

定量干涉显微流式细胞仪的研究与设计

闫克丁¹, 薛亮^{2*}, 黄华川³, 王绥琦⁴

¹西安工业大学电子信息工程学院, 陕西 西安 710032;

²上海电力学院电子与信息工程学院, 上海 200090;

³中国工程物理研究院流体物理研究所, 四川 绵阳 621900;

⁴江南大学理学院光电信息科学与工程系, 江苏 无锡 214122

摘要 生物细胞的成像是生物和物理领域中的重要研究方向, 尤其是大量细胞的测量与分析对于生物研究、疾病诊断具有重要的研究价值和意义。传统的显微检测仅局限于细胞形状的定性观察, 且受视场限制, 观察的细胞数量难以达到统计要求。将定量干涉显微和视场扫描结合, 设计并实现了用于大量细胞成像与分析的定量干涉显微流式细胞仪。定量干涉显微可以恢复细胞的相位分布, 结合视场扫描可以对大量细胞信息进行获取与分析。分别选用扩展主程序分析算法、正则化光学流场算法和傅里叶相位恢复算法, 并结合不同的扫描方式, 实现了对大量细胞相位面积、相位体积和圆率等不同参数的测量与统计。该系统有望在大通量高速细胞检测中获得应用。

关键词 全息; 定量干涉显微; 流式细胞仪; 定量相位分布; 细胞参数

中图分类号 Q63

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.120901

Research and Design of Quantitative Interferometric Microscopic Cytometer

Yan Keding¹, Xue Liang^{2*}, Huang Huachuan³, Wang Shouyi⁴

¹School of Electronic Information Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an, Shaanxi 710032, China;

²College of Electronics and Information Engineering, Shanghai University of Electric Power, Shanghai 200090, China;

³Institute of Fluid Physics, China Academy of Engineering Physics, Mianyang, Sichuan 621900, China;

⁴Department of Optoelectric Information Science and Technology, School of Science,

Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract Bio-cell imaging is one of the important research directions in the biological and physical fields, especially the measurement and analysis of large amount of cells have major research value and significance in the bio-research and disease-diagnosis. However, the traditional microscopic detection is only restricted to the qualitative observation of cellular contours. Moreover, the amount of measurement samples is difficult to satisfy the statistical requirements due to the limitation of field of view. Thus a quantitative interferometric microscopic cytometer is designed based on the combination of quantitative interferometric microscopy and field of view scanning, and is used for the imaging and analysis of large amount of cells, in which the quantitative interferometric microscopy is capable of retrieving the cellular phase distribution, and of obtaining and analyzing a large amount of cellular information by combining the field of view scanning. The expanded principle component analysis algorithm, regularized optical flowing algorithm and Fourier phase retrieval algorithm are used, respectively. In addition, the different scanning modes are also combined, and thus the measurements and statistics of phase area, phase volume, circle ratio and other parameters of cells are obtained. The whole system is expected to obtain applications in high-throughput and high-speed cellular detection.

Key words holography; quantitative interferometric microscopy; cytometer; quantitative phase distribution; cellular parameter

OCIS codes 090.2880; 170.0180; 170.0110; 120.5050

收稿日期: 2018-04-16; 修回日期: 2018-05-26; 录用日期: 2018-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(11404207, 11747119)、上海电力学院科研启动基金(K2014018)、江南大学自主科研计划青年基金

* E-mail: xueliangokay@gmail.com

1 引言

在生物医学领域,细胞参数的测量与统计具有重要的研究意义和价值。对大量的细胞参数进行测量与统计,是定量分析与评估细胞物理形态、生命特征的基础,可为生物研究、医学诊断提供重要的参考依据。目前,一般采用流式细胞仪对大量的细胞参数进行测量与统计,其主要是通过荧光强度来实现细胞中特定物质含量的测量。然而,流式细胞仪是一种零分辨率的测量装置,它无法对细胞进行成像,故而无法直观地分析更多的细胞细节信息。细胞的直观形态特征是了解细胞状态的直观参量,如通过对血红细胞形貌的判断,可以实现糖尿病、疟疾和地中海贫血的定量诊断,因此将细胞成像引入到大量细胞参数的测量与统计中具有重要价值与意义^[1-3]。传统的显微测量工具仅能对细胞的轮廓进行观察,而且由于细胞通常对可见光的吸收较小,因此其成像的对比度不明显。虽然相衬显微、微分干涉相衬显微等技术可以有效地对非染色的相位物体实现高对比度清晰成像,但仍无法获取物体的定量相位分布^[4]。另外,受显微成像视场的限制,上述技术单次观察的采样细胞数量较少,难以满足统计的需求。因此,探索和设计一种可以定量测量细胞形状参数,并且能够对大量细胞实现测量与统计的成像系统具有重要意义。

国际上许多研究组针对这一需求开展了一系列研究。Greenbaum 等^[5]基于无透镜数字全息技术对大量细胞实现了定量观测。该系统的优势是可以对极大视场内的细胞实现快速测量,并进行统计,而且无需对样品进行扫描。然而该方法对样品的放大率有限,这会丢失较多的样品细节信息。为了实现大量细胞进行测量,同时又能够获取更丰富的细节信息,研究人员先后开发了一系列新颖的细胞扫描方式,如:Ramachandraiah 等^[6]设计了基于数字化视频光盘(DVD)播放器的细胞高通量扫描检测系统,该系统采用传统的 DVD 读写头对加载在 DVD 上的细胞进行成像;Mir 等^[7]同样借助 DVD 旋转扫描,并结合干涉测量的方式获得了细胞的定量相位分布。这些系统可以被称为 DVD 上的实验室。这一类扫描可以归类于机械扫描,该扫描方法的优势是扫描精度可控,并且能够保证样品在同一焦面上成像;不过其缺点也显而易见,即需要结构复杂的机械扫描系统进行控制。另外,其扫面速度通常较慢,难以实现对大量细胞的快速扫描成像。di

Caprio 等^[8-9]设计的生物光学检测系统可以自动识别大量样品的生物信息,并追踪样品的三维轨迹。Rappaz 等^[10-11]设计了一种精巧的设备,该设备可以快速检测大量血细胞。近些年来,芯片实验室得到了广泛关注与研究,结合芯片实验室的概念,再结合光学微流,可以对流动的大量生物细胞进行扫描成像^[12]。Cui 等^[13-14]基于光学微流装置的芯片实验室,结合微孔阵列,实现了生物细胞的超高分辨率成像。Schonbrun 等^[15-18]结合荧光和细胞的吸收特性,利用光学微流装置实现了生物细胞的多模式成像。相较于机械扫描,使用光学微流对细胞实现视场扫描的装置更简单,也较容易实现;但该扫描方式难以保持细胞的稳定状态,仅能用于细胞的瞬态成像与测量。

