分利用了离轴干涉频谱分开的特点, 仅需单幅干涉图, 就可实现定量提取相位信息的目的, 从而具有较高的获取速率, 但多次积分变换容易造成高频信息的丢失。

### 3.3 离轴干涉相移法

相移法不仅适用于同轴干涉, 也同样适用于离轴干涉。离轴干涉相移法多采用两步相移法<sup>[34-36]</sup>, 通过改变参考光的相位获得两幅离轴相移图, 然后经过变换求解出样品的相位分布。一种较为普遍的情况是假设相移量为  $\alpha$ , 此时  $\alpha$  并不一定是特殊值, 如  $\pi/2$ , 引入空间载波条纹的空间频率为  $k$ , 那么物光与参考光两次干涉的干涉强度可分别表示为

$$\begin{cases} I_1 = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos(\varphi + kx) \\ I_2 = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \cos(\varphi + kx + \alpha) \end{cases}, \quad (9)$$

式中  $k$  与  $\alpha$  可通过对背景光干涉条纹的正弦拟合得到。样品信息的相位  $\varphi$  就可以根据下式计算:

$$\begin{cases} F = \frac{\exp(-jkx)}{1 - \exp(j\alpha)} [(I_1 - I_2) + jH(I_1 - I_2)] \\ \varphi = \arctan[\text{Im}(F)/\text{Re}(F)] \end{cases}. \quad (10)$$

该方法尤其可适用于轻微离轴定量相位成像系统中, 但与频域变换法一样都需要采用积分变换。实际上, 积分变换的运算过程较复杂, 耗时也较长, 因而也很难真正做到实时提取样品的相位信息。为此, Debnath 等<sup>[49]</sup>采用空间相移运算实现实时相位成像, 其运算速度比傅里叶变换快 5 倍之多, 比希尔伯特变换快 2 倍, 但需满足最低噪声的条件, 这为定量相位成像系统的设计增加了一些限制。



### 3.4 离轴干涉微分法

干涉条纹微分法由 Bhaduri 等<sup>[50]</sup>于 2012 年提出, 仅需计算干涉图样的横向一阶偏导、二阶偏导就可实现相位恢复的目的。此方法采用微分运算, 相对上述采用傅里叶变换和希尔伯特变换积分运算的方法要快得多, 是目前运算最快的方法, 可很好地用于高速动态测量, 为活细胞等运动物体的深入研究提供了强有力的工具。

为了方便阐述, 将离轴干涉光强改写为

$$I(x, y) = I_0(x, y) + \gamma(x, y) \cos[\varphi(x, y) + kx], \quad (11)$$

式中  $I_0(x, y)$  为背景光强,  $\gamma(x, y)$  为强度调制因子。对干涉图在横向求一阶偏导可得

$$I^{(1)} = \frac{\partial I(x, y)}{\partial x} = \frac{\partial I_0(x, y)}{\partial x} + \frac{\partial \gamma(x, y)}{\partial x} \cos[\varphi(x, y) + kx] + \gamma(x, y) \{-\sin[\varphi(x, y) + kx]\} \left[ \frac{\partial \varphi(x, y)}{\partial x} + k \right]. \quad (12)$$

对于生物细胞这类相位物体, 背景光强度  $I_0$  和强度调制因子  $\gamma$  可近似认为是不发生变化的, 由物体产生的空间相位  $\varphi(x, y)$  是一变化缓慢的函数, 其变化相比载波条纹的相位  $kx$  的变化要小得多, 所以下列的近似条件可满足:

$$\frac{\partial I_0}{\partial x} \approx 0, \quad \frac{\partial \gamma}{\partial x} \approx 0, \quad \frac{\partial \varphi}{\partial x} \ll k. \quad (13)$$

(12) 式可简化成

$$I^{(1)} = -\gamma k \sin[\varphi(x, y) + kx]. \quad (14)$$

对(4)式求横向一阶偏导, 即对干涉强度求二阶偏导, 有

$$I^{(2)} = -\gamma k^2 \cos[\varphi(x, y) + kx]. \quad (15)$$

由(14)式和(15)式, 样品的相位变化可由下式确定:

$$\varphi(x, y) = \arctan[kI^{(1)}/I^{(2)}] - kx. \quad (16)$$

很显然, 只需确定空间频率和计算干涉条纹的一阶偏导和二阶偏导就可实现目的, 为解决相位恢复问题实现了一个新的突破, 但需调节条纹周期小于成像系统的衍射极限, 使得与空间频率相比, 由样品邻域内引起的相位变化可以忽略, 即  $\frac{\partial \varphi}{\partial x} \ll k$ 。

