

文章编号: 0253-2239(2010)12-3563-05

显微干涉术在血红细胞光相位场定量测量中的应用

薛 亮 来建成* 王绥琦 李振华

(南京理工大学理学院, 江苏 南京 210094)

摘要 为提高生物细胞形态检测速度和精度,以典型相位物体-血红细胞为研究对象,结合离轴干涉、共焦显微和高速图像采集技术,提出了细胞光相位场定量测量方法,既有高测量精度又可以对流动的细胞进行实时放大观测。实验中采集单幅载频干涉图,运用快速傅里叶变换相位提取法和路径无关相位解包算法,最终获得血红细胞光相位场的定量分布,和已有的光学相位模型吻合得较好。分析表明,该系统分辨率达到亚微米量级。这种由细胞光相位场分布解构细胞形态的检测手段希望成为一种新的生物活体细胞实时在体检测和定量分析的方法。

关键词 医用光学;相位分布;显微干涉;血红细胞;定量测量

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20103012.3563

Application of Microscopic Interferometry for Quantitative Phase Measurement of Red Blood Cells

Xue Liang Lai Jiancheng Wang Shouyu Li Zhenhua

(College of Science, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China)

Abstract In order to improve detection speed and accuracy of biological cells, microscopic interferometry which is a noncontact technique for imaging of phase objects is proposed, i. e., red blood cells. The technique combines the principles of off-axis interferometry, confocal microscopy and high-speed image-capture technology and is characterized by optimized spatial resolution and real-time acquisition capabilities. Single carrier-frequency interferogram is captured from experimental setup. According to fast Fourier transform phase retrieval method and path-unfollowing unwrapping algorithm, the quantitative phase distributions of red blood cell are gained and agree well with the previous optical phase models. Analysis shows that the resolution of introduced system reaches sub-micron dimension. It provides a breakthrough method for real-time observing and quantitative analyzing of cells in vivo.

Key words medical optics; phase distribution; microscopic interferometry; red blood cell; quantitative measurement

1 引 言

由于光学检测具有非侵入性、无电离辐射和操作模式多等优点成为生物组织检测的主要技术^[1~3],其中血红细胞的病变检测更是研究的热点^[4]。通常情况下,细胞可看作透明的相位物体,其吸收和反射特性和周围介质类似,当光波通过时振幅不发生变化,仅相位发生变化。又因为细胞光相

位的分布与细胞的大小、形态和结构有关^[5],所以能直接由细胞的相位场准确反演出细胞的形态特征,对细胞进行模式识别和分检。

近年来,干涉与显微技术结合用于生物细胞的微结构观察和光相位测量成为了一个热门的研究方向,该方法具有精度高、速度快和无损等优点,主要有定性分析和定量分析两类方法。前者以相衬和微

收稿日期: 2010-06-01; 收到修改稿日期: 2010-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(10704039)资助课题。

作者简介: 薛 亮(1986—),女,博士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: xueliangokay@gmail.com

导师简介: 李振华(1964—),男,教授,博士生导师,主要从事激光雷达及生物医学光子学等方面的研究。

E-mail: lizhenhua@mail.njust.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: laijiancheng@mail.njust.edu.cn

分干涉相衬显微技术^[6]为代表,后者是近两年的研究热点:G. Popescu 等^[7,8]采用傅里叶相位显微法,将透过细胞的散射光和非散射光干涉,通过傅里叶频谱面上相位调制实现四步移相,但是多幅干涉图的采集,限制了它的测量范围和采集速度,并且不能测量动态样品;T. Ikeda 小组^[9]提出希尔伯特相位显微法,采集单幅干涉图,利用同名算法提取相位信息,这种方法只需拍摄单幅干涉图,就可测动态样品,但是需要事先知晓条纹的空间频率,并且空间频率的准确与否会影响后期相位重构的精度;Y. K. Park 等^[10]报道了衍射相位显微法,入射光通过样品后经相位光栅产生多级衍射光,选取其中两个级次的光(0级和+1级)干涉,此法也需知道加入光栅后0级光的空间频移,并且保证该频移超过显微物镜数值孔径允许的最大频率。

对于红细胞这种流动迅速且尺寸微小的样品,光相位定量分析难度较大,在假定细胞是静止的前提下,有研究通过仿真建立了细胞的光学相位模型^[11,12]。本文结合离轴干涉、共焦显微和高速图像采集技术发展了一种高精度的非接触式测量流动细胞光相位的技术,实验光路简单,能给出红细胞光相位的定量分布。该技术采用 He-Ne 激光器作为实验室光源,其相干长度较光学相干层析成像(OCT)长,容易产生干涉条纹,并且功率小,对于较薄的透明细胞穿透能力强,能非侵入地观察样品内部结构,因此在生物学和医学领域有一定的应用价值。