为了实现大量细胞的成像与分析,本课题将定量干涉显微与扫描相结合设计了细胞测量统计装置,该装置基于定量干涉显微系统,为离轴干涉,可以记录被测样品的相位分布,并可将其反映于干涉条纹中。使用相位恢复方法可以从干涉图中获取被测样品的真实相位分布^[19-21]。本文分别介绍了本课题组所设计的 3 种基于视场扫描的定量干涉显微流式细胞仪:基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪、基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪以及重力驱动的定量干涉显微流式细胞仪。这一系列定量干涉显微流式细胞仪分别基于机械扫描和微流扫描实现对大量细胞定量相位的测量,并且根据测量的相位分布,再结合细胞识别与统计,还能够对单个细胞的相位面积、相位体积、圆率和血红蛋白含量等一系列参数进行测量^[22]。第 2~4 节分别对应介绍了基于扩展主程序分析相位恢复算法、基于正则化光学流场相位恢复算法和重力驱动的定量干涉显微流式细胞仪,并采用这 3 种定量干涉显微流式细胞仪对大量血红细胞的参数进行了测量。最后,总结了这 3 种定量干涉显微流式细胞仪的特点和适宜的应用场合。

2 基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪

定量干涉显微流式细胞仪结合了离轴干涉技术和显微技术,可以实现对被测样品的放大和相位记录。然而,因受到显微物镜视场的限制,其视场较小,仅能在视场中观察到个别血红细胞。因此,这里使用视场扫描的方法来扩大测量范围,从而获取更多的被测样品的定量信息。视场扫描的示意图如图 1 所示^[19]。

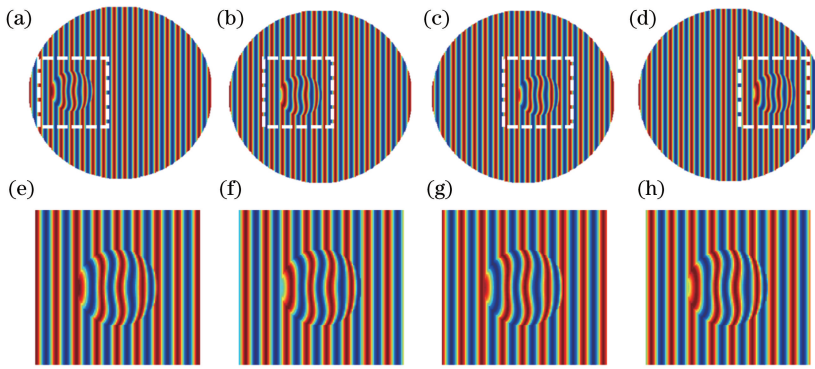


图1 (a)~(d)视场扫描时不同位置上的红细胞;(e)~(h)对应(a)~(d)中白色虚线框中的亚视场干涉图
Fig. 1 (a)-(d) Red blood cells at different positions during field of view scanning; (e)-(h) interferograms in sub-field of view corresponding to those in dashed boxes of (a)-(d)

在图1中,条纹弯曲处意味着有一个相位物体,即一个红细胞模型,其在柱坐标系下的表达式为

$$z(\rho) = \left[-\left(\frac{\rho}{a}\right)^2 \right]^{1/2} \cdot \left[0.72 + 4.152 \left(\frac{\rho}{d}\right)^2 - 3.426 \left(\frac{\rho}{d}\right)^4 \right], \quad (1)$$

式中: ρ 为平面极坐标; d 为细胞直径。该模型表达式是根据大量红细胞的测量总结得出的。该模型为一凹形圆盘,直径为 $7.65 \mu\text{m}$,最大厚度为 $2.88 \mu\text{m}$,中心凹处的厚度最小,为 $1.44 \mu\text{m}$ 。该模型的内部结构均匀,是折射率均匀的物体^[23]。其相位 φ 与厚度的关系为

$$\Delta\varphi = \frac{\Delta n T}{\lambda}, \quad (2)$$

式中: T 为红细胞的厚度; λ 为测量光源的波长; Δn 为红细胞折射率与折射率液(生理盐水)的差。一般红细胞的折射率在1.40左右,生理盐水的折射率约为1.34。

当对含有红细胞的样品在显微物镜的焦面处进行扫描时,在不同的时刻,红细胞处于不同的位置,如图1(a)~(d)所示。根据机械扫描的步进距离,在整个视场中选择相同大小的亚视场,如图1(e)~(h)所示。这一系列亚视场的干涉图可以看作是同一“视场”内的移相干涉图。通过移相相位恢复解法可以得到细胞的定量相位分布。

基于移相相位的恢复解法一般无需时域频域转换,因此不涉及频谱泄漏等基于快速傅里叶变换相位恢复等传统算法的弊端,而且其实现简单,计算方便。然而其劣势是通常需要对多张干涉图进行相位求解。这里,使用具有较高采集速率的电荷耦合器件(CCD)摄像机,结合视场扫描可以很容易地获取如图1(e)~(h)所示的“移相”干涉图。然而,这些

亚视场干涉图之间的移相角度却难以精确获得。因此,这里采用扩展的主程序分析相位恢复算法来实现被测样品的相位求解,该算法的最大优点是无需获取干涉图之间的相位信息即可得到相位分布,其主要原理如下。

离轴干涉图的表达式为

$$I_n(x, y) = a(x, y) +$$

$$b(x, y) \cos [k \cdot r + \varphi(x, y) + \delta_n], \quad (3)$$

式中: I_n 为亚视场中的移相干涉图; a 和 b 分别为零频与余弦调制分量的强度系数; k 为离轴频率; r 为干涉图空间位置; φ 为被测样品的相位; δ_n 为等效移相角。通过均值计算可以消去多幅亚视场干涉图的零频分量,即

$$I'_n(x, y) = b(x, y) \cos [k \cdot r + \varphi(x, y) + \delta_n]. \quad (4)$$

将多幅消除背景的移相干涉图的行向量按照列组合形成矩阵,即

$$\mathbf{I}'_{\text{matrix}} = [I'_1 \quad I'_2 \quad \cdots \quad I'_n]^T. \quad (5)$$

该矩阵的协方差矩阵为

$$\mathbf{C} = (\mathbf{I}'_{\text{matrix}}) (\mathbf{I}'_{\text{matrix}})^T. \quad (6)$$

