

相位边缘检测下形态特征快速提取的实验采样策略

季颖^{1*}, 韦鑫宇¹, 张明明², 王亚伟¹

¹江苏大学物理与电子工程学院, 江苏 镇江 212013;

²江苏大学机械工程学院, 江苏 镇江 212013

摘要 针对如何在相位分布图中选取合适边缘采样点的问题, 基于相位成像理论和实验分析了不同处理方案的优缺点并提出了采样策略。结合相位成像机理, 采用基于梯度的几类经典边缘检测算子分析了采样特征点位置不确定性的来源及其对检测结果的影响。选取形态结构复杂程度不同的实际样品开展实验研究, 对比分析不同采样点位置选取对样本尺寸计算结果的影响, 对多种误差产生的原因进行了分析, 给出了其理论上的关联和解释。综合多组实验数据对比分析的结果, 总结出了适合不同复杂程度样品的形态结构特征提取方案, 其处理效率能够满足快速实时检测的需要。

关键词 生物技术; 实验物理; 相位分布; 形态结构; 边缘检测; 特征点提取

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617030

Experimental Sampling Strategy for Rapid Extraction of Morphological Features Based on Phase Edge Detection

Ji Ying^{1*}, Wei Xinyu¹, Zhang Mingming², Wang Yawei¹

¹School of Physics and Electronic Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China;

²School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

Abstract To address the problem of how to select appropriate edge sampling points in the phase distribution map, in this paper, we analyze the advantages and disadvantages of different processing schemes and propose a sampling strategy based on phase imaging theory and experiments. Combined with the phase imaging mechanism, several gradient-based classical edge detection operators were used to analyze the source of uncertainty in the position of sampling feature points and its influence on the detection results. Actual samples showing a morphological structure with different complexities were selected to conduct experimental research. Furthermore, the influence of different sampling points on the sample size calculation results was compared and analyzed. Subsequently, the causes of various errors were investigated and their theoretical correlation and explanation were presented. Based on the results of a comparative analysis of multiple groups of experimental data, a morphological structure feature extraction scheme suitable for samples with different complexities was proposed. The processing efficiency of this scheme can meet the needs of a rapid real-time detection.

Key words biotechnology; experimental physics; phase distribution; morphological structure; edge detection; feature point extraction

收稿日期: 2021-09-09; 修回日期: 2021-09-24; 录用日期: 2021-10-13

基金项目: 江苏大学农业装备学部项目(NZXB20200215)、国家自然科学基金(11874184)

通信作者: *jy@ujs.edu.cn

1 引言

生物细胞形态结构多样,生理功能各异,并且状态会随细胞生长发生变化,是生命科学和临床医学等许多领域的重要研究内容^[1]。细胞对光的吸收和散射作用都比较弱,为实现对其清晰成像,多种技术应运而生^[2],如免疫荧光技术、扫描探针技术、相位成像技术等。其中定量相位显微技术(QPM)^[3]利用细胞内不同组分间折射率不同这一固有对比源进行成像,无需对细胞进行预处理,不损伤细胞活性。然而QPM获得的是样品引起的相移,其量值正比于样本与环境液折射率差值沿光线方向的积分值,并不直接是样品的物理厚度,所以如何从相移分布图中快速解析出样本的形态特征还有待进一步研究。目前常见的三维重建算法主要有同步迭代重建法、共轭梯度重建法和极大似然估计法等,但这些算法需要大量的数据或者依赖于迭代算法,对实验设备要求较高,耗时较长^[4]。对于一些对检测速度要求较高成本又有限的工作(例如临床上外周血细胞形态的分类检测),还需要探究简便快捷的细胞形态特征快速提取方法^[5-6]。注意到,在相位图中不同细胞结构的边缘位置相位变化最为明显,这就为利用边缘检测算法分析确定样本形态特征提供了基础^[7]。传统方法通过一阶微分算子或二阶微分算子快速简便地实现图像边缘检测;小波变换算法只保留小波变换的低频部分,从而实现去除噪声同时保留图像边缘的良好效果;还有基于机器学习和深度学习的边缘检测方法、基于相位一致性的边缘检测方法等,大多都是基于尖峰突变实现有效实时的边缘检测的^[8-10]。

但是在实际成像实验中,样本性质、试剂纯度、

仪器硬件精度、操作标定的客观量化程度等因素会给检测分析带来诸多影响,理论仿真下可行的方法需要进行优化和修正,甚至可能不再适用。针对这一问题,本文选取了成分不同、结构复杂程度不同的样品,围绕实验获得的样本相位数据,采用不同的处理方法快速获取样本形态特征,通过对不同类型的样品进行多次成像实验和对照分析,探究实验条件下适用的边缘数据获取方案。

2 基本原理

2.1 问题的提出

由于不同介质折射率不同,光波穿过相同物理厚度的不同介质时相位变化也不同^[11]。为便于说明相位边缘检测原理和采样定位中的误差来源,建立如图1所示的细胞模型。

如图1所示,椭球代表胞体,在 x 轴、 y 轴和 z 轴上的半主轴长分别为 $15\ \mu\text{m}$ 、 $12\ \mu\text{m}$ 、 $12\ \mu\text{m}$,椭球内部半径为 $4\ \mu\text{m}$ 的小球代表胞核,且两者的中心为同一点。通常细胞胞质及胞核的折射率在短时间内不会出现较大波动,且其在胞质与胞核内不同位置的变化也不明显,故设胞体和胞核的折射率分别为 n_1 和 n_2 ,细胞周围的环境液折射率为 n_m 。以与入射光线平行且经过球心的直线 AB 为例,该路径上的相移值为

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \left[(n_1 - n_m) \cdot d_1 + (n_2 - n_m) \cdot d_2 + (n_1 - n_m) \cdot d_3 \right], \quad (1)$$

式中: $d_i(i=1, 2, 3)$ 表示光线穿过的各介质的厚度^[3]。由于相移值是样本在某点处与环境液折射率的差值与该处样本沿光线方向的物理厚度乘积的累加^[12-13],从样本的相位分布信息中无法直接获得

