



# 博士研究生学位论文

题目：光学衍射层析显微成像的研究

---

姓 名： 董大山

学 号： 1401110190

院 系： 物理学院

专 业： 光学

研究方向： 非线性光学与光谱

导 师： 施可彬

2019年5月



## 版权声明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人，未经本论文作者同意，不得将本论文转借他人，亦不得随意复制、抄录、拍照或以任何方式传播。否则一旦引起有碍作者著作权之问题，将可能承担法律责任。





## 摘要

随着光学理论、光学材料及其加工工艺、光电器件的不断完善和发展，各种新的光学显微成像技术不断涌现。以定量相位成像为代表的无标记成像技术，不受限于外源标记物引入的诸多限制，在生物医学研究中有着广泛的应用。光学衍射层析显微成像是一种新兴的无标记光学显微成像技术，通过结合定量相位成像技术和衍射层析理论，可对活细胞进行长时间的三维高分辨无损成像，在生物医学领域有着广阔的应用前景。

然而，由于光学衍射层析光学架构复杂且算法不够成熟，其未能大规模应用于生物医学研究中。光学衍射层析显微技术有着两方面问题亟需解决：一方面，光学衍射层析数据量大，计算过程复杂，难以用于对偶发生命现象的连续观察，目前的研究中未能充分发挥其无标记成像的优势。另一方面，在实现无标记成像的同时，光学衍射层析的化学选择性成像能力受限，仅能提供形态学的表征，在实际生物学研究中有必要与荧光、拉曼等特异性成像模态结合。

本论文致力于光学衍射层析显微技术的研究，主要研究内容包括：

1. 提出了一种带复解卷积的衍射层析重构算法，并实现了一种适合高速光速衍射层析成像的快速衍射层析重构程序。其在实际成像中能有效解决成像系统波动及偶发异常引起的重构中断，有较高的容错性和鲁棒性，保证了生物细胞成像中长时间、高通量的衍射层析数据的及时处理，为光学衍射层析在生物医学领域的进一步应用铺平了道路。
2. 搭建了一套高速线性光学衍射层析成像系统，通过对振镜高速扫描系统的同步控制，实现了 $0.82\text{ Hz}$ 的高速三维成像（成像区域为 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ ）。一系列生物细胞成像、微纳器件表征结果验证了光学衍射层析技术在三维成像、无标记成像、快速长时程成像中的优势。
3. 搭建了超分辨荧光辅助衍射层析双模态成像系统，通过海森结构光照明荧光成像辅助无标记的光学衍射层析成像。可以 $0.5\text{ Hz}$ 的速度对 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ 的视场范围同时进行无标记光学衍射层析三维成像和超分辨荧光二维成像。光学衍射层析模态横向分辨率达 $200\text{ nm}$ ，纵向分辨率达 $560\text{ nm}$ ，结构光荧光模态横向分辨率达 $100\text{ nm}$ 。超分辨荧光成像为光学衍射层析图像的形态学鉴别提供了有力的化学特异性佐证，将极大推进光学衍射层析在生物医学研究中的应用。
4. 提出利用相干反斯托克斯拉曼散射实现光学衍射层析的新方法，指出通过相位失配调控获得更高分辨率的可能性，在数值模拟基础上验证了其实现化学特异性三维成像的可行性。

5. 利用超分辨荧光辅助衍射层析双模态成像系统，对活细胞中各种细胞器进行了完整的荧光共定位成像。有效解析了光学衍射层析活细胞图像中的七种主要细胞器。对多种哺乳动物细胞内广泛存在的一种低折射率囊泡进行了基于荧光共定位成像的鉴别，并证明其为一种新型内体；对细胞内主要细胞器动态及相互作用进行了全面的观察。

**关键词：**衍射层析，显微成像，数字全息，折射率测量

# Research on optical diffractive tomographic microscopy

Dashan Dong (Optics)

Directed by Kebin Shi

## ABSTRACT

With the improvement and advance of optical theory, optical materials, optical craft, and optoelectronic devices, a great variety of new optical microscopy imaging technology has been developed. Label-free imaging technology, represented by quantitative phase imaging has a wide range of applications in biomedical research without restrictions from external markers. As an emerging label-free microscopy technology, optical diffraction tomography (ODT) combines quantitative phase imaging with diffraction tomography theory and can perform long-term three-dimensional (3D) high-resolution non-invasive imaging on living cells, which has a promising future in the biomedical applications.

However, due to the complicated optical setup and immature algorithm, ODT has not been widely applied in biomedical research. Two problems of ODT need to be solved: On the one hand, with large data amount and complicated data processing procedures, it is difficult to continuously observe the incidental life phenomena. Its advantage of label-free imaging has not been given a full play in current research. On the other hand, due to the label-free nature of ODT, the chemical imaging capability is limited to providing morphological representations. Therefore, it is necessary to combined ODT with fluorescence, Raman, or other chemical imaging modalities in biomedical researches.

This thesis is devoted to the study of optical diffraction tomography. The researches include:

1. A diffraction tomography reconstruction algorithm with complex deconvolution was proposed. A fast diffraction tomography reconstruction program was implemented for fast and robust data processing in ODT. This program could effectively solve the reconstruction interruptions caused by fluctuations of the imaging system and accidental anomalies. With high fault tolerance and robustness, this program ensures the timely processing of long-term high-flux diffraction tomographic data in living cell imaging,

paving the way for further application of ODT in the biomedical field.