本课题组在上述微分法的基础上提出另一种微分法<sup>[51]</sup>。首先对干涉图样经高通滤波消除背景光强而分离出干涉项  $I^{(0)} = \gamma \cos[\varphi(x, y) + kx]$ , 然后对干涉图样求横向一阶偏导  $I^{(1)}$  与二阶偏导  $I^{(2)}$ 。由于样品产生的相位  $\varphi(x, y)$  是一缓慢变化的函数, 在样品的邻域内相位变化非常小, 所以  $\varphi(x, y)$  可满足  $\frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} \approx 0$ , 那么相位  $\varphi(x, y)$  可由下式计算得到:

$$\varphi(x, y) = \begin{cases} \arctan \left\{ -\frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right\}^{1/2} - kx & (I^{(1)} \cdot I^{(2)} \geq 0) \\ \arctan \left\{ -\frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right\}^{1/2} - kx & (I^{(1)} \cdot I^{(2)} < 0) \end{cases}. \quad (17)$$

此方法同样采用微分运算, 相位恢复速度较快, 可用于生物快现象的研究, 但不足的是需经过高通滤波。

上述的各种相位恢复方法都是基于干涉定量相位显微而提出的, 各有优缺点, 可根据不同的需要进行选取, 但都需要通过相位解包裹运算才能恢复出正确的相位信息, 因为获得的相位都是经过反正切函数而得到的, 而反正切函数使得整个相位波面限制在  $[-\pi, \pi]$ , 从而导致了相位波面的不连续。为此, 许多学者基于非干涉的定量相位显微技术提出对应的相位恢复方法, 较有影响力的有基于求解强度传递方程的方法<sup>[52-53]</sup>以及基于光波强度的多次数值迭代求解法<sup>[54-55]</sup>。这两种方法计算得到的相位图是从直接测量到的强度图像中得到的, 并不涉及到反正切函数, 所以避免了对相位图的解包裹运算, 但是这些方法都需要大量的计算, 也就限制了其在研究生物细胞动力学方面的应用。

## 4 细胞相位显微成像技术的发展趋势

近十几年来,应用相位显微技术,尤其是定量相位显微技术对生物细胞进行成像以及实时测量已成为该领域一个热门的研究方向,经过数十年的发展,已取得了丰硕的成果,尤其是在均质红细胞的显微观察方面,可以分析其动力学行为。然而定量相位显微技术对非均质、结构复杂的生物细胞,如白细胞的研究还处于初步探索阶段<sup>[56]</sup>,这主要是因为一方面像白细胞这类生物样品形态多样、结构复杂,尤其是一些未成熟的细胞,另一方面目前缺乏有效的能从相位图中反演出细胞结构,尤其是亚结构的方法。因此,发展异质、异形相位体的相位显微技术是一个大的发展趋势。

全场式定量相位显微技术操作简单、测量速度快且能对生物样品进行全场测量,但不能对样品的不同深度逐层成像,获得的只是二维相位分布,并不能直接转换为细胞的形态与结构信息,而结合层析技术的三维定量相位显微技术能够获得高分辨率的三维图像,呈现样品的内部结构以及样品形态,但需通过逐点扫描来实现,速度缓慢,不适合生物样品动力学行为的观察。因此发展一种非扫描式全场三维定量相位显微技术或是在全场式的定量显微技术中寻找一种有效的反演理论和模型来重建样品的三维图像,都是相位显微技术的发展方向。

定量相位显微技术大部分都是基于干涉法,能否对生物细胞进行高速成像或实时测量,主要取决于干涉图采集以及相位恢复的速率,其中相位恢复包括相位提取和可能需要的相位解包裹。就干涉图采集而言,同轴干涉相位显微一般会结合时域相移术分时采集多幅干涉图,而离轴干涉相位显微仅需一幅干涉图像,但以牺牲 CCD 的空间分辨率为代价,因此,发展同步相移干涉显微技术变得尤为重要。虽然目前也有许多研究人员已着力研究同步相移干涉显微技术,也取得了一定的成果,但是其光路结构较复杂,对环境的要求较高。相位恢复是定量相位成像中一个最重要和最实际的问题之一,目前,相位提取方法众多,研究人员也在努力为了测量生物细胞更快速的运动而提出更加快速的方法,例如美国 Bhaduri 等<sup>[50]</sup>于 2012 提出的干涉条纹微分法,其采集速率相比其他方法要快得多,但仅适用于离轴干涉,而且需要过采样来避免噪声的干扰,此外,还需要相位解包裹的过程。其实相位解包裹一方面占据了很大一部分相位恢复的时间,另一方面噪声对相位解包裹有很大的影响,而且不能够很好地对有一定厚度的复杂样品进行解包裹。目前虽然行之有效的双波长测量方法<sup>[57-58]</sup>已成功应用于生物细胞相位显微技术,但它是通过扩大测量范围而免除相位解包裹,因而同时也扩大了测量误差。提出更加有效、快速、适用面广的相位恢复方法也是研究人员追求的目标。