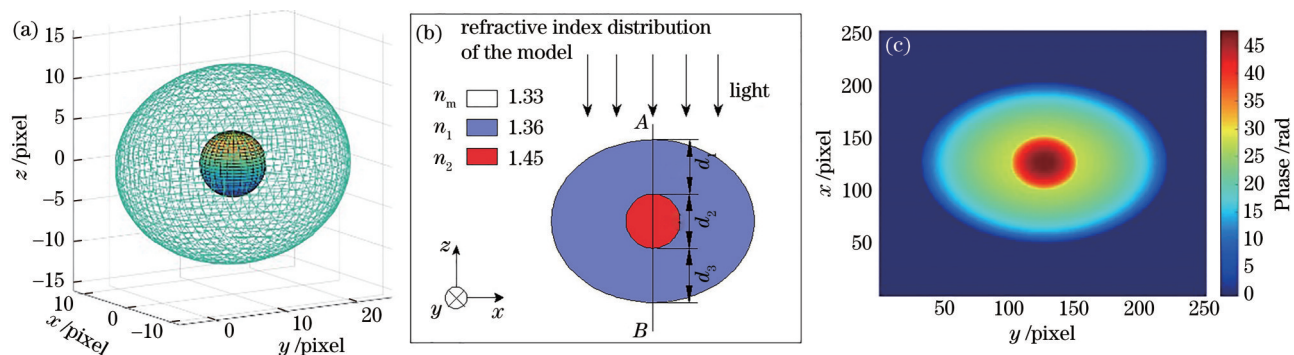


图1 细胞模型的仿真。(a)有核细胞模型;(b)模型在点A处沿光线入射方向的物理厚度;(c)模型的相位分布

Fig. 1 Simulation of cellular models. (a) Nucleated cell model; (b) physical thickness of the model at point A along the direction of light incidence; (c) phase distribution of the model

沿光轴方向上每一点的情况,只能得到样本投影在 xoy 面上的形态尺寸。样本内不同结构边界处是样本折射率和物理厚度变化最大的区域,也就是相位变化最为明显的位置。故从梯度的数学定义和相位变化的物理意义出发,采用基于梯度的几类边缘检测算法分析样本的形态结构。需要说明的是,想要确定样本的三维形态结构,就需采集分析多个不

同方向上的相位图,简洁起见,此处仅以光线沿 z 轴入射的情形为例进行说明。

对图 1(c)所示的细胞相位分布沿 x 方向取一阶偏导,获得的相位梯度分布如图 2(a)所示,记录平面的尺寸设置为 $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$,记录平面的像素点为 255×255 ,因此在这个记录平面中每个像素点的尺寸为 $40/255\ \mu\text{m}$ 。

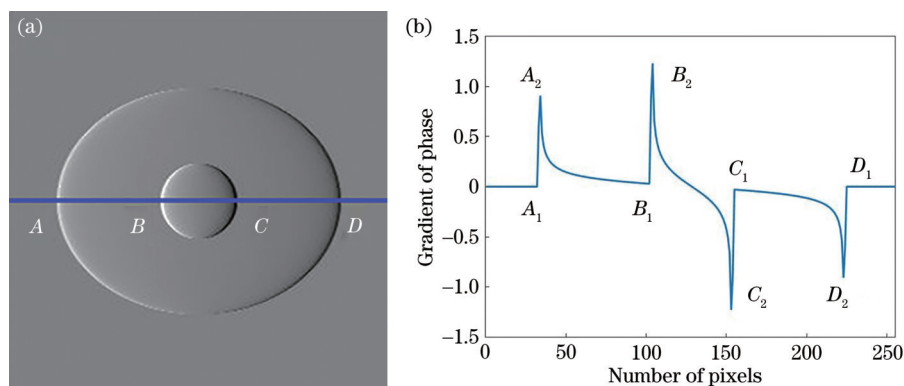


图 2 细胞模型的相位梯度数据。(a)细胞模型相位的梯度处理分布;(b)模型沿 AD 方向的梯度分布曲线

Fig. 2 Gradient data of phase for cellular models. (a) Gradient processing distribution of the cell model phase; (b) gradient distribution curve of the model along the AD direction

由图 2(a)可以清晰分辨出细胞模型梯度图中的椭圆和圆的边界。为获得样本形态的定量信息,进一步提取梯度分布曲线,直观展示边界点位置,图 2(b)给出了相位梯度在 $y=0$ 处过样本中心的直线 AD 的曲线。在数值计算中,结构边界处相位梯度表现为相邻区域内的极大值,即图 2(b)中的跳变点(如点 A、B、C、D 处)。从图 2(b)还可以看出,梯度曲线在跳变范围内与梯度零线只有一个交点(样本厚度变化率为 0 的位置),在此位置,样本的切平面是与 xoy 面平行的,而且可以看出在零点两边的梯度曲线是关于零点对称的,这些形态特征与上述构建的模型相吻合。注意到在图 2(b)中,跳变位置起跳点和梯度值最大的尖峰点坐标值是不同的(如点 A_1, A_2 等),那么由此引起的误差如何,在何处采

样才能准确获取样本形态尺寸,在复杂的实验条件下(如噪声影响)又会呈现怎样的情形,该如何应对处理,这些都是检测样品形态尺寸的准确性至关重要的问题和因素。因而,本文基于仿真和实验进行分析探讨,以确定合适的采样方案。

从仿真结果来看,由图 2(b)中像素尺寸计算出的样本物理尺寸如表 1 所示。无论是取起跳点还是尖峰点,基于模型样本的测量值与理论值都具有较好的一致性。对于穿过胞质与胞核的沿 AB 线方向的相位梯度曲线的起跳点和尖峰点之间的尺寸与样本理论值之间的绝对误差的最大值为 $0.35\ \mu\text{m}$,最大相对误差为 1.17%,处理耗时均在 0.5 s 左右,这表明了使用梯度算子快速获得样本形态尺寸有一定的可行性。

表 1 在样本模型中不同特征点下采样的相应尺寸分析

Table 1 Size analysis of sampling under different feature points in the sample model