将该协方差矩阵对角化得到

$$\mathbf{D} = \mathbf{U} \mathbf{C} \mathbf{U}^T, \quad (7)$$

式中: \mathbf{D} 为对角化协方差矩阵; \mathbf{U} 为正交变换矩阵。主成分 \mathbf{P} 为

$$\mathbf{P} = \mathbf{U} \mathbf{I}'_{\text{matrix}}, \quad (8)$$

式中:矩阵 \mathbf{P} 的第1列和第2列分别代表主成分的正交特征值,该正交特征值分别为 P_s 和 P_c 。

得到正交特征值之后,带有包裹的相位便可以通过反正切函数求得:

$$\Phi = \arctan \frac{P_s}{P_c}. \quad (9)$$

再综合使用相位解包算法便可以获取亚视场内的定量相位分布。更为详细的算法原理与步骤可参见参考文献[19,24-25]。

根据扩展主程序分析相位恢复算法可以由亚视场干涉图求解其对应的定量相位分布,结果如图2所示。

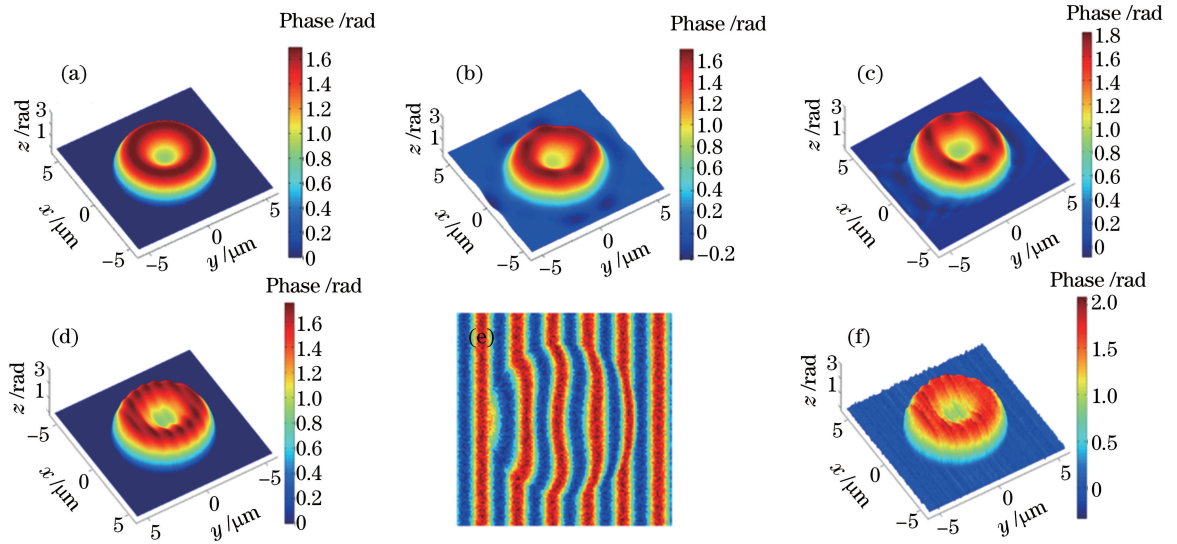


图2 红细胞模型定量相位分布。(a)根据(2)式得到的红细胞模型定量相位分布;(b)传统的基于快速傅里叶变换相位恢复算法得到的红细胞模型定量相位分布;(c)传统的基于希尔伯特变换相位恢复算法得到的红细胞模型定量相位分布;(d)根据扩展主程序分析相位恢复算法得到的红细胞模型定量相位分布;(e)含有噪声的干涉图;(f)噪声情况下,根据扩展主程序分析相位恢复算法得到的红细胞模型定量相位分布

Fig. 2 Quantitative phase distributions of red blood cell model. (a) Quantitative phase distribution of red blood cell model obtained according to equation (2); (b) quantitative phase distribution recovered by traditional phase retrieval algorithm based on fast Fourier transform; (c) quantitative phase distribution recovered by traditional phase retrieval algorithm based on Hilbert transform; (d) quantitative phase distribution recovered by expanded principle component analysis phase retrieval algorithm; (e) interferogram with noise; (f) quantitative phase distribution recovered by expanded principle component analysis phase retrieval algorithm with noise

图2(a)为红细胞模型的定量相位分布,图2(b)和图2(c)分别为使用基于快速傅里叶变换^[26]和希尔伯特变换相位恢复算法^[27-30]得到的红细胞模型定量相位分布,而图2(d)展示了使用扩展主程序分析相位恢复算法得到的红细胞模型定量相位分布。可以看出,三者都能够很好地恢复出红细胞模型的基本结构。为了定量、精确地比较3种方法的相位恢复精度,这里使用相关系数分别计算图2(b)、图2(c)、图2(d)与图2(a)的相似度。虽然图2(d)展示的相位略有起伏,但其相关系数为0.9999,非常接近于1,说明其准确度较高。而图2(b)和图2(c)的相关系数分别只有0.9879和0.9969,因为基于希尔伯特变换相位恢复算法保留了相位的高频信息,即被测样品的细节,因此其相位恢复精度更高,但是仍低于使用扩展主程序分析相位恢复算法得到的结果。另外,在含有噪声的情况下,依旧使用扩展主程序分析相位恢复算法进行相位恢复计算。图2(e)展示了含有噪声的干涉图,其

峰值信噪比为15 dB,与实验中获取的干涉图的估计峰值信噪比一致。在未进行去噪处理的情况下,同样使用扩展主程序分析相位恢复算法求解红细胞模型定量相位分布,如图2(f)所示,得到的结果虽然起伏明显,但仍然能够呈现红细胞的中心凹结构。该结果说明扩展主程序分析相位恢复算法可以用于定量干涉显微流式细胞仪中。

图3为定量干涉显微流式细胞仪的示意图,其结构为马赫-曾德尔干涉光路。其中的TRM为全反镜。光源为氩氦激光器,其模式稳定,适宜用于干涉测量,并且在该波长下,生物样品对其散射吸收不明显。使用共轭显微镜系统实现生物细胞的波前放大。其中,物光经过分光镜后进入样品室,样品室通过精密平移台(未在图中画出)调节进入物光的视场,该方案主要是为了保证样品室水平放置,防止红细胞因受重力影响而在扫描过程中移动。图4展示了使用基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪采集的干涉图和相位恢复结果。

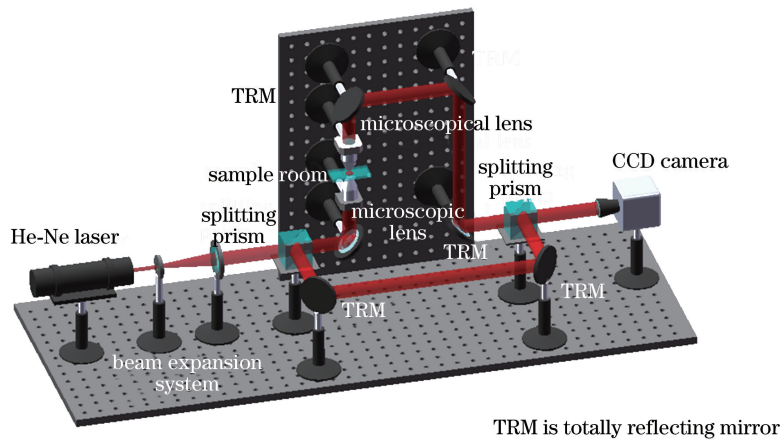


图3 基于机械扫描的定量干涉显微流式细胞仪

Fig. 3 Scheme of quantitative interferometric microscopic cytometer based on mechanic field of view scanning