2. A high-speed linear ODT system was built to achieve high-speed 3D imaging at 0.82 Hz by synchronous control of the galvanometer high-speed scanning system (image area is  $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ ). A series of biological cell imaging and representation of nano-devices demonstrate the advantages of the ODT system in 3D imaging, label-free imaging, and fast long-term imaging.
3. A super-resolution fluorescence-assisted diffraction computational tomography (SR-FACT) dual-modality imaging system was established, which combines label-free 3D ODT imaging modality with 2D Hessian structured illumination microscopy (Hessian SIM) modality. 3D ODT imaging and 2D Hessian SIM imaging could be simultaneously performed on the field of view of  $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$  at a speed of 0.5 Hz. The ODT modality has a lateral resolution of 200 nm, a vertical resolution of 560 nm, and Hessian SIM modality has a lateral resolution of 100 nm. Super-resolution fluorescence imaging provides strong chemical-specific evidences for the morphological identification in ODT imaging, which will greatly boost the application of diffraction tomography in biomedical research.
4. A new method for ODT using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) is proposed. The possibility of obtaining higher resolution through phase mismatch control is pointed out. Based on numerical simulation, the possibility of chemically specific 3D imaging was verified.
5. By using the SR-FACT dual-modality imaging system, an exhaustive fluorescence co-localization imaging of various organelles in living cells was performed. Seven conventional cellular organelles were able to be resolved in live cell ODT images. A novel subpopulation of endosomes named black-vacuole endosomes, which are conserved in multiple types of mammalian cells was identified based on fluorescence co-localization results. The dynamic and complicated organelle interactions in live cell was visualized.

**KEYWORDS:** Diffractive tomography, Microscopic imaging, Digital holography, Refractive index measurement

# 目录

<b>第一章 绪论</b>	<b>1</b>
1.1 光学显微技术概述 . . . . .	1
1.1.1 显微镜的发展历史 . . . . .	1
1.1.2 光学显微镜的分类 . . . . .	4
1.1.3 光学显微镜的主要参数 . . . . .	5
1.2 定量相位成像技术概述 . . . . .	7
1.2.1 基于相位恢复算法的定量相位成像 . . . . .	7
1.2.2 基于数字全息的定量相位成像 . . . . .	7
1.2.3 基于时域调制全息技术的定量相位成像 . . . . .	10
1.2.4 定量相位成像显微镜概述 . . . . .	12
1.3 光学衍射层析显微技术概述 . . . . .	12
1.3.1 光学衍射层析显微技术的发展历史 . . . . .	12
1.3.2 光学衍射层析显微镜技术的研究现状 . . . . .	14
1.4 本文的主要内容 . . . . .	19
<b>第二章 衍射层析的理论及算法研究</b>	<b>21</b>
2.1 衍射层析成像理论 . . . . .	21
2.1.1 波动方程 . . . . .	21
2.1.2 散射理论 . . . . .	23
2.1.3 傅里叶衍射定理 . . . . .	27
2.1.4 衍射层析三维重构 . . . . .	30
2.2 快速衍射层析成像算法 . . . . .	32
2.2.1 频域内插方法 . . . . .	32
2.2.2 数据处理流程 . . . . .	32
2.3 本章小结 . . . . .	36
<b>第三章 线性光学衍射层析显微成像</b>	<b>39</b>
3.1 线性光学衍射层析成像系统 . . . . .	39
3.1.1 光学系统架构 . . . . .	39
3.1.2 同步控制系统 . . . . .	41
3.1.3 校准和表征 . . . . .	43

---

3.1.4 全息带宽控制 . . . . .	45
3.1.5 分辨率估算 . . . . .	45
3.1.6 成像结果 . . . . .	46
3.2 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统 . . . . .	51
3.2.1 结构光照明荧光显微技术概述 . . . . .	52
3.2.2 光学系统架构 . . . . .	55
3.2.3 同步控制系统 . . . . .	56
3.2.4 双模态成像数据处理 . . . . .	59
3.2.5 系统分辨率表征 . . . . .	59
3.3 本章小结 . . . . .	60
<b>第四章 基于相干反斯托克斯拉曼散射的光学衍射层析</b>	<b>61</b>
4.1 相干反斯托克斯拉曼散射 . . . . .	61
4.1.1 相干反斯托克斯拉曼散射技术概述 . . . . .	61
4.1.2 相干反斯托克斯拉曼散射在显微成像中的应用 . . . . .	63
4.2 相干反斯托克斯拉曼散射层析成像原理 . . . . .	64
4.3 基于光束传播的相干反斯托克斯拉曼散射层析成像的数值模拟 . . . . .	66
4.3.1 散射过程的相位匹配问题 . . . . .	66
4.3.2 基于数值模拟的 CARS 光学衍射层析 . . . . .	67
4.4 本章小结 . . . . .	69
<b>第五章 双模态成像系统的生物学应用</b>	<b>71</b>
5.1 基于荧光共定位的高速细胞成像 . . . . .	71
5.2 光学衍射层析成像中低折射率囊泡的研究 . . . . .	74
5.3 光学衍射层析成像中细胞器相互作用的研究 . . . . .	75
5.4 本章小结 . . . . .	79
<b>第六章 结论及展望</b>	<b>81</b>
6.1 全文结论 . . . . .	81
6.2 未来工作展望 . . . . .	82
<b>参考文献</b>	<b>85</b>
<b>攻读博士学位期间论文发表情况</b>	<b>95</b>
<b>致谢</b>	<b>97</b>
<b>北京大学学位论文原创性声明和使用授权说明</b>	<b>99</b>

# 第一章 绪论

二十一世纪以来，生物学和医学的蓬勃发展不断地提高着人类对生命本质的认识，极大推动人类文明发展。随着生物医学研究的不断发展，其前沿研究已经深入细胞，力图在分子尺度上解密生命过程。光学显微技术是现代分子生物学研究的有力工具，它的发展推动着人类对生命现象的观察和理解不断进步。

光学显微镜是利用光与物质的相互作用呈现物体微观结构的装置。自光学显微镜发明以来，其一直是生物医学领域最常用的工具，传统的透镜与可见光照明支撑了约80%的显微研究<sup>[1]</sup>。由于细胞光学透明的特性，唯有光学显微能实现活细胞的非侵入无标记成像<sup>[2]</sup>。尽管光学显微成像技术已有了长足的进步，其仍然是一个十分活跃的研究领域，旨在突破在时空分辨率、对比度、穿透深度、化学选择能力以及定量能力等方面限制。

光学衍射层析显微是一种对细胞和组织进行非侵入无标记三维成像的技术。由于其结合了定量相位成像技术和散射理论，光学衍射层析显微成像技术能够感知纳米尺度的形态学变化，可以对活细胞进行长时间高分辨率无损伤成像。作为观测细胞动态变化的一种有力工具，其在细胞代谢、病理学及肿瘤诊断等方面有着巨大的应用前景。然而，这种新兴的无标记成像技术还有一些亟需解决的问题，未能实现在生物医学研究中的大规模使用。本文致力于解决光学衍射层析成像在细胞生物学研究中的应用问题，提出了一些新理论新方法来进一步提高光学衍射层析显微技术的性能。