Parameter	A_1-D_1 (start point)	A_2-D_2 (peak point)	B_1-C_1 (start point)	B_2-C_2 (peak point)
Pixel coordinate	32-225	34-223	102-155	104-153
Theoretical value / μm	30.00	30.00	8.00	8.00
Measured value / μm	30.27	29.65	8.31	7.69
Absolute error / μm	0.27	-0.35	0.31	-0.31
Relative error / %	0.90	1.17	1.03	1.03
Elapsed time / s	0.472			

但同时表 1 的数据也显示 AB 线上基于起跳点和尖峰点检测的误差趋势并不确定。其他模型(如双核模型)的分析结果与上述类似(简洁起见,此处不再赘述)。究其原因,这是由于对于数值仿真,所构建模型的不同折射率的分界面对应的厚度是 1 个像素,因此模拟实验中在 AB 线样本边界采样点的起跳点与尖峰点之间的像素坐标差值都是固定的 4 个像素。从表 1 可计算出,在 AB 线上样本尺寸的绝对误差和都为 $0.62 \mu\text{m}$,这一尺寸相当于上文构建

模型中 4 个像素的物理尺寸。

除了梯度算子,还考察了其他几类常见边缘检测算子的效果,如拉普拉斯算子($\partial^2\varphi/\partial x^2$)、 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 算子、Canny 算子、Prewitt 算子等,如图 3 所示^[14-15]。这些算子在特征采样点选取上出现了与梯度方法类似的问题,在不同介质过渡的边缘均会出现起跳点与尖峰点不一致且误差随机分布的现象,如图 3 所示。也就是说,在这样的偏差下,基于仿真的误差分析尚无法给出选取实际样本边界的依据。

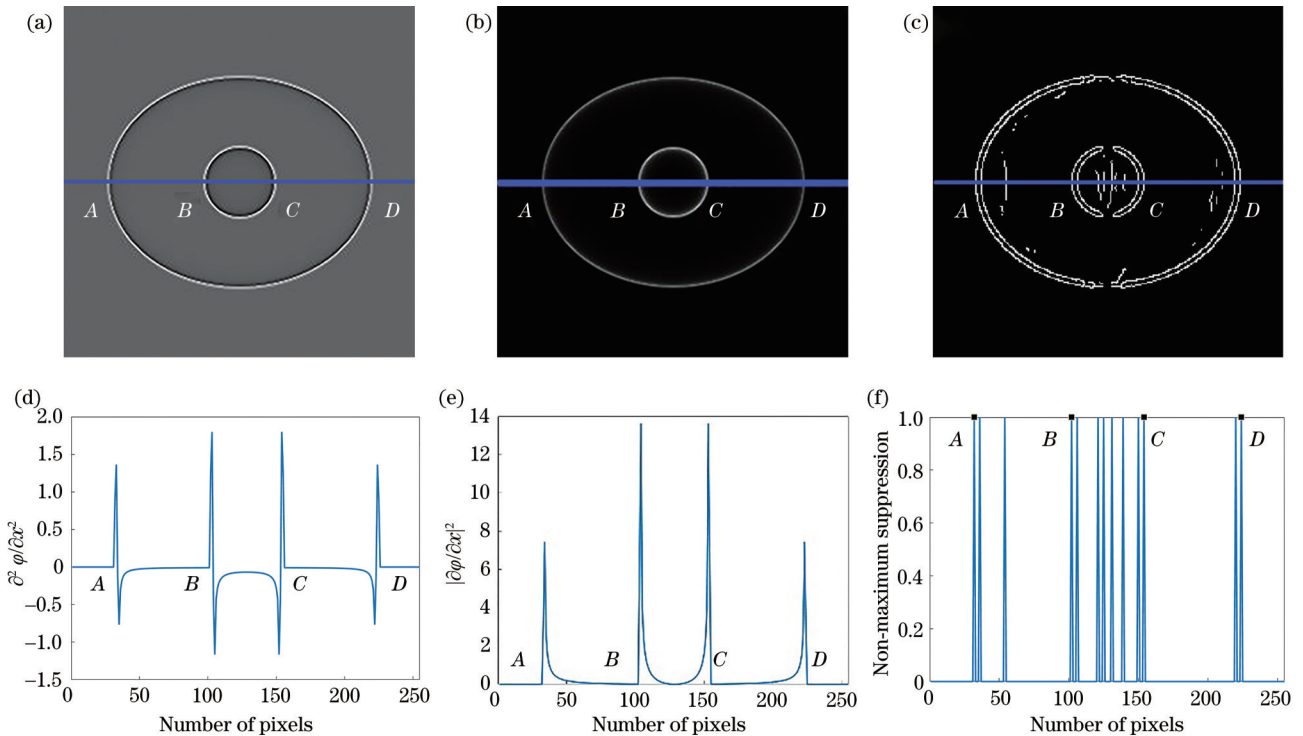


图 3 细胞模型的边缘检测算子处理结果。(a)模型相位的 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 分布;(b)模型相位的 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 分布;(c)模型相位的 Canny 分布;(d)模型沿 AD 方向的 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 曲线;(e)模型沿 AD 方向的 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 曲线;(f)模型沿 AD 方向的 Canny 曲线

Fig. 3 Processing results of edge detection operator in cell model. (a) $\partial^2\varphi/\partial x^2$ distribution of model phase; (b) $|\partial\varphi/\partial x|^2$ distribution of model phase; (c) Canny distribution of model phase; (d) $\partial^2\varphi/\partial x^2$ curve of the model along the AD direction; (e) $|\partial\varphi/\partial x|^2$ curve of the model along the AD direction; (f) Canny curve of the model along the AD direction

2.2 实验结果分析及特征点采样方案

为探究实验条件下如何采集合适的特征点,围绕几类结构和尺寸不同的样本进行了实验,包括直径不同的聚苯乙烯微球($n=1.588$, $d=4, 8, 20, 70 \mu\text{m}$)、健康人体血细胞(红细胞和中性粒细胞)、小鼠骨髓中性粒细胞和血小板、洋葱表皮细胞、番茄果肉细胞等,对每类样品均进行了多次实验和检测计算。出于对实验数据的可重复性、可对照性和文章篇幅的考虑,在此选取标准微球和洋葱表皮细胞胞核作为讨论对象,并且为使分析结果对生物细