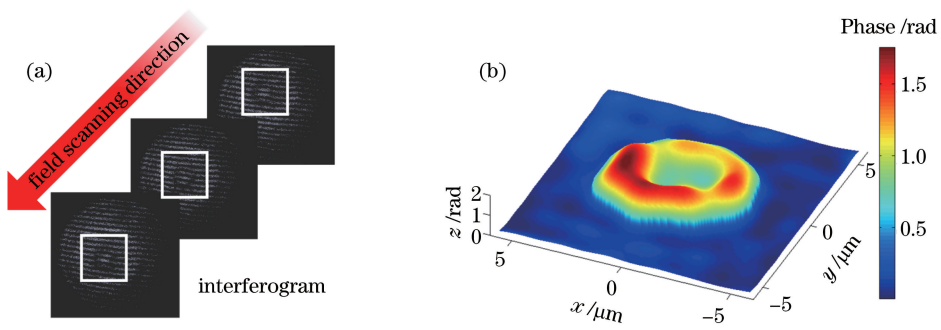
图4 (a)基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪采集的干涉图；
(b)相位恢复后的红细胞定量相位分布

Fig. 4 (a) Interferograms captured by quantitative interferometric microscopic cytometer with phase retrieval algorithm based on expanded principle component analysis; (b) quantitative phase distribution of red blood cell after phase retrieval

实验中采用健康兔子的红细胞作为样品(样品由江苏省农业科学院提供)。全血样品经过多次离心后去除白细胞和血小板成分,得到的红细胞作为被测样品置于由两片盖玻片制作的样品室中,使用质量分数为0.9%的生理盐水作为折射率液,以保证细胞的活性。图4(a)为使用基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪采集的干涉图,图4(b)展示了相位恢复后的红细胞定量相位分布。该相位分布满足红细胞的中心凹结构,实验结果验证了基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪能够较好地获取被测生物样品的定量相位分布。此外,该算法的相位计算效率较高,使用同一计算平台计算100组移相干涉图,每组10幅移相干涉图($256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$),主成分分析相位恢复算法的运算时间为0.7729 s,基于快速傅里叶变换相位恢复算法的运算时间为0.9984 s。然而,基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪的细胞检测效

率依旧受制于机械扫描速率,这是因为该相位恢复算法需要多幅(一般5~10幅)干涉图用于相位求解,因此降低了扫描效率,其扫描 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的视场需要约282 s(15次独立实验数据的平均值)。

3 基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪

基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪虽然能够较好地恢复细胞的定量相位分布,但其受限于机械扫描速率而难以对大范围样品实现快速扫描成像。为了实现对生物样品的快速高通量成像检测,这里在以上研究的基础上对相位恢复算法进行改进,仅使用两幅干涉图便能恢复出被测样品的定量相位分布。该算法实际上是改进的基于二维希尔伯特变换的相位恢复算法,不仅与传统的希尔伯特变换算法一样保留了更加丰富的样品细节信息,同时还考虑了干涉条纹的弯曲方向角,从而克服了传统的基于希尔伯特变换的相位恢复算

法仅局限于一维信号处理的弊端。该算法的核心原理是二维希尔伯特变换,即

$$\mathcal{F}^{-1}\{\exp[i\theta(u,v)]\mathcal{F}\{b(x,y)\cos[\varphi(x,y)]\}\} = \text{iexp}[i\beta(x,y)]b(x,y)\sin[\varphi(x,y)], \quad (10)$$

式中: \mathcal{F} 和 \mathcal{F}^{-1} 分别为快速傅里叶变换及其逆变换; $b(x,y)\cos[\varphi(x,y)]$ 为干涉图中的余弦调制分量; $b(x,y)\sin[\varphi(x,y)]$ 为其对应的正交分量; $\beta(x,y)$ 为干涉图条纹角度; $\theta(u,v)$ 为一螺旋相位分布,即

$$\exp[i\theta(u,v)] = \frac{u + iv}{\sqrt{u^2 + v^2}}. \quad (11)$$

传统的基于一维希尔伯特变换的相位恢复算法忽略了干涉图条纹角度,认为其值为0,而在基于一维希尔伯特变换的相位恢复算法中,考虑了这一项

对相位恢复的影响。

基于采集到的干涉图通过简单的均值计算可以消去多幅亚视场干涉图的零频分量,从而可以获取其余弦调制分量 $b(x,y)\cos[\varphi(x,y)]$;然后根据二维希尔伯特变换,便可以得到其对应的正交分量 $b(x,y)\sin[\varphi(x,y)]$;继而求取反正切并结合相位解包及相位消倾斜算法,就可以得到被测样品的定量相位分布。根据(10)式求解干涉条纹的角度 $\beta(x,y)$ 是获取正交调制分量的关键。

这里,采用基于正则化光学流场相位恢复算法求解该条纹角度,与图1类似。然而,使用该方法仅需两幅干涉图便可以获取最终的样品相位,如图5所示^[20]。

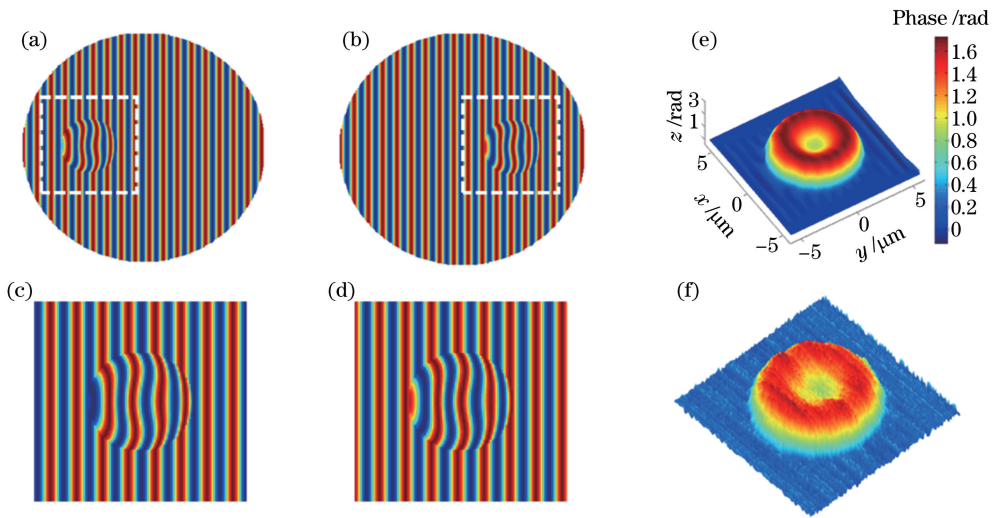


图5 (a)(b)视场扫描时在不同位置的血红细胞;(c)(d)对应(a)(b)中白色虚线的亚视场干涉图;(e)基于正则化光学流场相位恢复算法得到的被测样品相位;(f)噪声情况下,基于正则化光学流场相位恢复算法得到的血红细胞模型定量相位分布