实际上,相位显微技术并不适合对高散射性的较厚的样品进行成像,在绝大部分定量相位成像与定量分析中,薄的生物细胞成为了广泛的研究对象,且忽略细胞的弱吸收性,并看成是相位物体,但已有研究人员经实验证实,生物细胞这种弱吸收样品对入射光还是存在着较明显的吸收效应,而且细胞内的细胞器对光的吸收特性是不同的<sup>[59]</sup>。为此我们需要修正相位恢复方法,重建出更加精确的相位图像,更好地还原细胞的形貌和精细结构。

相位显微技术,尤其是定量相位显微技术在生物细胞显微观察方面发挥着重要的作用,但是整个相位显微仪器设备造价高、使用成本高、维护难,很大程度上限制了对生物细胞的推广运用。因此,商业化开发高推广价值的相位显微设备也是相位显微技术的一个发展方向。

## 5 结束语

生物细胞相位显微技术,尤其是定量相位显微技术,能够完全非侵入式、无损伤地提供生物细胞的结构和动力学信息,为微观领域中像生物细胞这类相位物体的研究提供了有力的手段。定量相位显微技术是多种技术相结合的产物,纵观这十几年的发展,主要围绕高的采集速率、高的横向分辨率、高的时间相位灵敏度、高的空间相位灵敏度、快的相位恢复方法以及三维成像等方面进行研究,并在这些方面都取得了可喜的成绩。相信生物细胞相位显微技术的发展会给生物细胞的深入研究带来新的突破,极大地促进生命科学、生物医学等领域的发展。

### 参考文献

- 1 Jin Weifeng, Wang Yawei, Bu Min, *et al.*. Research progress in phase microscopy for biological cells[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2011, 20(3): 417-424.