胞形态无损免标记检测等更具参考价值,参照人体血细胞大致尺寸,以直径为 $4 \mu\text{m}$ (厂商数据尺寸误差为 3%)的聚苯乙烯荧光微球为例进行分析。先将基于荧光显微镜获取的聚苯乙烯微球的实际物理尺寸作为对照,进而通过 Biophase 相位显微系统获取样本的相位分布图进行边缘检测。以图 4(a)为例,该视场内采集到 3 个微球样本,测量得实际直径分别为 $3.927 \mu\text{m}$ 、 $4.541 \mu\text{m}$ 和 $4.240 \mu\text{m}$,取平均值 $4.236 \mu\text{m}$ 。图 4(b)是相应的相位图,图片物理尺寸为 $100.0 \mu\text{m} \times 73.5 \mu\text{m}$,对应的像素尺寸为 $677 \times$

497 像素,即每个像素点对应的实际物理尺寸为 0.148 μm 。图 4(c)为聚苯乙烯微球相位图经梯度算子处理后的结果。为定量提取该样本在垂直于光照方向上的形态信息,沿两个正交方向提取梯度分布曲线,以聚苯乙烯微球 B 为例,图 4(d)、(e)分别为其沿横向 B_1B_3 和纵向 B_4B_2 的梯度曲线。从图 4(d)、(e)可以看到,与仿真中跳变位置处起跳点和尖峰点像素坐标接近这一现象不同的是,这两个关键特征点在实验条件下的像素坐标位置差异较大,例如图 4(d)中的 B_{11} 和 B_{12} ,这就更突显了在检测

中选择采样点的重要性。为此,分别针对起跳点和尖峰点采样

提取图 4(c)所示的相位梯度曲线上横向边界两个像素点 $B_1(389, 232)$ 和 $B_3(413, 232)$ 附近跳变点[如图 4(d)像素坐标所示,包括起跳点和尖峰点],计算这两组采样点的横向坐标差值以获取样本在 B_1B_3 处的实际物理尺寸,对纵向 B_4B_2 以及其他两个样本的计算过程与之类似,如图 4(e)所示,不再赘述。表 2 计算结果显示:实验数据处理耗时与仿真差别不大,均在 0.5 s 左右;基于尖峰点采样计

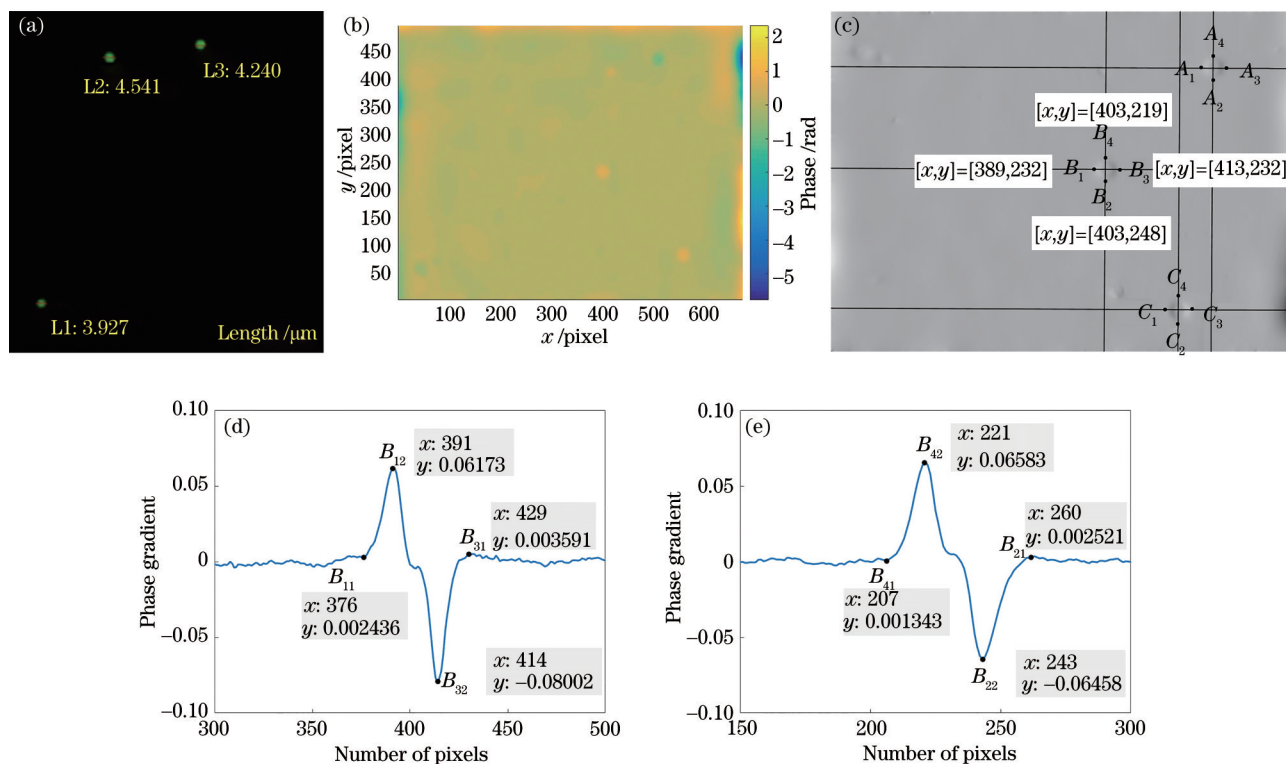


图 4 聚苯乙烯微球的梯度处理结果。(a)聚苯乙烯荧光微球的荧光成像;(b)微球的相位分布;(c)微球的相位梯度分布;(d)微球梯度分布在 B_1B_3 方向的曲线;(e)微球梯度分布在 B_4B_2 方向的曲线

Fig. 4 Gradient processing results of polystyrene microspheres. (a) Fluorescence imaging of polystyrene fluorescent microspheres; (b) phase distribution of microspheres; (c) phase gradient distribution of microspheres; (d) curve of microsphere gradient distribution in the B_1B_3 direction; (e) curve of microsphere gradient distribution in the B_4B_2 direction

表 2 聚苯乙烯微球相位梯度分布下不同采样点处的尺寸分析

Table 2 Size analysis of polystyrene microspheres at different sampling points under phase gradient distribution