Fig. 5 (a)(b) Red blood cells at different positions during field of view scanning; (c)(d) interferograms in sub-field of view corresponding to those in dashed boxes of (a) and (b); (e) phase of measured sample recovered by phase retrieval algorithm based on regularized optical flowing; (f) quantitative phase distribution of red blood cell model recovered by phase retrieval algorithm based on regularized optical flowing with noise

图5(a)~(b)分别展示了整个视场内同一血红细胞模型在不同位置的干涉条纹分布。若仿照基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪的亚视场选择方式,这里仅需要选择两个亚视场,两者间距为步进电机的扫描速率和CCD摄像机采集图像的间隔时间。图5(c)和图5(d)分别是图5(a)与图5(b)的亚视场干涉图。同上所述,这两幅干涉图同样可以看作是移相角未知的移相干涉图,通过对这两幅干涉图梯度求解,可以获取干涉条纹的角度 $\beta(x,y)$,详细步骤可以参见参考文献^[20,31]。将求解得到的 $\beta(x,y)$ 代入(10)式得到正交的干涉调制分量,继而利用反正切及后续处理

方式,就可以得到被测样品的定量相位分布,如图5(e)所示。其与图2(a)所示的血红细胞模型相位的相关系数为0.9977,高于传统的基于一维希尔伯特变换的相位恢复算法,但是由于其仅使用两幅移相干涉图便可以恢复被测样品的定量相位分布,相比于基于扩展主程序分析相位恢复算法,牺牲了部分相位恢复精度,不过仍然可以得到较为精确的血红细胞形貌。另外,这里同样验证了该算法在含有噪声情况下的相位恢复精度,在峰值信噪比为15 dB的情况下,未进行去噪处理求解的相位如图5(f)所示。虽然因为噪声的缘故最终的相位含有起伏,不过仍较好地保持了血红细胞的形貌特征。

同样,使用图 3 所示的基于机械扫描的定量干涉显微流式细胞仪对血红细胞进行测量,被测样品仍是按照标准处理程序处理过的兔子血红细胞。图 6(a)展示了实验的测量流程,通过调整步进电机的步进速率与 CCD 采集时刻,使两个亚视场在

不同时刻对应于同一视场范围,继而使用基于正则化光学流场相位恢复算法计算被测样品的定量相位分布,如图 6(c)~(e)所示。其中同一批次的血红细胞在微分干涉相衬显微镜下的形貌如图 6(b)所示。

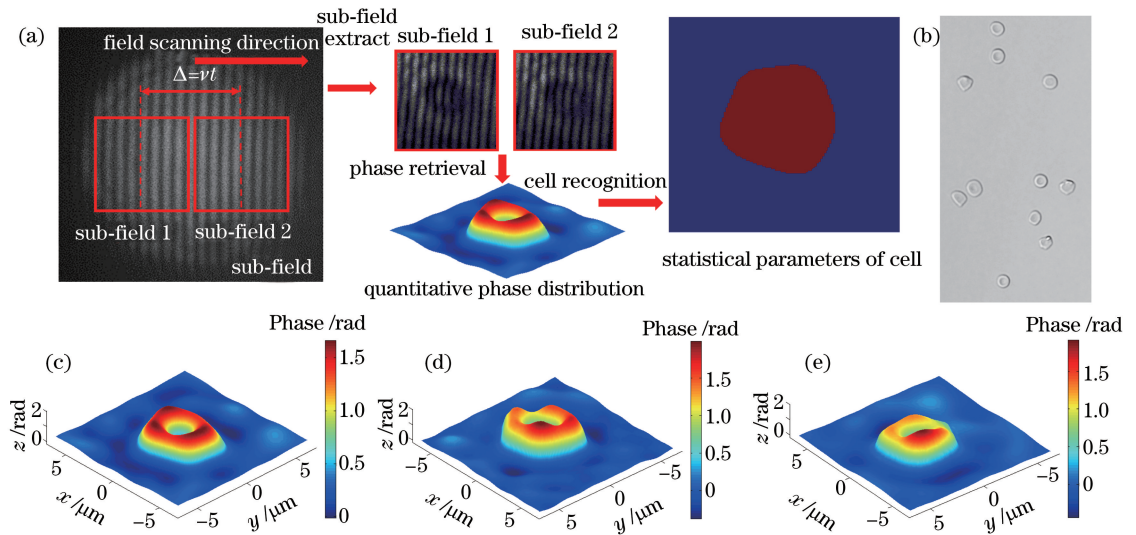


图 6 (a)基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪的操作步骤;(b)同一批次血红细胞的微分干涉相衬显微结果;(c)~(e)基于正则化光学流场相位恢复算法计算得到的被测样品的定量相位分布

Fig. 6 (a) Processing steps of quantitative interferometric microscopic cytometer with phase retrieval algorithm based on regularized optical flowing; (b) the same batch of red blood cells at differential interferometric contrast microscopy; (c)-(e) quantitative phase distributions of the measured sample recovered by phase retrieval algorithm based on regularized optical flowing

从实验结果可以看出,基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪可以很好地恢复被测样品的定量相位分布,而且相较于基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪,其所需信息量更少,有效缩短了扫描时间,提高了扫描精度。同样扫描 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的视场,其仅需要约 100 s (15 次独立实验数据的平均值)。不过,其依旧受到机械扫描速率的制约,难以实现更加快速的扫描成像。

4 重力驱动定量干涉显微流式细胞仪

以上所介绍的两种定量干涉显微流式细胞仪皆是基于机械扫描,该方式的优势是可以保持扫描过程中被测样品的稳定,并且样品室固定在显微物镜的焦平面上,可以获得更高的放大倍率和成像效果。然而,使用机械扫描的定量干涉显微流式细胞仪明显受限于步进电机的扫描速率。此外,电机的振动同样会给干涉系统带来噪声。为了进一步提高定量

干涉显微流式细胞仪的扫描效率,本课题组改进了原有的扫描成像光路,如图 7 所示^[21],该扫描成像系统是基于马赫-曾德尔干涉仪研制的,做出的调整仅是将一对共轭物镜水平放置,而含有细胞的样品室竖直放置。该样品室由两片盖玻片胶合而成,血红细胞在重力作用下会朝下流动,使用高速互补金属氧化物半导体(CMOS)摄像机对其进行采集,可以获取一系列不同细胞的干涉图。

由于血红细胞呈扁平状,在重力作用下,其在样品室中的流动会带有自身的转动。因此,为了实现血红细胞高通量快速相位成像,选择基于单幅离轴干涉图的相位恢复算法。综合考虑计算速率与信噪比,这里选择传统的基于快速傅里叶变换的相位恢复算法对干涉图进行处理,实现对血红细胞样品的定量相位成像。这样做虽然牺牲了相位恢复的计算精度,但该算法保证了较高的采集效率和信噪比。实现重力驱动定量干涉显微流式细胞仪的流程如图 8 所示。