2 显微干涉术的基本原理

显微干涉技术是一种新兴的非接触测量微小细胞的技术,广泛用于测量相位物体光学特性^[13~16]。入射光首先被晶体分为两束,其中一束光通过细胞,如图1所示。另外一束光作为参考光,光束的干涉图样可用电荷耦合器件(CCD)记录,若用短时间曝光,即可得到条纹的瞬间照片。由于本装置基于离轴干涉原理,因此只需要一幅干涉图就可实现红细胞的光相位重建,结合图像高速采集技术,该装置可直接用于动态细胞的实时测量,特别是流动红细胞。具体做法为:通过调节物光和参考光间的倾斜角在干涉图的某个方向上产生线性载频,然后通过相位解包法从离轴干涉图中重构出光相位场^[17]。此外,干涉条纹每移动一个条纹间距,光程差就改变一个波长,所以干涉仪的测量精度是其他测量方法无法比拟的。

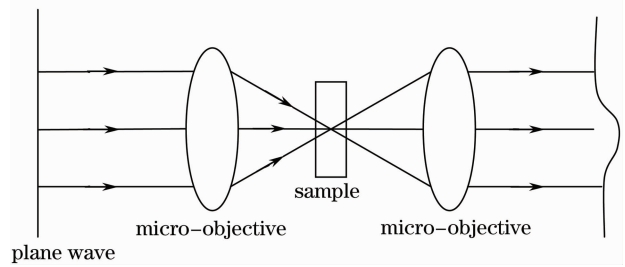


图1 显微干涉术样品光路的原理图

Fig. 1 Schematic of sample arm in microscopic interferometry

图1所示是显微干涉术样品光路的原理图(透射式)。取光强归一化的激光束中央光强大于 $1/e^2$ 的部分,近似看作平面波,通过物镜到达样品面前是会聚的球面波,光透过焦点处的样品后产生相位延迟,从而产生波面畸变的发散球面波,再经过一个共轭的显微物镜后,将转变为一个波面畸变的平面波,这个经调制的平面波携带着细胞的全部信息。由于细胞的透明性很好,因此忽略吸收和散射因素的影响。

整个装置中,干涉强度公式可表示为

$$I(x, y) = I_1(x, y) + I_2(x, y) + 2\sqrt{I_1(x, y)I_2(x, y)}\cos[\varphi - \Delta\varphi(x, y)], \quad (1)$$

式中 $I(x, y)$ 代表干涉图的光强, $I_1(x, y)$ 和 $I_2(x, y)$ 分别为参考波和物波的光强, φ 是两光路的初始相位差。光线穿越待测细胞时引入的相位差可表示为

$$\Delta\varphi(x, y) = \int \Delta n(x, y, z) dz, \quad (2)$$

式中 $\Delta n(x, y, z)$ 为样品在空间点 (x, y, z) 与周围介质的折射率之差。由于生物细胞的存在,使得光线在穿越细胞过程中产生相位延迟或者光程差,干涉条纹的形状、位置和间距发生变化,细胞本身的物理和化学信息包含在这变形的条纹中。

对于生物细胞的形态检测,分辨率是非常重要的指标。共焦显微技术能实现普通显微技术所不能达到的高分辨率。当样品处在焦平面上时,由于物镜焦点处单位光强大,所以干涉条纹对比度高;随着样品面离焦量增加,条纹分辨率随之降低,焦点处条纹对比度的改善有利于提高干涉图像后期处理的精度。

更重要的是 He-Ne 激光器出射的激光束光斑直径约为红细胞直径的几百甚至上千倍,而经过显微物镜聚焦的光斑,其大小和细胞的尺寸处于同一量级,相对而言干涉图中细胞的面积占有率变大,反过来说对细胞进行了放大成像,提高了图像的分

辨率,方便后期相位重构。

3 实验及分析

3.1 红细胞干涉图采集实验

红细胞作为血液中最多的血细胞,在机体气体运输方面起着非常重要的作用,其数量过多、过少或结构异常,都是机体疾病的表征^[18]。实验样品选择的是兔子的红细胞,直径约为 $7\sim 8\ \mu\text{m}$,呈双凹圆盘状,中间较薄(约为 $1\ \mu\text{m}$),边缘较厚(约为 $2\ \mu\text{m}$),没有细胞核。为了使细胞保持正常的大小及形态,将其保存于等渗溶液(质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液)中,并且等渗液的折射率和红细胞相近,实验时起到匹配率液的作用。