Parameter	$B_{11}-B_{31}$ (start point)	$B_{12}-B_{32}$ (peak point)	$B_{41}-B_{21}$ (start point)	$B_{42}-B_{22}$ (peak point)
Pixel coordinate	376-429	391-414	207-260	221-243
Theoretical value / μm	4.236	4.236	4.236	4.236
Measured value / μm	7.844	3.404	7.844	3.256
Absolute error / μm	3.608	0.832	3.608	0.980
Relative error / %	85.17	19.64	85.17	23.14
Elapsed time / s	0.551			

算的直径相对误差为 20% 左右,而起跳点采样下的相对误差则高达 85%。

对于其他边缘检测算子,采取类似的处理方法进行分析。考虑到各算子的特点(如拉普拉斯算子虽能突出边缘位置但是对噪声更加敏感;Canny算子自带一定的滤波功能;Prewitt算子和 Sobel算子对复杂噪声图像效果较差,边缘定位精度不高)和文章篇幅,在此以梯度、拉普拉斯和 Canny 算子为例

进行分析比较。图 5(a)为聚苯乙烯微球相位的拉普拉斯算子处理结果,同样沿其轴线取正交方向上的分布曲线中横(纵)向跳变位置起跳点和尖峰点像素坐标,如图 5(b)所示,计算的微球直径尺寸如表 3 所示。可以得出,相位图经拉普拉斯算子处理后,采样位置选在曲线跃变起跳点的测量误差远小于尖峰点的误差,且微球拉普拉斯算子处理下整体的测量结果也优于梯度算子。

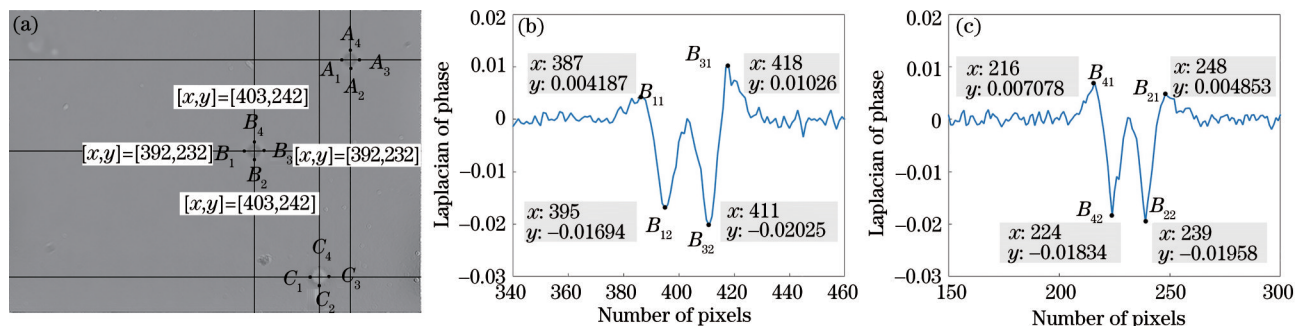


图 5 聚苯乙烯微球的拉普拉斯算子处理结果。(a)聚苯乙烯微球相位的拉普拉斯算子处理结果;(b)微球沿 B_1B_3 方向的分布曲线;(c)微球沿 B_1B_2 方向的分布曲线

Fig. 5 Laplacian processing results of polystyrene microspheres. (a) Laplacian processing result of polystyrene microsphere phase; (b) distribution curve of microspheres along the B_1B_3 direction; (c) distribution curve of microspheres along the B_1B_2 direction

对于测量效果,从表 2 和表 3 可以看到,相位梯度算法和拉普拉斯算法下的耗时相近且相对误差都比较大,这是因为聚苯乙烯微球直径通过像素坐标换算得出,而单个像素点实际尺寸为 $0.148 \mu\text{m}$,与微球直径的相对值约为 3.494%,在特征点采样位置对像素坐标读取的轻微变动就会对最终测量值的相对误差产生较大影响。另一方面,上述过程没有对原始实验数据进行滤波降噪等预处理,在根据目标曲线选取采样点的时候可能出现误判。至于是否应对相位数据先进行滤波,从之前的工作来看^[16],样本本身的亚结构、介质折射率分布的不均匀、各种噪声等都会引起边缘检测算子空间分布曲线的波动。由于各介质边缘的检测是基于曲线的

波动来判断的,而表征这些边界的波动可能会随着去噪滤波被一并滤除,从而给检测结果带来较大的偏差,故在是对波动起跳点还是峰值点进行采样的讨论中未进行滤波处理。可以通过采集一个或多个其他方向的相位图并且分别经边缘检测后进一步对比确定样品结构形态。同时也注意到,拉普拉斯算子下测量值的相对误差明显比相位梯度算法小,这是由于拉普拉斯算子采用二阶导数对相位变化进行检测,较梯度算子的一阶偏导,对边缘更为敏感。也正是因为梯度算子和拉普拉斯算子各自依据数据分布随空间变化的一阶和二阶导数值进行边缘检测,二者在各自分布曲线上对采样点的选取标准才有所区别:拉普拉斯算子计算的是相位数

表 3 聚苯乙烯微球相位拉普拉斯分布下不同采样点处的尺寸分析

Table 3 Size analysis of polystyrene microspheres at different sampling points under phase Laplacian processing distribution

Parameter	$B_{11}-B_{31}$ (start point)	$B_{12}-B_{32}$ (peak point)	$B_{41}-B_{21}$ (start point)	$B_{42}-B_{22}$ (peak point)
Pixel coordinate	387-418	395-411	216-248	224-239
Theoretical value / μm	4.236	4.236	4.236	4.236
Measured value / μm	4.588	2.368	4.736	2.220
Absolute error / μm	0.352	-1.868	0.500	-2.016
Relative error / %	8.310	44.098	11.80	47.592
Elapsed time / s	0.675			

据对空间的二阶导数,在其对应轴向曲线上的跃变处附近,起跳位置的二阶导数为零,意味着一阶导数最大值位置,即与梯度算子沿轴向分布曲线上的极大值点(即尖峰点)在本质上是同一采样位置。也就是说,这两种方法的采样原则其实是一致的。