运用该重力驱动的扫描成像系统对大量血红细

胞样品进行信号采集与相位测量,被测样品仍是按照标准处理程序处理过的兔子红细胞。图9展示了一部分采用该重力驱动定量干涉显微流式细胞仪得到的红细胞定量相位分布,图9(a)为该批次红细胞微分干涉相衬显微镜的结果,该显微图非

常清晰地呈现了血红细胞的双凹型结构。图9(b)~(f)则展示了测量的部分红细胞样品的定量相位分布,其满足典型的红细胞特征,该结果也证明了重力驱动定量干涉显微流式细胞仪可以实现对生物细胞的大通量高速成像检测。

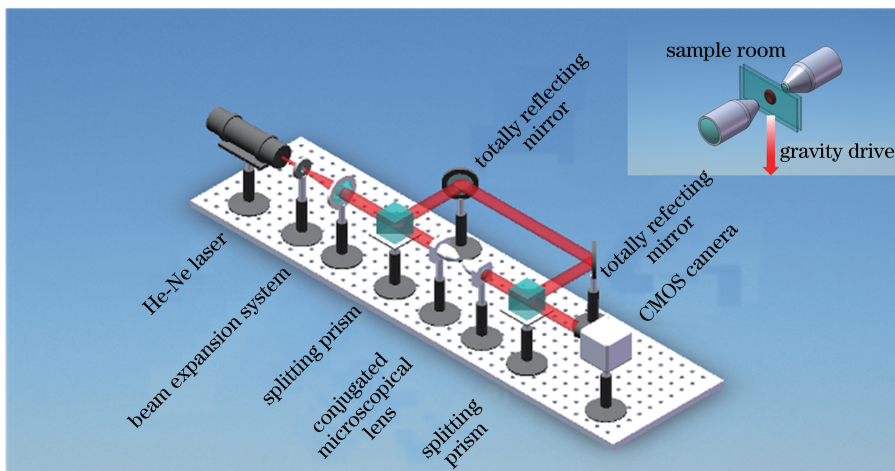


图7 重力驱动定量干涉显微流式细胞仪示意图

Fig. 7 Schematic of gravity-driven quantitative interferometric microscopic cytometer

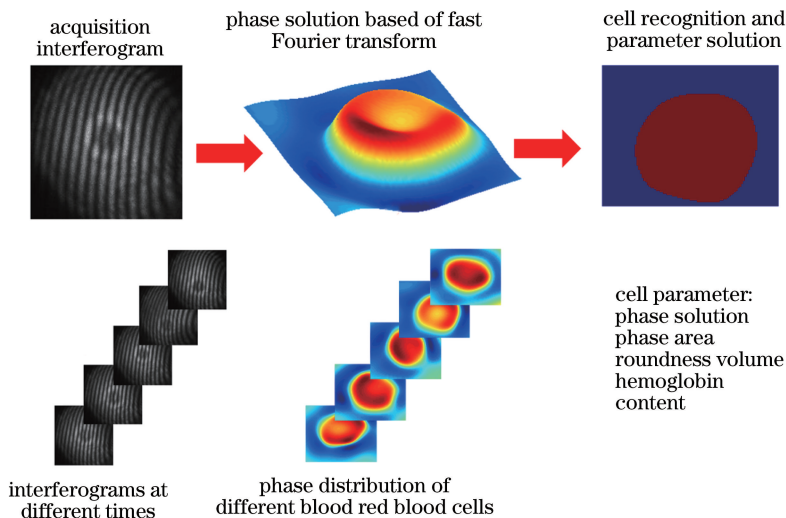


图8 重力驱动定量干涉显微流式细胞仪实现细胞高通量高速检测的流程

Fig. 8 Procedure of high-throughput and high-speed cell detection with gravity-driven quantitative interferometric microscopic cytometer

另外,相较于之前介绍的基于机械扫描的定量干涉显微流式细胞仪,重力驱动的扫描成像系统实验光路更为简单紧凑,无需光路折转与步进电机扫描。此外,该系统还避免了由步进电机振动而造成的噪声污染。更为重要的是,重力驱动定量干涉显微流式细胞仪具有更高的扫描速率。该系统仅需80 s便可捕捉到超过100个红细胞样品,若是提高流动的红细胞浓度,还能够进一步提高测量

效率。

5 各类定量干涉显微流式细胞仪的分析与比较

将定量干涉显微与样品扫描相结合,其主要目的是实现对大量被测生物样品的统计与分析。这类定量干涉显微流式细胞仪与传统基于荧光或散射强度分析的流式细胞仪不同,前者是基于被测样品定

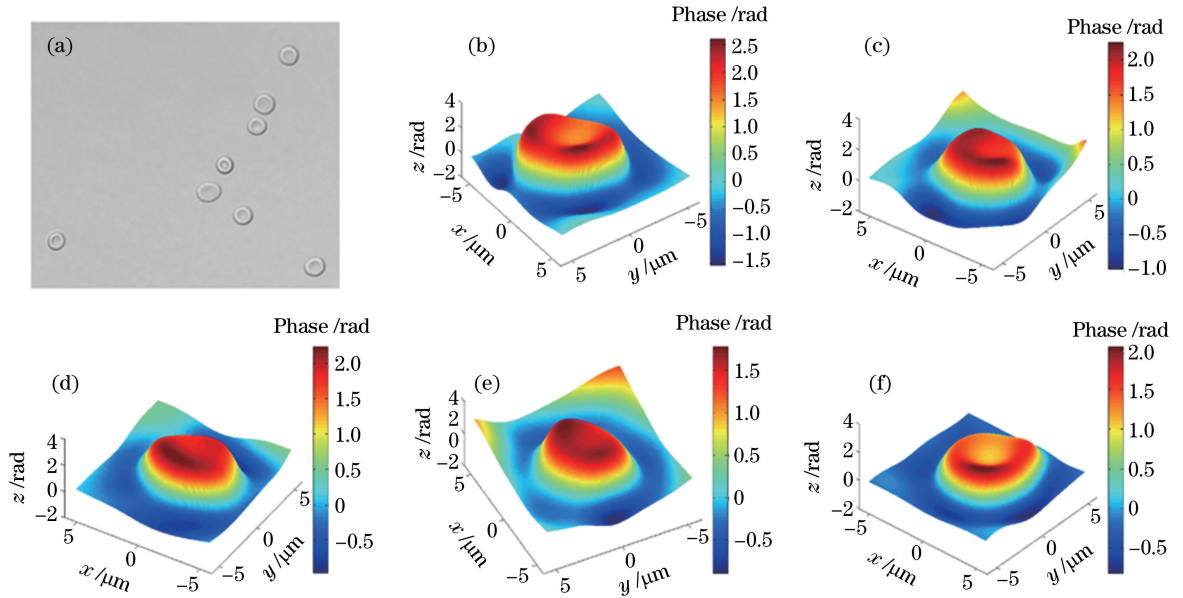


图 9 (a) 微分干涉相衬显微镜下的同批次红细胞样品;