干涉实验装置类似马赫-曾德尔干涉仪,如图 2 所示。一束 45° 线偏振 He-Ne 激光($\lambda=632.8\ \text{nm}$, $P=4\ \text{mW}$, $\phi=0.7\ \text{mm}$)扩束准直后($M=f_2/f_1=80/10=8$)经分束镜分为参考光和物光,物光经过共焦显微系统和样品,经棱镜合束后产生干涉条纹。考虑到细胞最细小结构的观测能满足阿贝标准且能

被 CCD 捕捉到,实验时选用 $25\times(25/1.48, 160/0.17)$ 的显微物镜。调整反射镜 2 的左右倾角,使参考光和物光的夹角变化,即引入空间调制量,满足离轴干涉的条件得到较密集的干涉条纹。在共轭物镜的共焦点处放入红细胞样品,透过样品的光线由于光程发生变化,致使干涉条纹发生偏移和扭曲,细胞的物理和化学形态信息就包含其中。由于细胞的流动极快,使用高速 CCD(Mintron MC1310)采集干涉条纹,像素大小为 $12\ \mu\text{m}\times 12\ \mu\text{m}$,当像素数取 $1000\ \text{pixel}\times 512\ \text{pixel}$ 时每秒可采集 500 幅图像。图 3 为实验记录的红细胞的干涉图,方框所示区域为红细胞的所在位置,图像中没有干涉条纹的背景区域已剪裁。图中看出,红细胞所在位置的干涉条纹存在明显的弯曲和偏移;该变化区域外呈现圆盘状,和细胞的外形一致。虽然红细胞所在区域的条纹亮度略低于周围条纹,但条纹亮度的一致性较好,这也说明红细胞存在非常微弱的吸收,但是这种吸收的均匀性非常好,因此这种亮度的变化不会对相位提取产生明显的影响。