此外,也基于实验数据考察了 Canny 算子和 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 算子对相位分布的边缘检测能力。如图 6(a)所示, Canny 算子处理中梯度值只有大于某一阈值的像素点才被赋值为 1,其他小于阈值的点

则被赋值 0,即在处理结果图中只有 0 和 1 两种结果;并且 Canny 算子对噪声过于敏感而且对信号只通过 0 和 1 两种形式区分,导致噪声与样本边界信息有相似的表达,导致在图中的样本结果与背景没有明显的对比特征,也就难以从图中寻找到微球的位置。至于 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 算子处理,由图 6(b)可以看到,样本与背景的对比度太差,已无法对样本边界进行定位和采样分析。故仅对梯度算子和拉普拉斯算子开展讨论。

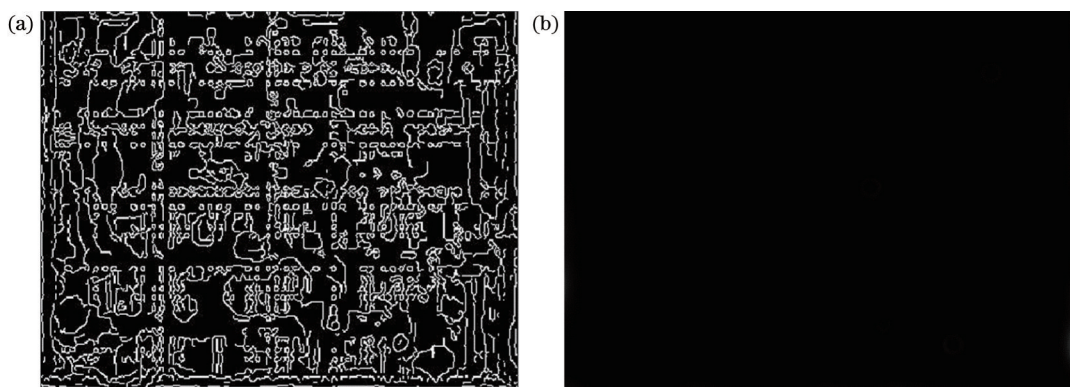


图 6 聚苯乙烯微球相位的处理结果。(a)聚苯乙烯微球相位分布的 Canny 算子处理结果;(b)聚苯乙烯微球相位分布的 $|\partial\varphi/\partial x|^2$ 算子处理结果

Fig. 6 Processing results of the phase of polystyrene microspheres. (a) Processing results of Canny operator for the phase distribution of polystyrene microspheres; (b) processing results of $|\partial\varphi/\partial x|^2$ operator for the phase distribution of polystyrene microspheres

为了进一步考察适用于生物细胞的采样方案,继续基于真实的生物细胞进行观察分析,制取并检测了多组洋葱表皮细胞样本,如图 7 所示。从图 7(a)荧光显微图和图 7(b)普通显微镜明场图中可以看出,洋葱表皮细胞形状不规则且大小不一,难以就整个样本进行对照分析,但同时也注意到洋葱细胞胞核的形状均类似于圆形且尺寸大致相同,故以洋葱细胞胞核为样本进行形态尺寸定量检测和对照分析。

从图 7(a)所示的洋葱表皮细胞荧光显微图像中测得细胞胞核的尺寸约为 $17.142\ \mu\text{m}$ 。图 7(c)为洋葱表皮细胞的相位图,其物理尺寸为 $307.5\ \mu\text{m} \times 257.5\ \mu\text{m}$,对应的像素尺寸为 833×699 个像素,每个像素点的物理尺寸为 $0.368\ \mu\text{m}$ 。由此得到的相位梯度如图 7(d)所示,选取 A、B、C、D 四个胞核样本,并对每个样本的横向和纵向进行取值分析,由于数据较多且四个样本的横向和纵向数据都较为相似,此处仅选取 C 样本进行举例分析,其中横向线 C_1C_3 和纵向线 C_4C_2 互相垂直且都经过样本 C 的中心。

从图 7(e)、(f)所示的梯度曲线提取的样本 C 的横向与纵向直径测量值以及对比结果如表 4 所示。可以看出,与聚苯乙烯微球的情形类似,基于洋葱表皮细胞样本相位梯度曲线,在尖峰点处采样的测量结果要好于起跳点处。

对于图 8(a)所示的洋葱相位拉普拉斯算子检测结果,同样通过起跳点和尖峰点之间的像素坐标差值以及像素点所对应的实际物理尺寸计算样本 C 直径。从表 5 的数据可知,起跳点处采样测量的相对误差比尖峰点处小得多。同比聚苯乙烯微球的情形,再次说明基于洋葱表皮细胞样本相位拉普拉斯曲线,起跳点处的测量结果更可取,这也与所述的梯度、拉普拉斯曲线上跃变点附近的变化在理论上的区别与关联相符。

从图 8(b)、(c)还可以看到,同样的相位分布,其拉普拉斯曲线上的波动较梯度曲线更为复杂。这是由于拉普拉斯算子对随空间变化的相位值更加敏感,而在生物细胞内不同结构的边界处是物质交换较为频繁的区域,相位值本身会受到扰动,这