(b)~(f) 重力驱动定量干涉显微流式细胞仪得到的不同红细胞定量相位分布

Fig. 9 (a) Same batch of red blood cell samples at differential interferometric contrast microscopy; (b)-(f) quantitative phase distributions of different red blood cells obtained by gravity-driven quantitative interferometric microscopic cytometer

量干涉相位分布来实现对样品各类参数的分析。这里,使用定量干涉流式细胞仪对兔子红细胞进行测量与统计,主要对以下参数进行测量与分析。

1) 相位面积

相位面积等效于红细胞所占的面积,反映了红细胞的尺寸、直径等定量信息,表达式为

$$S_{PA} = \sum_{i=1}^N \Delta S, \quad (12)$$

式中: N 为被测样品所占的像素点数; ΔS 为单个像素点对应的面元面积。

2) 相位体积

相位体积为红细胞折射率与外界折射率液差值导致的相位差值的积分,即定量干涉相位分布 φ 在被测样品面积内的积分,表达式为

$$V_{PV} = \sum_{i=1}^N \varphi_i \Delta S. \quad (13)$$

相位体积可以定量反映生物样品的形貌与体积。尤其是对于红细胞而言,其折射率分布均匀,因此相位体积能够精确地反映红细胞的体积信息。

3) 细胞形态参数

细胞形态参数包括等效直径 d_{eq} 、周长 C 、最大直径 d_{max} 、最小直径 d_{min} 、偏心率 E 以及圆率 V_{FF} 等参数。将红细胞面积等效为正圆,则该正圆对应的直径称为等效直径,表达式为

$$d_{eq} = 2 \sqrt{\frac{V_{PA}}{\pi}}. \quad (14)$$

细胞周长对应红细胞轮廓线的面积,最大、最小直径则是红细胞最大与最小的直径长度,偏心率可以由其最大、最小直径得出:

$$E = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max} + d_{min}}. \quad (15)$$

偏心率的范围在 0 到 1 之间,偏心量越接近 0,说明细胞形状越趋近于圆,否则越趋近于椭圆。同偏心率一样,圆率也可以用来描述细胞形状与正圆的趋近度,表达式为

$$V_{FF} = 4\pi \frac{S_{PA}}{C^2}. \quad (16)$$

4) 平均红细胞血红蛋白

红细胞主要由血红蛋白组成,平均红细胞血红蛋白可由红细胞的定量相位分布计算得到

$$V_{MCH} = \frac{10\lambda V_{PV}}{2\pi\alpha_{HB}}, \quad (17)$$

式中: α_{HB} 为血红蛋白折射增量,其在 632.8 nm 波长下约为 0.002 dL/g。

基于定量干涉显微流式细胞仪先后对多批红细胞进行了扫描成像与测量,其主要结果如图 10 所示。

使用定量干涉显微流式细胞仪得到 181 个有效被测红细胞,其相位面积与相位体积的关系如

图 10(a)所示。相位面积平均值为 $38.98 \mu\text{m}^2$, 标准差为 $3.29 \mu\text{m}^2$; 相位体积平均值为 $40.33 \text{rad}\cdot\mu\text{m}^2$, 标准差为 $3.31 \text{rad}\cdot\mu\text{m}^2$ 。两者成线性关系, 拟合关系式为 $V_{\text{PV}} = 0.77S_{\text{PA}} + 10.23$, 如图 10(a)中红线所示。另外, 根据相位面积可知被测血红细胞的等效直径为 $7.04 \mu\text{m}$, 细胞周长范围为 $(23.32 \pm 1.13) \mu\text{m}$ 。为了定量表征血红细胞样品的形状特性, 根据(15)~(16)式计算细胞的偏心率和

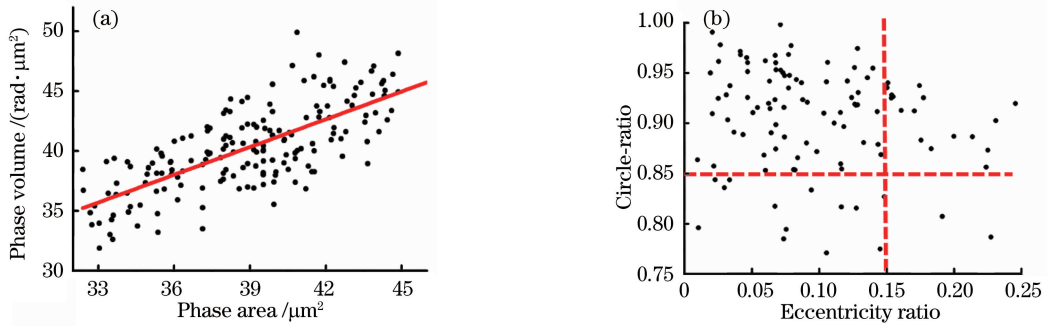


图 10 被测血红细胞参数。(a)相位体积和相位面积(红线代表线性拟合结果);(b)圆率和偏心率

Fig. 10 Parameters of measured red blood cells. (a) Phase volume and phase area (red line indicating linear fitting result); (b) circle-ratio and eccentricity

表 1 从测量速度、测量精度以及所需干涉图数量这 3 个方面对比了所介绍的基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪、基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪以及重力驱动的定量干涉显微流式细胞仪。结果表明:基于扩展主程序分析相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪具有最高的测量精度,然而由于其所需干涉图数量多,扫描速率慢,适用于少量样

品的高精度扫描测量;重力驱动的定量干涉显微流式细胞仪装置简单,扫描速率极快,但测量精度稍低,适用于对大量细胞的高通量高速检测;基于正则化光学流场相位恢复算法的定量干涉显微流式细胞仪的测量精度与速率则介于前两者之间。在实际检测中,可根据实际需要选择合适的定量相位流式细胞仪开展定量相位成像与参数测量统计等工作。

表 1 不同定量干涉显微流式细胞仪的对比

Table 1 Comparison among different quantitative interferometric microscopic cytometers

Item	Expanded principle component analysis algorithm	Regularized optical flowing algorithm	Gravity-driven algorithm
Scanning principle	Mechanical scanning	Mechanical scanning	Microfluidic scanning
Measurement speed	Slower	Faster	Fastest
Measurement accuracy *	Highest, correlation coefficient of 0.9999	Higher, correlation coefficient of 0.9977	Lower, correlation coefficient of 0.9879
Number of interferograms	5-10	2	1

Note: * based on numerical simulation calculation

6 结 论

为了实现对大量生物样品快速高通量的定量相位成像及后续分析,结合定量干涉显微技术与视场扫描,设计了定量干涉显微流式细胞仪系统。该系统不仅能够对诸如血红细胞等生物样品实现定量成像,还能通过细胞识别实现对一系列细胞参数的测