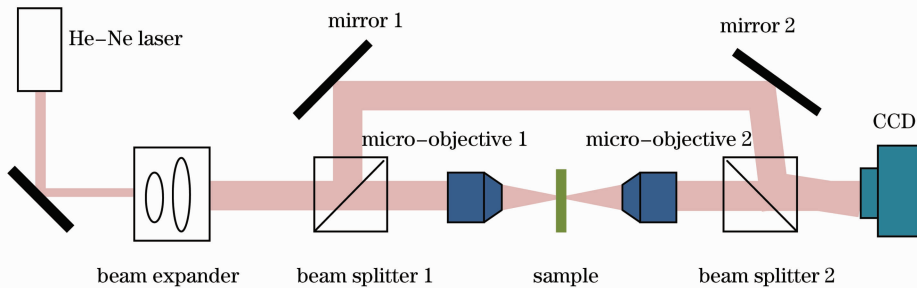


图 2 显微干涉实验图

Fig. 2 Experimental setup for microscopic interferometry

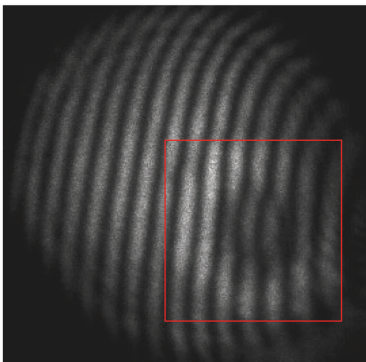


图 3 红细胞干涉图

Fig. 3 Interferogram of a red blood cell

3.2 红细胞光相位场

后期的相位重构通过软件进行。首先提取细胞的相位场,对载频干涉图进行二维傅里叶变换,得到其频谱分布,选取适当的滤波窗,取出正一级谱信息

移至整个频谱中心,去除其它级频谱,接着进行二维傅里叶逆变换和反正切计算后得到细胞的包裹相位,如图 4 所示。

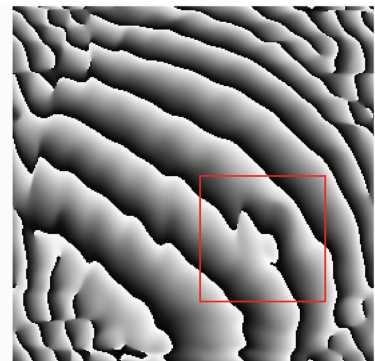


图 4 红细胞解包裹相位

Fig. 4 Wrapped phase of a red blood cell

用反三角函数求解细胞相位场时,相位被截断在反三角函数的主值区间 $[-\pi, \pi]$ 内,为消除相位跃变的影响,必须对此波面进行解调制。本文基于路径无关的解包算法对包络进行解包,结果如图5所示。四周细胞膜的光相位值较大;中央有一块光相位明显低于其它部分的圆形区域,呈凹陷状,宽度约占整个细胞的 $1/4 \sim 1/3$;整个相位场中,最大和最小相位值相差约 2.5 rad ,和已有仿真出的光学相位模型吻合得很好^[4]。通过这些特征可以对生物体的病症进行判断,如果生物体有高血脂症,细胞骨架被明显破坏,中间凹陷面积减小,细胞变平,表现在相位场分布上则是最大值与最小值的差值变小。不足的是,实验中细胞骨架已经开始变形,这与细胞测

试前经过多道程序准备已经不再新鲜有关。

实验中选用的显微物镜数值孔径为 0.40 ,由于共焦显微分辨率是传统显微镜的 1.4 倍,可知该共焦显微系统的理想分辨率为 $0.63 \mu\text{m}$ 。同时,根据CCD有效光敏面的数量及被测生物体的尺寸,得知CCD每个光敏元对应的物体大小为 $0.20 \mu\text{m}$ 。结合两者,所用实验系统的分辨率应达到 $0.63 \mu\text{m}$ 。从图5中细胞及细胞膜的宽度可以看出,这个分辨率与实验结果是相符的。要说明的是,若所用的显微物镜放大倍数足够大[数值孔径(NA)相应够大],还能获得更高的分辨率,或者说,提高系统的分辨率在技术上还有潜力^[19]。

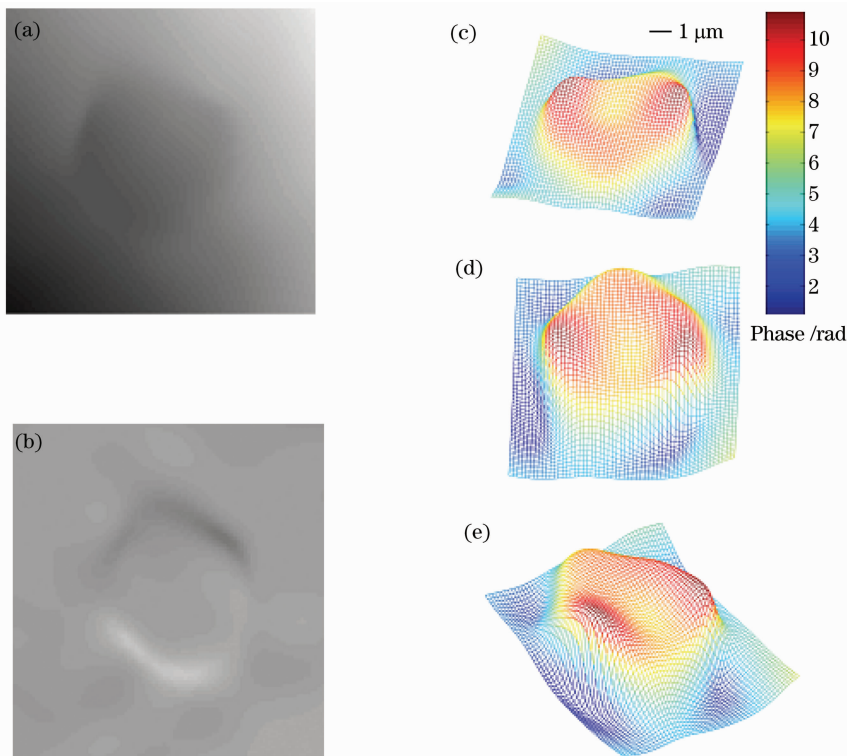


图5 血红细胞相位分布。(a)含载频量的相位分布,(b)消载频的相位分布,(c)~(e)多角度的相位分布三维图
Fig. 5 Phase distributions of a red blood cell. (a) unwrapped phase distribution of a carrier fringe, (b) unwrapped phase distribution with carrier component removed, (c)~(e) 3D rendering of (b) with different views

4 结 论

结合离轴干涉和共焦显微术定量获取流动生物细胞的光相位场信息,这是普通显微镜不能做到的,因此显微干涉术对生命科学领域有着重要的意义。本文方法的特点是利用共焦显微术对尺寸小的生物细胞进行放大测量;基于干涉原理搭建的实验系统精度高,适用于微细结构的观测;结合高速CCD采集装置和傅里叶相位提取技术,可以测量流动细胞