本章主要对本论文的研究背景进行介绍。首先介绍光学显微技术的发展概况。然后介绍定量显微成像技术及其发展概况，概述定量成像技术的发展历程。之后介绍光学衍射断层显微成像技术发展概况，明确本文研究领域的国内外研究现状。最后介绍本文的研究思路和具体结构安排。

## 1.1 光学显微技术概述

光学显微镜是利用光学系统对人眼无法分辨的微小物体进行放大成像，以观察样品微细结构的光学仪器。它的发明为观察微米和亚微米尺度的微观结构提供了有力工具，被广泛应用于生物学、医学、材料科学等领域。

### 1.1.1 显微镜的发展历史

早在公元前一世纪，人类就已经发现了通过球形透明物体可以放大成像的现象。13世纪，这种球面玻璃被命名为透镜。随着玻璃制作工艺的进步，1590年左右，荷兰和

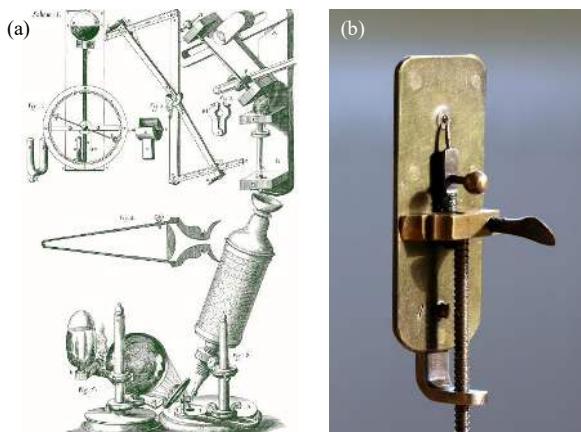


图 1.1 早期显微镜。(a) 胡克的复式显微镜; (b) 列文虎克的单式显微镜

意大利的眼镜制造者已制出了类似显微镜的放大仪器。胡克<sup>①</sup>在 1665 年首次设计制造了带有调焦机制、照明系统和载物台的复式显微镜(图1.1(a))。“细胞”的英文 cell, 即源于他用显微镜对植物木栓上的气孔的观察。同时代的列文虎克<sup>②</sup>手工自制显微镜片, 制作单物镜的单式显微镜(图1.1(b)), 首先观察并描述了单细胞生物、肌纤维、细菌、精子及微血管中的血流, 开创了微生物学。列文虎克去世后, 因无人追随其研究, 微生物学进入黑暗时期。当时人们相信, 微生物仅是稀奇的, 对社会的影响极微。其后的近两百年间, 显微镜一直没有较大的改进出现。直到 19 世纪 20 年代, 亚美奇<sup>③</sup>制成了改进的消色差显微镜, 使人们得以仔细观察有机细胞。1839 年, 植物学家施莱登<sup>④</sup>和动物学家施旺<sup>⑤</sup>基于动植物的显微观察, 共同提出了细胞学说, 认为细胞是动物和植物结构和生命活动的基本单位。19 世纪 50 年代, 德国工程师卡尔·蔡司<sup>⑥</sup>尝试改进显微镜使用的简单透镜。1866 年, 物理学家阿贝<sup>⑦</sup>加入蔡司工作室, 并于 1872 年与蔡司联合制作出了复合式显微镜, 这台复合式显微镜是现代所有复合式显微镜的始祖。阿贝的研究奠定了显微镜成像的古典理论基础。1879 年, 蔡司工作室与玻璃化学家肖特<sup>⑧</sup>合作很快在 1886 年生产出了可满足阿贝正弦条件的高度消色差物镜。同时, 油浸物镜也被阿贝改进, 至此普通光学显微镜技术基本成熟。

显微镜结构日趋完善的同时, 改进成像机制以提高成像对比度成为新的发展方向。在显微镜发明的早期, 就已经出现了利用倾斜照明提高成像对比度的暗场显微镜(Dark Field Microscopy)<sup>[3]</sup> 和利用样品双折射特性成像的偏光显微镜(Polarized Light Mi-

<sup>①</sup> Robert Hooke, 1635–1703

<sup>②</sup> Antonie Philips van Leeuwenhoek, 1632–1723

<sup>③</sup> Giovanni Battista Amici, 1786–1863

<sup>④</sup> Matthias Jakob Schleiden, 1804–1881

<sup>⑤</sup> Theodor Schwann, 1810–1882

<sup>⑥</sup> Carl Zeiss, 1816–1888

<sup>⑦</sup> Ernst Karl Abbe, 1840–1905

<sup>⑧</sup> Friedrich Otto Schott, 1851–1935

croscopy)<sup>[4]</sup>。1935 年, 泽尔尼克<sup>(9)</sup>发明了相衬显微镜 (Phase Contrast Microscopy)<sup>[5]</sup>, 将光线穿过样品之后产生的微小相位差作为成像对比机制。1955 年, 诺马斯基<sup>(10)</sup>发明了微分干涉相差显微镜 (Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy)<sup>[6]</sup>, 广泛用于未染色的活体组织成像之中。