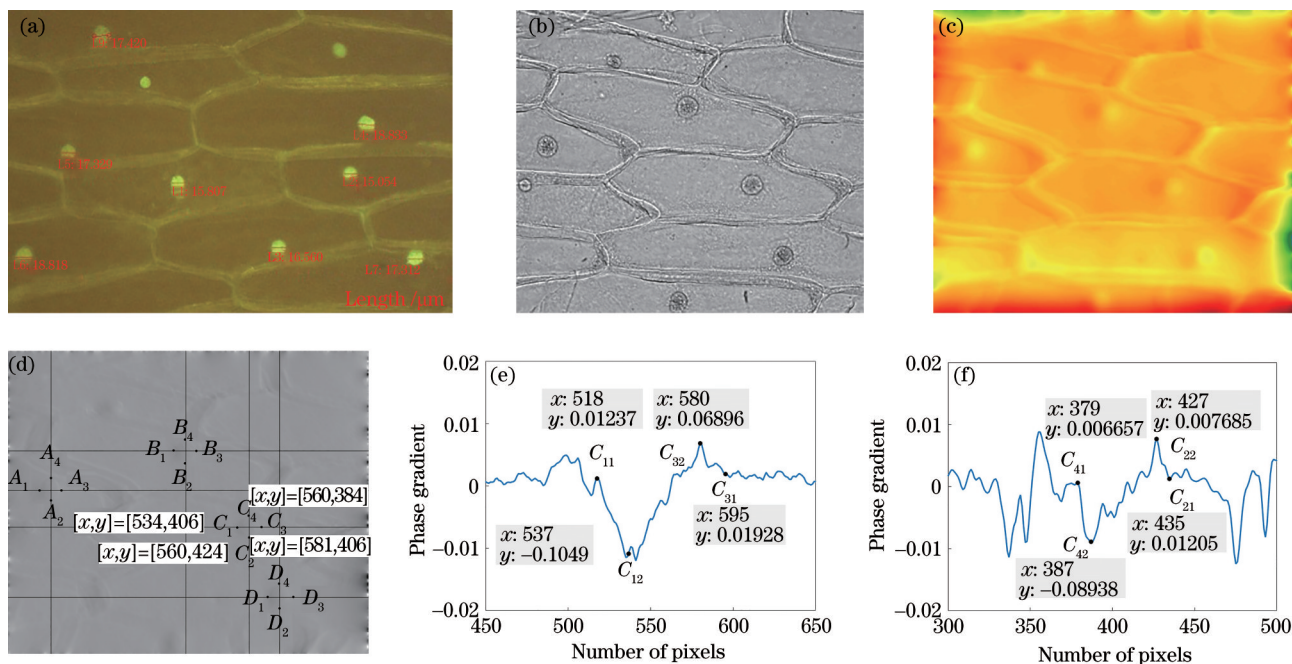


图 7 采用梯度算子的洋葱表皮细胞相位分析。(a)洋葱表皮细胞荧光显微图;(b)洋葱表皮细胞明场图;(c)洋葱表皮细胞相位图;(d)洋葱表皮细胞相位的梯度分布;(e)洋葱表皮细胞沿 C_1C_3 方向的梯度分布曲线;(f)洋葱表皮细胞沿 C_4C_2 方向的梯度分布曲线

Fig. 7 Phase analysis of onion epidermal cells using gradient operator. (a) Fluorescence microscopy of onion epidermal cell; (b) bright field map of onion epidermal cell; (c) phase map of onion epidermal cell; (d) $\partial\varphi/\partial x$ distribution of onion epidermal cell phase; (e) $\partial\varphi/\partial x$ distribution curve of onion epidermal cell along C_1C_3 direction; (f) $\partial\varphi/\partial x$ distribution curve of onion epidermal cell along C_4C_2 direction

表 4 相位梯度处理下洋葱表皮细胞胞核的尺寸分析

Table 4 Size analysis of onion epidermal cell nucleus under phase gradient treatment

Parameter	$C_{11}-C_{31}$ (start point)	$C_{12}-C_{32}$ (peak point)	$C_{41}-C_{21}$ (start point)	$C_{42}-C_{22}$ (peak point)
Pixel coordinate	518-595	537-580	379-435	387-427
Theoretical value / μm	17.142	15.824	20.608	17.142
Measured value / μm	28.336	15.824	20.608	14.72
Absolute error / μm	11.194	-1.318	3.466	-2.422
Relative error /%	65.302	7.689	20.189	14.129
Elapsed time /s	0.614			

表 5 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 处理下洋葱表皮细胞胞核的尺寸分析

Table 5 Size analysis of onion epidermal cell nucleus under $\partial^2\varphi/\partial x^2$ phase treatment

Parameter	$C_{11}-C_{31}$ (start point)	$C_{12}-C_{32}$ (peak point)	$C_{41}-C_{21}$ (start point)	$C_{42}-C_{22}$ (peak point)
Pixel coordinate	535-582	538-576	383-429	389-425
Theoretical value / μm	17.142	17.142	17.142	17.142
Measured value / μm	17.296	13.984	16.928	13.248
Absolute error / μm	0.154	-3.158	-0.214	-3.894
Relative error /%	0.898	18.423	1.248	22.716
Elapsed time /s	0.733			

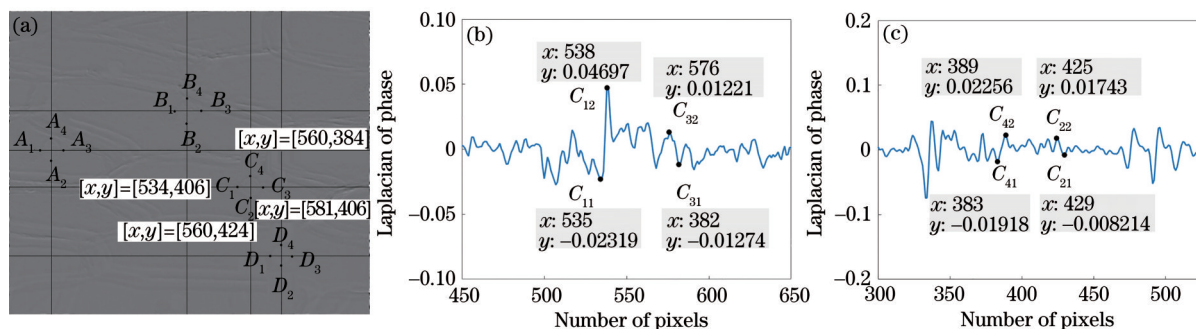


图 8 采用拉普拉斯算子的洋葱表皮细胞相位分析。(a)洋葱表皮细胞相位的 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 分布图；(b)细胞沿 C_1C_3 方向的 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 分布曲线；(c) 细胞沿 C_4C_2 方向的 $\partial^2\varphi/\partial x^2$ 分布曲线

Fig. 8 Phase analysis of onion epidermal cells using Laplacian operator. (a) $\partial^2\varphi/\partial x^2$ distribution of onion epidermal cell phases; (b) $\partial^2\varphi/\partial x^2$ distribution curve of cells along the C_1C_3 direction; (c) $\partial^2\varphi/\partial x^2$ distribution curve of cells along the C_4C_2 direction