的相位场。实验中,以血红细胞为样本,完成了干涉测量和相位重构,得到了细胞的光相位定量分布,且系统分辨率达到亚微米量级。

参 考 文 献

- 1 D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin *et al.*. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, **254**(5035): 1178~1181
- 2 Li Peng, Huang Run, Gao Wanrong. Experiment research on optical coherence tomography of human skin[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2498~2502

- 李 鹏, 黄 润, 高万荣. 光学相干层析术在人体皮肤成像方面的实验研究[J]. 中国激光, 2009, **36**(10): 2498~2502
- 3 Duan Lian, He Yonghong, Zhu Rui *et al.*. Development of a spectrum domain 3D optical coherence tomography system[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2528~2533
- 段 炼, 何永红, 朱 锐等. 三维谱域光学相干层析成像系统的研制[J]. 中国激光, 2009, **36**(10): 2528~2533
- 4 Wang Yawei, Lei Haina, Bu Min *et al.*. Distribution characteristics and identification of several typical blood cells under optical phase models[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2629~2635
- 王亚伟, 雷海娜, 卜 敏等. 几种典型血细胞的光学相位模型及其分布特征与识别方法[J]. 中国激光, 2009, **36**(10): 2629~2635
- 5 Wang Yawei, Han Guangcai, Liu Yin *et al.*. Light scattering virtual simulation of red blood cell under double curve symmetrical model [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(12): 1676~1681
- 王亚伟, 韩广才, 刘 莹等. 双曲面对称体红细胞模型的光散射虚拟仿真[J]. 中国激光, 2007, **34**(12): 1676~1681
- 6 D. J. Stephens, V. J. Allan. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, **300**(5616): 82~86
- 7 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
- 8 H. Ding, Z. Wang, F. Nguyen *et al.*. Fourier transform light scattering of inhomogeneous and dynamic structures[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2008, **101**(23): 238102
- 9 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
- 10 Y. K. Park, G. Popescu, K. Badizadegan *et al.*. Diffraction phase and fluorescence microscopy [J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(18): 8263~8268
- 11 Wang Yawei, Han Guangcai, Liu Ying *et al.*. Simulation study on the phase distribution of blood cells by virtual imitation[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(6): 1595~1600
- 王亚伟, 韩广才, 刘 莹等. 血液细胞光相位分布特征的虚拟仿真研究[J]. 中国激光, 2009, **36**(6): 1595~1600
- 12 Yuan Run, Wang Yawei, Cai Lan. Several optical approximate model and light message distribution characteristics of red blood cells[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2614~2618
- 袁 润, 王亚伟, 蔡 兰. 红细胞的几种光学近似模型及其光信息分布特征[J]. 中国激光, 2009, **36**(10): 2614~2618
- 13 W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan *et al.*. Tomographic phase microscopy[J]. *Nat. Methods*, 2007, **4**(9): 717~719
- 14 G. N. Vishnyakov, G. G. Levin. Interferometric computed-microtomography of 3D phase objects [C]. *SPIE*, 1997, **2984**: 64~71
- 15 Xue Liang, Lai Jiancheng, Li Zhenhua. Determining the optimal imaging position in tomographic interference microscopy [C]. *SPIE*, 2009, **7513**: 75130Z-1
- 16 H. Iwai, C. Fang-Yen, G. Popescu. Quantitative phase imaging using actively stabilized phase-shifting low-coherence interferometry[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **29**(20): 2399~2401
- 17 Wang Chao, Feng Guoying. A new algorithm for phase reconstruction from a single carrier-frequency interferogram[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(7): 1269~1273
- 王 超, 冯国英. 从一幅载频全息图中实现相位重构的新算法[J]. 光学学报, 2008, **28**(7): 1269~1273
- 18 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Yin Xiaolin *et al.*. Single-cell Raman spectral analysis of oxygenated and deoxygenated thalassemia erythrocyte[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(10): 2854~2859
- 陈秀丽, 王桂文, 尹晓林等. 单细胞拉曼光谱分析地中海贫血红细胞的氧合态和去氧态[J]. 光学学报, 2009, **29**(10): 2854~2859
- 19 Dong Keping, Qian Xiaofan, Zhang Lei *et al.*. Digital holographic microscopy study for cells [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(11): 2013~2016
- 董可平, 钱晓凡, 张 磊等. 数字全息显微术对细胞的研究[J]. 光子学报, 2007, **36**(11): 2013~2016