染色法及荧光成像的出现开启了特异性成像的大门。19 世纪末期到 20 世纪初, 以卡加尔<sup>(11)</sup>和高尔基<sup>(12)</sup>为首的一群组织学家首先发展出了显微镜染色观察法, 为显微解剖学奠定了基础。1911 年, 第一台荧光显微镜在一台紫外光源的显微镜上改装而成。1941 年, 昆氏<sup>(13)</sup>在抗体上加上荧光染料用于细胞抗原侦测。1960 年, 激光的发明为显微镜提供了新光源, 大大促进了荧光显微技术的发展。1961 年, 共聚焦的概念被提出, 提高了荧光显微镜的断层成像能力。1962 年, 下村修<sup>(14)</sup>从维多利亚多管水母中分离出了绿色荧光蛋白, 但当时人们并未认识到其应用前景。1981 年, 全内反射荧光显微镜 (Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy)<sup>[7]</sup> 被发明, 实现了对细胞表面的薄层成像。1990 年, 双光子荧光显微镜 (Two-Photon Excitation Fluorescence (TPEF) Microscopy)<sup>[8]</sup> 被实现, 大大提高了荧光显微镜的成像深度。1994 年, 查尔菲<sup>(15)</sup>将绿色荧光蛋白克隆到表达载体中, 对大肠杆菌和线虫细胞进行了荧光显微成像<sup>[9]</sup>。之后钱永健<sup>(16)</sup>改造得到更为实用的增强绿色荧光蛋白及其他多种突变<sup>[10]</sup>, 荧光蛋白和荧光成像技术开始广泛用于生物学研究。同一时期, 艾力克·贝齐格<sup>(17)</sup>、谢晓亮<sup>(18)</sup>等人对单分子成像进行了研究<sup>[11,12]</sup>, 生物成像正式进入单分子成像的时代。进入二十一世纪, 随着对荧光分子发光特性研究的不断深入, 利用其各种特性, 便可以突破经典理论中阿贝提出的光学衍射极限, 实现超分辨率成像。1997 年, 威廉姆·莫纳尔<sup>(19)</sup>与钱永健<sup>(16)</sup>发现了绿色荧光蛋白的光转化效应<sup>[13]</sup>, 开启了对荧光蛋白特性的研究和改造。斯特凡·赫尔<sup>(20)</sup>利用荧光的非线性机制突破衍射极限, 分别于 2000 年、2016 年发明了受激发射损耗显微镜 (Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy)<sup>[14]</sup> 和可逆饱和荧光跃迁显微镜 (Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions (RESOFT) Microscopy)<sup>[15]</sup>。2006 年, 同时出现了多种利用单分子荧光开光实现超分辨率分子定位的超分辨荧光显微技术。利用分子光源发光的时域复杂性, 艾力克·贝齐格<sup>(17)</sup>和萨缪

<sup>(9)</sup> Frits Zernike, 1888–1966, 1953 年诺贝尔物理学奖得主

<sup>(10)</sup> Georges Nomarski, 1919–1997

<sup>(11)</sup> Santiago Ramón y Cajal, 1852–1934, 1906 年诺贝尔生理学或医学奖得主

<sup>(12)</sup> Camillo Golgi, 1843–1926, 1906 年诺贝尔生理学或医学奖得主

<sup>(13)</sup> Albert Hewett Coons, 1912–1978

<sup>(14)</sup> 下村修 / しもむらおさむ, 1928–2018, 2008 年诺贝尔化学奖得主

<sup>(15)</sup> Martin Chalfie, 1947–, 2008 年诺贝尔化学奖得主

<sup>(16)</sup> Roger Yonchien Tsien, 1952–2016, 2008 年诺贝尔化学奖得主

<sup>(17)</sup> Robert Eric Betzig, 1960–, 2014 年诺贝尔化学奖得主

<sup>(18)</sup> Xiaoliang Sunney Xie, 1962–

<sup>(19)</sup> William Esco Moerner, 1953–, 2014 年诺贝尔化学奖得主

<sup>(20)</sup> Stefan Walter Hell, 1962–, 2014 年诺贝尔化学奖得主

尔·海斯<sup>②1</sup>各自独立发明了光活化定位显微镜 (Photo-Activated Localization Microscopy (PALM or fFPALM))<sup>[16,17]</sup>。利用分子光源的化学复杂性庄小威发明了随机光学重构显微镜 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM))<sup>[18]</sup>。

二十世纪 90 年代以来，以飞秒激光为代表的超快光源，在荧光显微成像中大展身手的同时，也被用于各种无标记显微成像技术中，如二次谐波显微镜 (Second-Harmonic Generation (SHG) microscopy)<sup>[19]</sup>、三次谐波显微镜 (Third-Harmonic Generation (THG) Microscopy)<sup>[20]</sup>、相干反斯托克斯拉曼散射显微镜 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy)<sup>[21]</sup>、受激拉曼散射显微镜 (Simulated Raman Scattering (SRS) Microscopy)<sup>[22]</sup> 等。

经过了四个世纪的发展，光学显微镜已成为生物医学研究中最常用的工具<sup>[1]</sup>。显微技术的发展一直伴随着微生物学和细胞生物学的发展，显微技术的进步从根本上改变了人类对生物体内细胞和分子的观察方式，使得细胞生物学的研究从对固定细胞的非定量唯象观察逐步变为对活细胞的高通量定量数据采集。对细胞和组织的显微成像已是现代生物医学研究的核心方法之一。

### 1.1.2 光学显微镜的分类

随着各种新颖的光学显微技术的出现，显微镜的种类日益繁杂。

按照成像结果是否具有化学分辨能力，可将显微镜分为非特异性成像显微镜和特异性成像显微镜。早期显微镜如明场显微镜、暗场显微镜、偏光显微镜、相衬显微镜、微分干涉相差显微镜及新兴的二次谐波显微镜、三次谐波显微镜都属于非特异性成像显微镜。而荧光显微镜、各种荧光超分辨率显微镜、拉曼显微镜、相干反斯托克斯拉曼散射显微镜、受激拉曼显微镜等都属于特异性成像显微镜，其成像结果具有化学分辨能力。

按显微镜成像方式，显微镜可分为宽场显微镜和点扫描显微镜两大类，以下详细介绍这两类显微镜。

#### 1.1.2.1 宽场显微镜

在宽场显微镜中，整个样品成像区域同时暴露在光源照射下，成像结果通过光学系统成像在人眼或者相机上。由于是面阵探测器采集图像，宽场显微镜具有成像通量大、成像速度快、对光源稳定性要求低的优点。传统的宽场显微镜分辨率受限于衍射极限，几乎不具备光学切片能力，难以进行三维成像。为实现快速的三维成像，1993 年出现的光片显微镜 (Light-sheet Microscopy)<sup>[23]</sup> 通过柱透镜聚焦激发光，选择性激发片

<sup>②1</sup> Samuel Hess

状区域内的荧光；再利用与激发物镜垂直的探测物镜宽场成像。之后 Huisken 等进一步改进了光片显微镜，发明了选择平面照明显微 (Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM))<sup>[24]</sup>，进一步提高了成像速度，并应用于胚胎和模式生物的快速三维荧光成像中。