- 金卫凤, 王亚伟, 卜敏, 等. 生物细胞相位显微技术研究进展[J]. 激光生物学报, 2011, 20(3): 417-424.
- 2 Xue Liang, Lai Jiancheng, Wang Shouyu, *et al.*. Application of microscopic interferometry for quantitative phase measurement of red blood cells [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, 30(12): 3563-3567.
- 薛亮, 来建成, 王绍均, 等. 显微干涉术在血细胞光相位场定量测量中的应用[J]. 光学学报, 2010, 30(12): 3563-3567.
- 3 Shi Xinlu. *Basic Course of Optical Microscopy and Biological Photography*[M]. Beijing: Science Press, 2002. 55-67.
- 施心路. 光学显微镜及生物摄影基础教程[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 55-67.
- 4 F Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects[J]. *Physica*, 1942, 9(7): 686-693.
- 5 M G Nomarski. Microinterferometre differentiel a ondes polarisees[J]. *J Phys (Paris)*, 1955, 16: S9-S13.
- 6 Bu Min, Lei Haina, Wang Yawei. New progress on detection of biological cells[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, 47(7): 071701.
- 卜敏, 雷海娜, 王亚伟. 生物细胞形态检测光学技术的新进展[J]. 激光与光电子学进展, 2010, 47(7): 071701.
- 7 Ma Lihong, Wang Hui, Jin Hongzhen, *et al.*. Experimental study on quantitative phase imaging by digital holography microscopy[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(3): 0309002.
- 马利红, 王辉, 金洪震, 等. 数字全息显微定量相位成像的实验研究[J]. 中国激光, 2012, 39(3): 0309002.
- 8 D Huang, E A Swanson, C P Lin, *et al.*. Optical coherence tomography [J]. *Science*, 1991, 254 (5035): 1178-1181.
- 9 I Yamaguchi, T Zhang. Phase-shifting digital holography[J]. *Opt Lett*, 1997, 22(16): 1268-1270.
- 10 G Popescu, L P Deflores, J C Vaughan, *et al.*. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics[J]. *Opt Lett*, 2004, 29(21): 2503-2505.
- 11 Z Wang, L Millet, M Mir, *et al.*. Spatial light interference microscopy (SLIM)[J]. *Opt Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- 12 B Bhaduri, D Wickland, R Wang, *et al.*. Cardiomyocyte imaging using real-time spatial light interference microscopy (SLIM)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56930.
- 13 T Nguyen, G Popescu. Spatial light interference microscopy (SLIM) using twisted-nematic liquid-crystal modulation [J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4(9): 1571-1583.
- 14 B Bhaduri, K Tangella, G Popescu. Fourier phase microscopy with white light[J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4(8): 1434-1441.
- 15 N T Shaked, T M Newpher, M D Ehlers, *et al.*. Parallel on-axis holographic phase microscopy of biological cells and unicellular microorganism dynamics [J]. *Appl Opt*, 2010, 49(15): 2872-2878.
- 16 N Lue, W Choi, G Popescu, *et al.*. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy [J]. *Appl. Opt*, 2007, 46(10): 1836-1842.
- 17 E Cucho, F Bevilacqua, C Depeursinck. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging[J]. *Opt Lett*, 1999, 24 (5): 291-293.
- 18 P Marquet, B Rappaz, P J Magistretti, *et al.*. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy[J]. *Opt Lett*, 2005, 30(5): 468-470.
- 19 A Brunn, N Aspert, E Cucho, *et al.*. High speed 3D surface inspection with digital holography[C]. *SPIE*, 2013, 8759: 87593Q.
- 20 Z Monemahghdoust, F Montfort E Cucho, *et al.*. Full field vertical scanning short coherence digital holographic microscope[J]. *Opt Express*, 2013, 21(10): 12643-12650.
- 21 B Kemper, D Carl, J Schneckeburger, *et al.*. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy[J]. *J Biomed Opt*, 2006, 11(3): 034005.
- 22 B Kemper, A Vollmer, C E Rommel, *et al.*. Simplified approach for quantitative digital holographic phase contrast imaging of living cells[J]. *J Biomed Opt*, 2011, 16(2): 026014.
- 23 B Kemper, P Langehaneberg, S Kosmeier, *et al.*. *Digital Holographic Microscopy: Quantitative Phase Imaging and Applications in Live Cell Analysis*[M]. New York: Springer, 2013, Chap 6: 215-257.
- 24 C J Mann, L F Yu, C M Lo, *et al.*. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography[J]. *Opt Express*, 2005, 13(22): 8693-8698.
- 25 X Yu, M Cross, C G Liu, *et al.*. Measurement of the traction force of biological cells by digital holography[J]. *Biomed Opt Express*, 2012, 3(1): 153-159.
- 26 P Ferraro, D Alferi, S D Nicola, *et al.*. Quantitative phase-contrast microscopy by a lateral shear approach to digital