量,如相位面积、相位体积、圆率、离心率、平均红细胞血红蛋白等。结合不同的视场扫描和相位恢复方法,先后设计了基于扩展主程序分析相位恢复算法、基于正则化光学流场相位恢复算法和重力驱动的定量干涉显微流式细胞仪。在不同检测速度和精度的要求下,可以选择合适的测量系统对大量被测样品进行成像与测量。所设计的定量干涉显微流式细胞

仪可以对生物样品进行高通量的高速测量、识别与统计,并可以精确地反映血红细胞的各项参数,从而为病理诊断、生物研究提供合理且具有参考意义的实验数据。

致谢 感谢意大利国家研究委员会应用科学与智能系统研究所 Pietro Ferraro 教授在重力驱动定量干涉显微流式细胞仪工作方面的帮助,感谢西班牙国家研究委员会 Javier Vargas 博士在正则化光学流场算法方面的指导,感谢南京农业大学单分子与纳米技术实验室刘斐教授以及实验室成员单衍可、徐明飞在红细胞采集、微分干涉相衬显微成像方面的帮助。此外,实验装置三维结构图由中国科学院国家天文台南京天文光学技术研究所姜海娇博士根据实验装置设计,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Yang P, Wei D, Pang K, *et al.* Progress in detection of circulating tumor cell by *in vivo* photoacoustic flow cytometry[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(9): 090001.
杨萍, 魏丹, 庞恺, 等. 在体光声流式细胞术在循环肿瘤细胞检测中的研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(9): 090001.
- [2] Bu M, Hu S S, Tao Z H, *et al.* Scattering characteristics of leukocytes on polarized light and relationship between scattering characteristics and cell structure[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(10): 1007001.
卜敏, 胡双双, 陶兆禾, 等. 白细胞对偏振光的散射特性及散射特性与细胞结构的关系[J]. *中国激光*, 2017, 44(10): 1007001.
- [3] Li C, Guo B H, Sun Z. Optical system design of multispectral achromatic imaging flow cytometer[J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(9): 0922002.
李灿, 郭帮辉, 孙竹. 多光谱消色差成像流式细胞仪的光学系统设计[J]. *光学学报*, 2016, 36(9): 0922002.
- [4] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82-86.
- [5] Greenbaum A, Luo W, Su T W, *et al.* Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(9): 889-895.
- [6] Ramachandraiah H, Amasia M, Cole J, *et al.* Lab-on-DVD: standard DVD drives as a novel laser scanning microscope for image based point of care diagnostics[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(8): 1578-1585.
- [7] Mir M, Wang Z, Tangella K, *et al.* Diffraction phase cytometry: blood on a CD-ROM [J]. *Optics Express*, 2009, 17(4): 2579-2585.
- [8] di Caprio G, ei Mallahi A, Ferraro P, *et al.* 4D tracking of clinical seminal samples for quantitative characterization of motility parameters [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(3): 690-700.
- [9] Merola F, Miccio L, Paturzo M, *et al.* Driving and analysis of micro-objects by digital holographic microscope in microfluidics [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(16): 3079-3081.
- [10] Rappaz B, Barbul A, Emery Y, *et al.* Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer [J]. *Cytometry Part A*, 2008, 73(10): 895-903.
- [11] Moon I, Javidi B, Yi F L, *et al.* Automated statistical quantification of three-dimensional morphology and mean corpuscular hemoglobin of multiple red blood cells [J]. *Optics Express*, 2012, 20(9): 10295-10309.
- [12] Psaltis D, Quake S R, Yang C. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 381-386.
- [13] Cui X Q, Lee L M, Heng X, *et al.* Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for *Caenorhabditis elegans* and cell imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(31): 10670-10675.
- [14] Zheng G, Lee S A, Antebi Y, *et al.* The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(41): 16889-16894.
- [15] Schonbrun E, Ye W N, Crozier K B. Scanning microscopy using a short-focal-length Fresnel zone plate [J]. *Optics Letters*, 2009, 34(14): 2228-2230.
- [16] Schonbrun E, Steinvurzel P E, Crozier K B. A microfluidic fluorescence measurement system using an astigmatic diffractive microlens array [J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1385-1394.
- [17] Gorthi S S, Schaak D, Schonbrun E. Fluorescence imaging of flowing cells using a temporally coded excitation [J]. *Optics Express*, 2013, 21(4): 5164-

- 5170.
- [18] Schonbrun E, di Caprio G, Schaak D. Dye exclusion microfluidic microscopy[J]. *Optics Express*, 2013, 21(7): 8793-8798.
- [19] Wang S Y, Xue L, Li H L, *et al.* Quantitative phase detection with expanded principal component analysis method on interferometric microscopic cytometer[J]. *Applied Physics B*, 2014, 116(1): 235-239.
- [20] Xue L, Vargas J, Wang S Y, *et al.* Quantitative interferometric microscopy cytometer based on regularized optical flow algorithm [J]. *Optics Communications*, 2015, 350: 222-229.
- [21] Xue L, Wang S Y, Yan K D, *et al.* Gravity driven high throughput phase detecting cytometer based on quantitative interferometric microscopy [J]. *Optics Communications*, 2014, 316: 5-9.
- [22] Girshovitz P, Shaked N T. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization [J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(8): 1757-1773.
- [23] Tsinopoulos S V, Polyzos D. Scattering of He-Ne laser light by an average-sized red blood cell [J]. *Applied Optics*, 1999, 38(25): 5499-5510.
- [24] Vargas J, Quiroga J A, Belenguer T. Phase-shifting interferometry based on principal component analysis [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(8): 1326-1328.
- [25] Vargas J, Quiroga J A, Belenguer T. Analysis of the principal component algorithm in phase-shifting interferometry [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(12): 2215-2217.
- [26] Takeda M, Ina H, Kobayashi S. Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1982, 72(1): 156-160.
- [27] Ikeda T, Popescu G, Dasari R R, *et al.* Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems [J]. *Optics Letters*, 2005, 30(10): 1165-1167.
- [28] Wang S Y, Xue L, Lai J C, *et al.* An improved phase retrieval method based on Hilbert transform in interferometric microscopy [J]. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 2013, 124(14): 1897-1901.
- [29] Wang S Y, Sun N, Xue L, *et al.* Radial Hilbert transform phase retrieval algorithm for circular carrier interferogram [J]. *Optics Communications*, 2013, 304: 148-152.
- [30] Xue L, Lai J C, Wang S Y, *et al.* Single-shot slightly-off-axis interferometry based Hilbert phase microscopy of red blood cells [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(4): 987-995.
- [31] Vargas J, Quiroga J A, Sorzano C O S, *et al.* Two-step interferometry by a regularized optical flow algorithm [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(17): 3485-3487.