### 1.1.2.2 点扫描光学显微镜

点扫描显微镜与宽场显微镜的成像方式不同，将照明光或激发光聚焦于样品上一点后，光斑范围内产生的信号被收集到点探测器中；通过样品的移动或者光斑的扫描，则可得到样品不同位置的信号，并拼接为图像结果。相较宽场显微镜，点扫描显微镜成像过程中样品和光斑的扫描速度受限，难以实现快速成像。但是，由于点状照明使得能量更为集中，点扫描显微镜通常与荧光和拉曼技术相结合，用以实现区域选择性的成像和物性分析，在分子生物学、神经科学、药理学以及材料科学中有着广泛的应用。共聚焦技术<sup>[25,26]</sup> 在点扫描显微镜中有重要意义。通过在成像系统中照明点的共轭像点加入针孔，滤除照明光路上被额外激发的离焦信号，共聚焦显微镜 (Confocal Microscopy) 具有比传统宽场显微镜更好的断层成像能力和横向分辨率<sup>[26]</sup>。

### 1.1.3 光学显微镜的主要参数

光学显微镜的成像能力主要由分辨率、成像信噪比、成像速度、成像深度等参数表征。

#### 1.1.3.1 显微镜的分辨率

显微镜的分辨率是判断其性能的一个重要参数，描述了显微镜解析物体微观细节的能力。分辨率是指光学系统成像时能够分辨的具有最小距离的两个点之间的距离。根据阿贝的成像理论，显微成像系统的分辨率与光波长和成像物镜数值孔径有关。在 Rayleigh 判据<sup>[27]</sup> 下非相干成像系统的分辨率可表示为：

$$\Delta r = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

$$\Delta z = \frac{2\lambda}{NA^2} \quad (1.2)$$

其中  $\Delta r$  表示显微镜的横向分辨率， $\Delta z$  表示显微镜的纵向分辨率， $\lambda$  为波长，NA 为成像系统的数值孔径。

对于相干成像系统，Rayleigh 判据下的横向分辨率为：

$$\Delta r = \frac{0.82\lambda}{NA} \quad (1.3)$$

### 1.1.3.2 成像信噪比

显微成像结果中，有效信号强度和背景噪声信号强度的比值为成像信噪比。显微成像系统中，非成像平面的信号干扰是噪声的重要来源之一，极大影响了显微镜的切片成像能力。共聚焦显微镜、全内反射显微镜和光片显微镜通过光学结构滤除或避免了离焦平面上的干扰。除了样品结构引入的噪声，成像系统本身也会引入一定噪声；如相机或光电探测器的背景噪声、照明光源功率抖动引起的噪声等。随着激光技术和光电探测技术的不断进步，使用高品质的光源、探测器和相机对显微图像信噪比也至关重要。

### 1.1.3.3 成像深度

样品对照明光及信号光的散射和吸收会导致深层成像时成像分辨率和信噪比下降。同时，样品本身也会引起像差，使得显微镜成像深度受限。进来，为提高显微镜的成像深度，多种新型显微技术不断涌现。

双光子荧光显微镜及最近出现的三光子荧光显微镜<sup>[28]</sup> 使用具有更好穿透性的红外飞秒激光作为光源，降低了散射和吸收损耗，可在更深位置激发荧光。多光子荧光更小的吸收截面，使显微镜天然具有了更好的光学切片能力。双光子及三光子荧光显微镜在脑科学、神经科学中具有重大的应用前景。

自适应光学（Adaptive Optical）是解决深层成像问题的另一种方法。通过对样品引入的相差进行实时补偿，基于自适应光学的荧光显微镜具有更深的成像深度和更佳的成像质量<sup>[29,30]</sup>。

另外，利用光声效应，利用具有更好穿透性的超声波辅助深层成像的显微技术进来也发展迅速。光声显微镜 (Photoacoustic Microscopy)<sup>[31,32]</sup> 利用脉冲激光在样品深层产生超声波信号，通过声场对组织中光吸收的分布成像。最近，Lihong. Wang 等实现了时间反演超声编 (Time-Reversed Ultrasonically Encoded (TRUE))<sup>[33]</sup> 光学聚焦技术，用超声波辅助实现组织内的深层光学聚焦。

### 1.1.3.4 成像速度

现代生命科学研究要求对活体细胞、组织、器官乃至生物体进行实时成像，也就要求显微镜具有更快的成像速度。宽场显微镜由于使用面阵探测成像，成像速度与信号强弱和相机帧率有关。提高相机帧率即数据吞吐量，同时保证更快帧率下减少的信号保持足够的灵敏度和信噪比，是提高宽场成像速度的根本方法。同时，利用压缩感知原理，通过正则化算法可在相机帧率受限的前提下提高成像速度<sup>[34,35]</sup>。对于点扫描显微镜，提高成像速度的方法是同时进行多点成像。如针孔阵列转盘式共聚焦显微镜

(Spinning Disk Confocal Microscopy) 中使微透镜阵列和针孔阵列碟片同步旋转，使用面阵探测器记录数据，可实现超过 1000 帧的全幅帧率。

## 1.2 定量相位成像技术概述

在光学测量中，由于光波频率很高，探测器一般无法直接探测光的相位分布。高频电磁波的相位测量问题被称为相位问题 (Phase Problem)<sup>[36,37]</sup>。实际光学测量中，往往只能对光波场的强度进行测量。能够定量地对样品引入的光场相位变化进行测量的成像方法被称为定量相位成像 (Quantitative Phase Imaging (QPI))。

### 1.2.1 基于相位恢复算法的定量相位成像

解决相位问题的第一种方法是通过已知波长的强度或振幅测量结果，直接由算法推演得到相位分布。一般利用波场的先验性信息或在频谱面的多次强度测量<sup>[38]</sup> 来解算相位。相位恢复算法 (Phase Retrieval Algorithm) 指通过强度测量数据恢复光学相位的算法。这种方法虽然在实验上容易实现，但是一般需要耗时较长的迭代进行解算，且其迭代解算结果并不一定确保能收敛到唯一且正确的结果上。常见的相位恢复算法有 Gerchberg-Saxton (G-S) 算法<sup>[39]</sup>、光强传输方程 (Transport of Intensity Equation (TIE)) 算法<sup>[40]</sup> 等。