- holographic image reconstruction[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(10): 1405–1407.
- 27 M Paturzo, A Finizio, P Memolo, *et al.*. Microscopy imaging and quantitative phase contrast mapping in turbid microfluidic channels by digital holography[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(17): 3073–3076.
- 28 T Ikeda, G Popescu, R R Dasari, *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems [J]. *Opt Lett*, 2005, 30(10): 1165–1167.
- 29 G Popescu, T Ikeda, R R Dasari, *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(6): 775–778.
- 30 H F Ding, E Berl, Z Wang, *et al.*. Fourier transform light scattering of biological structure and dynamics[J]. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2010, 16(4): 909–918.
- 31 H V Pham, B Bhaduri, K Tangella, *et al.*. Real time blood testing using quantitative phase imaging[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55676.
- 32 B Bhaduri, H Pham, M Mir, *et al.*. Diffraction phase microscopy with white light[J]. *Opt Lett* 2012, 37(6): 1094–1096.
- 33 H V Pham, C Edwards, L L Goddard, *et al.*. Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy[J]. *Appl Opt*, 2013, 52(1): A97–A101.
- 34 K J Chalut, W J Brown, A Wax. Quantitative phase microscopy with asynchronous digital holography[J]. *Opt Express*, 2007, 15(6): 3047–3052.
- 35 N T Shaked, M T Rinehart, A Wax. Dual–interference–channel quantitative–phase microscopy of live cell dynamics[J]. *Opt Lett*, 2009, 34(6): 767–769.
- 36 N T Shaked, Y Z Zhu, M T Rinehart, *et al.*. Two–step–only phase–shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells[J]. *Opt Express*, 2009, 17(18): 15585–15591.
- 37 P Gao, B L Yao, I Harder, *et al.*. Parallel two–step phase–shifting digital holograph microscopy based on a grating pair [J]. *J Opt Soc Am A*, 2011, 28(3): 434–440.
- 38 P Gao, B L Yao, J W Min, *et al.*. Parallel two–step phase–shifting point–diffraction interferometry for microscopy based on a pair of cube beams plitters[J]. *Opt Express*, 2011, 19(3): 1930–1935.
- 39 Z Wang, K Tangella, A B Tissue, *et al.*. Tissue refractive index as marker of disease[J]. *J Biomed Opt*, 2011, 16(11): 116017.
- 40 B Simon, M Debailleul, V Georges, *et al.*. Tomographic diffractive microscopy of transparent samples[J]. *Eur Phys J Appl Phys*, 2008, 44(1): 29–35.
- 41 F Charriere, A Marian, F Montfort, *et al.*. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(2): 178–180.
- 42 L Yu, M K Kim. Wavelength–scanning digital interference holography for tomographic three–dimensional imaging by use of the angular spectrum method[J]. *Opt Lett*, 2005, 30(16): 2092–2094.
- 43 W Choi, C F Yen, K Badizadegan, *et al.*. Tomographic phase microscopy[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 717–719.
- 44 W J Choi, D I Jeon, S G Ahn, *et al.*. Full–field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution[J]. *Opt Express*, 2010, 18(22): 23285–23295.
- 45 N Lue, W Choi, G Popescu, *et al.*. Live cell refractometry using hilbert phase microscopy and confocal reflectance microscopy[J]. *J Phys Chem A*, 2009, 113(47): 13327–13330.
- 46 B Rappaz, P Marquet E Cuhe, *et al.*. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy[J]. *Opt Express*, 2005, 13(23): 9361–9373.
- 47 X F Meng, L Z Cai, X F Xu, *et al.*. Two–step phase–shifting interferometry and its application in image encryption[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(10): 1414–1416.
- 48 M Takeda, H Ina, S Kobayashi. Fourier–transform method of fringe–pattern analysis for computer–based topography and interferometry[J]. *J Opt Soc Am*, 1982, 72(1): 156–160.
- 49 S K Debnath, Y Park. Real–time quantitative phase imaging with a spatial phase–shifting algorithm[J]. *Opt Lett*, 2011, 36(23): 4677–4679.
- 50 B Bhaduri, G Popescu. Derivative method for phase retrieval in off–axis quantitative phase imaging[J]. *Opt Lett*, 2012, 37(11): 1868–1870.
- 51 Y Y Xu, Y W Wang, W F Jin, *et al.*. A new method of phase derivative extracting for off–axis quantitative phase imaging [J]. *Opt Commun*, 2013, 305: 13–16.

- 52 M Mitome, K Ishizuka, Y Bando. Quantitativeness of phase measurement by transport of intensity equation[J]. J Electron Microsc, 2010, 59(1): 33-41.
- 53 C Zuo, Q Chen, W J Qu, *et al.*. Noninterferometric single-shot quantitative phase microscopy[J]. Opt Lett, 2013, 38(18): 3538-3541.
- 54 A Anand, V Chhaniwal, B Javidi. Quantitative cell imaging using single beam phase retrieval method[J]. J Biomed Opt, 2011, 16(6): 060503.
- 55 Wang Haiyan. Study on Phase Retrieval Algorithm and Its Application[D]. Hefei: Anhui University, 2011. 22-26.  
王海燕. 相位恢复算法及应用研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2011. 22-26.
- 56 Xu Yuanyuan, Wang Yawei, Jin Weifeng, *et al.*. Study on phase characteristics of white blood cells and their optical models[J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504001.  
徐媛媛, 王亚伟, 金卫凤, 等. 白细胞光学模型及其相位分布特征分析[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504001.
- 57 D Parshall, M K Kim. Digital holographic microscopy with dual-wavelength phase unwrapping[J]. Appl Opt, 2006, 45(3): 451-459.
- 58 Wang Yujia, Jiang Zhuqing, Gao Zhirui, *et al.*. Investigation on phase unwrapping in dual-wavelength digital holography [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(10): 1009001.  
王羽佳, 江竹清, 高志瑞, 等. 双波长数字全息相位解包裹方法研究[J]. 光学学报, 2012, 32(10): 1009001.
- 59 S Y Wang, L Xue, J C Lai, *et al.*. Phase retrieval method for biological samples with absorption[J]. J Opt, 2013, 15(7): 075301.