也就使得在细胞结构的边界区域的相位变化更为复杂,也就导致相位数据经拉普拉斯算子处理后比梯度算子在边界区域出现更多的波动。

3 分析与讨论

两种样本(聚苯乙烯微球和洋葱表皮细胞胞核)的相位数据分别经梯度算子和拉普拉斯算子检测后得到了其结构边缘信息,对比两种算子的处理过程和结果可知,就实验数据实测而言,两种检测方式处理耗时大约为 0.5~0.7 s,均能满足实时快速检测的需要。各自的采样准则虽直观表现不同,但具有很好的理论和逻辑一致性。梯度曲线下样本边界位置的曲线变化特征比拉普拉斯算子更为明显,即在梯度曲线中可以较为容易地找到介质边界位置并确定特征点。拉普拉斯算子对样本内部随空间变化的相位值较为敏感,体现在曲线分布上就是起伏波动较多。对生物细胞而言,由于细胞中不同细胞器边界处液体浓度的改变是连续波动的,与浓度变化相关的噪声将会对实验结果带来较大影响,模糊边界的采样特征,因此对生物细胞这类相位数据进行处理时可优先考虑梯度算子对结构边缘进行检测,并且以曲线波动的尖峰位置作为表征样本中不同介质边界的特征点。需要说明的是,从两种球形样本直径尺寸为指标的相对误差分析结果来看,拉普拉斯算子检测的误差较小,但这是在样本的结构和尺寸已知的条件下经过多次采样对比才最终确定的边界位置,在对结构复杂、物理尺寸未知的实际样本数据分析中,使用拉普拉斯算子进行边缘定位分析是较为困难的。但是对于结构简单稳定的样本,比如聚苯乙烯微球,则可基于

拉普拉斯算子进行定位分析,可提取曲线波动处的起跳点作为采样点。

4 结 论

围绕从光相位图像快速获取样本形态结构特征展开,针对检测分析实验中采样点的选取问题进行了探讨。基于四类较常用的边缘检测算子,分别考察了各自计算处理下样本边缘提取的情况,经对比分析可知,对于从相位分布实验数据中提取样本不同介质的边界来说,梯度算子和拉普拉斯算子明显优于梯度模平方算子和 Canny 算子。同时,由于拉普拉斯算子对随空间变化的相位值和噪声更为敏感,对于内部环境较为稳定的均质样本,可选取拉普拉斯算子处理样本数据并选择拉普拉斯曲线跳变位置处的起跳点作为特征点确定样品形态尺寸;而对于内部环境较为复杂的非均质样本,可选用梯度算子来处理样本相位数据,且相应选择梯度曲线跳变位置的尖峰点作为样本边界位置的特征采样点。所涉及的采样策略可为从相位信息中实时获知样本形态特征从而进行无损免标记快速检测的工作提供参考。

参 考 文 献

- [1] Kasprovicz R, Suman R, O' Toole P. Characterising live cell behaviour: traditional label-free and quantitative phase imaging approaches[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017, 84: 89-95.
- [2] Alamudi S H, Chang Y T. Advances in the design of cell-permeable fluorescent probes for applications in live cell imaging[J]. Chemical Communications, 2018, 54(97): 13641-13653.

- [3] Li X H, Zhang H J, Zhang D X. Quantitative phase imaging system with active phase stabilization based on white-light interferometry[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, 28(7): 1279-1282.
李新弘, 章海军, 张冬仙. 基于白光干涉的自稳定定量相位成像系统[J]. *光学学报*, 2008, 28(7): 1279-1282.
- [4] Sun T F. Experimental study on interferometric quantitative phase microscopy for three-dimensional surface reconstruction of biological cells[D]. Jinan: Shandong University, 2019.
孙腾飞. 用于生物细胞三维面型重构的干涉型定量相位显微成像技术实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [5] Liu J S. Research on iterative 3D tomography reconstruction and feature detection based on approximate computing[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
刘钧石. 基于近似计算的断层图三维迭代重建与图像特征检测的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [6] Zou Y, Cao H, Chen Z Y, et al. Phase image detection of typical leukocytes for their feature analysis[J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11571: 115710C.
- [7] Zhang H X, Wang C, Liu X, et al. Image edge detection algorithm and its new development[J]. *Computer Engineering and Applications*, 2018, 54(14): 11-18.
张红霞, 王灿, 刘鑫, 等. 图像边缘检测算法研究新进展[J]. *计算机工程与应用*, 2018, 54(14): 11-18.
- [8] Liu S K. Research on optical image edge detection [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.
刘世凯. 光学图像边缘检测技术研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- [9] Yu Z H, Liu J, Yang H M, et al. Three-dimensional surface reconstruction based on edge detection and reliability sorting algorithm[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(24): 241020.
虞梓豪, 刘瑾, 杨海马, 等. 基于边缘检测及可靠性排序算法的三维曲面重构[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(24): 241020.
- [10] Bai B. Point flow edge detection method based on phase congruency[D]. Wuhan: Wuhan University of Science and Technology, 2020.
柏冰. 基于相位一致性的点流边缘检测方法[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2020.
- [11] Wang S Y, Xue L, Lai J C, et al. Phase retrieval method for biological samples with absorption[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(7): 075301.
- [12] Liu J, Tian A L, Liu B C, et al. A phase extraction algorithm in wavelength tuning interferometry[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(3): 0312001.
刘剑, 田爱玲, 刘丙才, 等. 一种变频相移干涉测量的相位提取算法[J]. *光学学报*, 2014, 34(3): 0312001.
- [13] Rappaz B, Marquet P, Cuche E, et al. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(23): 9361-9373.
- [14] Chen K, Xi J T, Song L M, et al. An object image edge detection based quality-guided phase unwrapping approach for fast three-dimensional measurement [C]//2013 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, July 9-12, 2013, Wollongong, NSW, Australia. New York: IEEE Press, 2013: 571-576.
- [15] Song R J, Zhang Z Q, Liu H Y. Edge connection based Canny edge detection algorithm[J]. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2017, 27(4): 740-747.
- [16] Tang W B, Ji Y, Zhang M M, et al. A rapid detection method for morphological characteristics of biological cells based on phase imaging[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 4651639.