### 1.2.2 基于数字全息的定量相位成像

解决相位问题的第二种方法是通过全息技术。1948 年，加博尔·德奈什<sup>(22)</sup> 在研究如何提高电子显微镜分辨率时，提出了利用电子波干涉记录振幅和相位的方法<sup>[41]</sup>。这种方法被称为全息术 (Holography)。激光发明之后，Leith 和 Upatnieks 首先提出了光学的离轴记录全息术<sup>[42]</sup>，并由 Denisyuk 第一次在实验上实现<sup>[43]</sup>。随着计算机技术的发展和电荷耦合器件 (Charge Coupled Device (CCD)) 的出现，1994 年 Schnars 第一次实现了完全数字化地全息记录与再现，即数字全息术 (Digital Holography)<sup>[44,45]</sup>。根据全息记录时信号光与参考光之间是否有夹角，数字全息术可分为同轴 (In-Line) 数字全息和离轴 (Off-Axis) 数字全息两种。

#### 1.2.2.1 同轴数字全息

同轴全息记录过程中，三维样品上各平面上每个点的散射或衍射光经成像系统传播到全息像面形成菲涅尔衍射光场作为物光；穿过物体未发生散射的照明光或者与照

<sup>(22)</sup> Gábor Dénes, 1900–1979, 1971 年诺贝尔物理学奖得主

明光同向传播的同源相干准直光束作为参考光；物光与参考光干涉产生的条纹被记录作为全息图像。假设全息平面上的物光和参考光可表示为：

$$\tilde{O}(x, y) = o(x, y)e^{i\phi(x, y)} \quad (1.4)$$

$$\tilde{R}(x, y) = r \quad (1.5)$$

其中  $o(x, y)$  和  $r$  分别表示物光和参考光在全息像面的振幅， $\phi(x, y)$  表示物光在全息像面的相位分布。

物光与参考光干涉形成的光强分布  $I(x, y)$  可表示为：

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |\tilde{O}(x, y) + \tilde{R}(x, y)|^2 \\ &= r^2 + o^2(x, y) + r \cdot o(x, y)e^{i\phi(x, y)} + r \cdot o(x, y)e^{-i\phi(x, y)} \end{aligned} \quad (1.6)$$

同轴全息再现时，使用记录全息图时使用的参考光垂直照射全息图，经全息条纹调制，菲涅尔衍射在相应距离重现图像。此时全息像面后产生的恢复光场  $\tilde{U}(x, y)$  可表示为：

$$\begin{aligned} \tilde{U}(x, y) &= \tilde{R}(x, y)I(x, y) \\ &= r^3 + r \cdot o^2(x, y) + r^2 \cdot o(x, y)e^{i\phi(x, y)} + r^2 \cdot o(x, y)e^{-i\phi(x, y)} \end{aligned} \quad (1.7)$$

式1.7中，等号右侧最后一项表示与再现光强度成正比的共轭物光，共轭物光与原物光反向传播，利用菲涅尔衍射公式即可在全息图后方重现物光。而式1.7中等号右侧三项为全息重现中的干扰项。其中  $r^3$  为背景项，在重现结果中形成均匀背景。 $r \cdot o^2(x, y)$  会形成一定噪声，但一般较小可以忽略。 $r^2 \cdot o(x, y)e^{i\phi(x, y)}$  为与全息恢复光场共轭的共轭项，即通常所说的孪生像 (Twin Image)。孪生像在菲涅尔传播后并不会在全息图后方恢复的像面上聚焦，但仍会对重建图像的清晰度产生影响。

在同轴数字全息中，通常用相机对全息图样进行采集，考虑像素尺寸为  $\Delta p$  的面阵相机。同轴数字全息图像为：

$$I(m\Delta p, n\Delta p) = r^2 + o^2(m\Delta p, n\Delta p) + r \cdot \tilde{O}(m\Delta p, n\Delta p) + r \cdot \tilde{O}^*(m\Delta p, n\Delta p) \quad (1.8)$$

表示  $x$  方向第  $m$  个像素、 $y$  方向第  $n$  个像素上记录的光强。

进行数字同轴全息再现时，一般在忽略式1.8中等号左侧高阶项和共轭像的前提下，利用参考光图像  $I_{Ref}(m\Delta p, n\Delta p)$  归一之后得到全息数字波前：

$$\tilde{U}(m\Delta p, n\Delta p) = \frac{I(m\Delta p, n\Delta p) - I_{Ref}(m\Delta p, n\Delta p)}{\sqrt{I_{Ref}(m\Delta p, n\Delta p)}} \quad (1.9)$$

之后再用离散的菲涅尔衍射公式计算三维光场，相应像面的相位分布由复光场的幅角

求出。为加快积分计算速度，一般可进一步简化菲涅尔衍射公式，使用快速傅里叶变换算法进行快速三维光场重建。

### 1.2.2.2 离轴数字全息

在离轴数字全息中，参考光不再与物光同轴传播，而是存在离轴角  $\theta$ 。离轴角给全息像面上的参考光引入了一定的空间载频  $\alpha = \frac{2\pi \sin \theta}{\lambda}$ ，此时全息像面的参考光可以写为：

$$\tilde{R}(x, y) = r \cdot e^{-i\alpha x} \quad (1.10)$$

与物光  $\tilde{O}(x, y) = o(x, y)e^{i\phi(x, y)}$  干涉后形成的全息图可表示为：

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |\tilde{O}(x, y) + \tilde{R}(x, y)|^2 \\ &= o^2(x, y) + r^2 + r \cdot o(x, y)e^{i\phi(x, y)}e^{i\alpha x} + r \cdot o(x, y)e^{-i\phi(x, y)}e^{-i\alpha x} \end{aligned} \quad (1.11)$$

此时，全息图显示为沿  $x$  方向调制的干涉条纹，条纹中的相位变化直接反应了物光的相位分布。

全息再现时，原参考光产生的恢复光场为：

$$\begin{aligned} \tilde{U}(x, y) &= \tilde{R}(x, y)I(x, y) \\ &= (r^3 + r \cdot o^2(x, y))e^{-i\alpha x} + r^2 \cdot o(x, y)e^{i\phi(x, y)} + r^2 \cdot o(x, y)e^{-i\phi(x, y)}e^{-2i\alpha x} \end{aligned} \quad (1.12)$$

式1.12与式1.7相比，直流背景项和共轭项都加入了偏转角传播。全息图原物光来光方向会产生一个虚像，全息像面后方与原物光两倍离轴角方向上产生一个实像。孪生像之间实现了空间分离。

在数字离轴全息中，采集到的离轴全息图可表示为：

$$\begin{aligned} I(m\Delta p, n\Delta p) &= r^2 + o^2(m\Delta p, n\Delta p) \\ &\quad + r \cdot \tilde{O}(m\Delta p, n\Delta p)e^{i\alpha m\Delta p} + r \cdot \tilde{O}^*(m\Delta p, n\Delta p)e^{-i\alpha m\Delta p} \end{aligned} \quad (1.13)$$

进行数字离轴全息再现时，首先将数字全息图与参考相位  $e^{-i\alpha m\Delta p}$  相乘，再通过低通空间滤波将直流项和共轭项滤除，最终利用参考光图像  $I_{Ref}(m\Delta p, n\Delta p)$  归一得到数字波前：

$$\tilde{U}(m\Delta p, n\Delta p) = \text{IDFT.} \left\{ \mathbf{L} \times \text{DFT.} \left[ \frac{I(m\Delta p, n\Delta p) \cdot e^{-i\alpha m\Delta p}}{\sqrt{I_{Ref}(m\Delta p, n\Delta p)}} \right] \right\} \quad (1.14)$$

其中， $\mathbf{L}$  表示低通矩阵，DFT. 和 IDFT. 分别表示离散傅里叶变换及逆离散傅里叶变换。得到全息像面波前图像后即可利用菲涅尔衍射公式进行三维的光场计算，相应的相位分布由复光场的幅角求出。

需要注意的是，由于需要记录的物光波前往往具有一定的带宽，太小的离轴角会使各项在空间频谱上的分离不够，引起恢复波前中背景噪声的出现。假设物光  $\tilde{O}(x, y)$  具有截  $u_m$  的空间频谱  $\mathcal{O}(u, v)$ ，即：

$$\mathcal{O}(u, v) = \text{FT.} \{ \tilde{O}(x, y) \} \quad (1.15)$$

其中 FT. 表示傅里叶变换，此时，由式1.11可得全息图的空间频谱：

$$\begin{aligned} \mathcal{I}(u, v) &= \text{FT.} \{ I(x, y) \} \\ &= r^2 \cdot \delta(u, v) + \mathcal{O}(u, v) \otimes \mathcal{O}(u, v) + r \cdot \mathcal{O}(u - \alpha, v) + r \cdot \mathcal{O}^*(-u - \alpha, -v) \end{aligned} \quad (1.16)$$

这里  $\otimes$  表示自相关运算。自相关运算使得式1.16中第二项的截止频率变为  $2u_m$ ，而后两项截止频率仍为  $u_m$ 。不难看出，要使式1.16中各项在空间频谱上互不重叠，对空间载频的要求是：

$$\alpha \geq 3u_m \quad (1.17)$$

从而得出记录数字离轴全息时离轴角应满足的条件：

$$\theta \geq \arcsin(3u_m \lambda) \quad (1.18)$$

### 1.2.3 基于时域调制全息技术的定量相位成像

解决相位问题的第三种方法是使用基于时域调制的全息技术。在传统同轴或离轴数字全息技术中，有孪生像和空间带宽受限的问题。时域调制全息通过引入物光和参考光之间相位差的变化，对不同相位差下的干涉图像进行解调得到相位信息。假设参考光与物光有相位差  $\psi_n$ ，此时形成的干涉条纹可表示为：

$$I_n(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos [\phi(x, y) + \psi_n] \quad (1.19)$$

其中未知数共有三个，因而一般需要至少三张不同相位差的干涉图像来求解相位。时域调制技术可以分为外差法和相移法两类。

#### 1.2.3.1 外差法全息技术

外差法通过改变参考光的频率，使相机按一定顺序采集具有固定相位差顺序的一系列干涉图。最常用的方法是使用两个声光调制器，其驱动圆频率分别为  $\omega_1 = \omega_0$  和  $\omega_2 = \omega_0 + \Omega$ ，参考光为经过第一个声光调制器的 +1 级衍射再经过第二个声光调制器的 -1 级衍射产生的准直光。这样参考光就与信号光频率产生了圆频率为  $\Omega$  的差异。在相机拍摄间隔固定为  $\Delta t = \frac{\psi_0}{\Omega}$  时，便可以得到干涉相位差分别为  $\psi_0, 2\psi_0, 3\psi_0, \dots$  的一

系列图像，并周期性重复。一般在  $\psi_0 = \frac{\pi}{2}$  的情况下采集四张图像：

$$I_1(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos[\phi(x, y)] \quad (1.20)$$

$$I_2(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{\pi}{2}\right] \quad (1.21)$$

$$I_3(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos[\phi(x, y) + \pi] \quad (1.22)$$

$$I_4(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{3\pi}{2}\right] \quad (1.23)$$

采用四步法<sup>[46]</sup> 即可恢复相位：

$$\phi(x, y) = \arctan \frac{I_4(x, y) - I_2(x, y)}{I_1(x, y) - I_3(x, y)} \quad (1.24)$$

信号光强为：

$$I_{sig}(x, y) = \frac{(I_4(x, y) - I_2(x, y))^2 + (I_1(x, y) - I_3(x, y))^2}{16I_{ref}(x, y)} \quad (1.25)$$

外差法中，相位差由射频信号频率决定，因此相位差控制准确且无需额外标定。外差法相位测量精度高，但是系统复杂，数据量较大。

### 1.2.3.2 相移法全息技术

相移法在信号光和参考光之间直接引入附加光程差，如使用压电陶瓷、倾斜玻璃、相移光栅、偏振相移等引入相移。相移法直接产生离散的固定相移，采集三幅以上干涉图即可获得基本的相位信息。例如连续采集 4 张固定相位位移量为  $\frac{\psi}{2}$  的图像：

$$I_1(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{0}{2}\psi\right] \quad (1.26)$$

$$I_2(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{1}{2}\psi\right] \quad (1.27)$$

$$I_3(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{2}{2}\psi\right] \quad (1.28)$$

$$I_4(x, y) = I_{sig}(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2\sqrt{I_{sig}(x, y)I_{ref}(x, y)} \cos\left[\phi(x, y) + \frac{3}{2}\psi\right] \quad (1.29)$$

在这种线性相移情况下，可利用 Carrè 法<sup>[47]</sup> 首先求出相移量：

$$\tan \frac{\psi(x, y)}{2} = \sqrt{\frac{3[I_2(x, y) - I_3(x, y)] - [I_1(x, y) - I_4(x, y)]}{[I_2(x, y) - I_3(x, y)] + [I_1(x, y) - I_4(x, y)]}} \quad (1.30)$$

则可恢复相位分布为：

$$\phi(x, y) = \arctan \sqrt{\tan^2 \frac{\psi(x, y)}{2} \cdot \frac{[I_2(x, y) - I_3(x, y)] + [I_1(x, y) - I_4(x, y)]}{[I_2(x, y) + I_3(x, y)] - [I_1(x, y) + I_4(x, y)]}} \quad (1.31)$$

Carrè 法恢复时无需对绝对相移量进行校准，只需保证相移器件的线性度和重复性。

事实上，四步法和 Carrè 法中在求解式1.19的过程中都额外多使用了一张图像。在相移间隔可确定为  $\frac{\pi}{2}$  或是已知相移绝对量的情况下，最少只需三张图像即可进行相位恢复。这些过程涉及的计算或实验标定较为复杂，本文不再赘述。

### 1.2.4 定量相位成像显微镜概述

在研究活体细胞的动态过程和各种结构的生理活动时，需要无标记地进行显微成像。折射率作为细胞固有对比源，可量化表征细胞内的分子浓度，是比吸收率更好的一种内生对比机制。传统显微镜中的相衬显微镜、微分干涉相差显微镜可将样本的折射率信息转化为图像强度对比度进行成像，但是难以对折射率进行定量的表征。随着定量相位成像技术的发展，其与显微技术相结合，定量相位成像显微镜在生物成像领域开始发挥重要的作用。

一开始，相位测量技术首先与点扫描光学显微镜相结合，发展出了光学相干断层成像 (Optical Coherence Tomography (OCT)) 技术<sup>[48]</sup>。在此基础上还发展出了多普勒光学相干断层成像<sup>[49]</sup>，用于检测样品中运动导致的散射信号相位的时间导数，即多普勒频移。光学相干断层成像在生物医学研究及临床诊断上取得了巨大成功。

之后随着面阵探测器件的发展，宽场的定量相位成像显微技术也开始出现。20世纪 90 年代，陆续出现了基于相位恢复算法<sup>[50]</sup>、基于离轴数字全息技术<sup>[51]</sup>以及基于时域调制的数字全息技术<sup>[52-54]</sup>的定量相位成像技术。之后，定量相位成像显微镜发挥其无标记成像优势，被广泛应用于观察细胞生长<sup>[52]</sup>、病理学检测<sup>[55]</sup>、血液检测<sup>[56,57]</sup>、组织折射仪<sup>[58]</sup>等生物医学研究中。

## 1.3 光学衍射层析显微技术概述

光波在穿过弱散射样品时，不均匀样品的散射（或衍射）会引发光场振幅和相位的变化；因此，散射（或衍射）光场的振幅和相位中天然包含了样品的结构信息。光学衍射层析 (Optical Diffraction Tomography (ODT)) 成像就是通过逆散射（或衍射）过程来重构样品的折射率三维分布图像的成像技术。

### 1.3.1 光学衍射层析显微技术的发展历史

早在二十世纪六十年代，沃耳夫<sup>(23)</sup>就已指出三维散射体散射势的三维傅立叶分量可由二维散射光场的二维傅立叶分量确定<sup>[59]</sup>。虽然光学衍射层析成像的基本理论早在六十多年前就被提出，但受限于实验条件的限制，鲜有相关实验研究的报道。

<sup>(23)</sup> Emil Wolf, 1922–2018

在光学衍射层析成像暂时沉寂时，X 射线计算层析成像 (X-Ray Computed Tomography (X-CT)) 技术首先发展了起来。1971 年，X-CT 第一次被用于临床诊断，并确诊了一位被怀疑患有脑瘤的病人。阿兰·科马克<sup>②⁴</sup>和豪斯费尔德<sup>②⁵</sup>因 X-CT 及相关技术而获得 1979 年诺贝尔生理学或医学奖。计算层析技术中三维样品信息重构是通过基于 Radon 逆变换的滤波反向投影算法，这种算法目前在各种医用计算层析技术中仍旧广泛使用。目前，除了 X 射线，人们还通过其他辐射源或波源进行断层成像，如正电子发射计算层析成像 (Positron-Emission Tomography (PET))、单光子发射计算层析成像 (Single-Photon Emission Computed Tomography) 等。

1986 年，基于计算层析的滤波反投影算法，出现了使用可见光代替 X 射线的光学投影层析 (Optical Projection Tomography (OPT)) 成像技术，实现了对水绵结构的三维重构<sup>[60]</sup>。随着相机像素数的快速提升，2002 年，Sharpe 等对厚达 15 mm 的胚胎进行了光学投影层析成像，实现了分辨率达 5 μm 的断层成像结果<sup>[61]</sup>。光学投影层析成像成像范围大，分辨率高，是一种同时兼顾了荧光/非荧光成像的活体三维成像技术。但是由于未考虑光的衍射，其三维重构效果受到样品散射光的干扰，制约了其分辨率的提高。

2002 年，Lauer 等首次利用相移数字全息技术同时记录样品散射光的强度和相位，同时通过扫描照明方向，用 1000 幅不同照明角度下的全息图对酵母菌、细菌进行了三维衍射断层重构<sup>[62]</sup>。这是光学衍射层析的首次显微成像实验，此时的衍射层析显微镜成像分辨率不高，算法效率低，难以应用在活细胞的动态成像中。

2006 年，出现了基于相位测量的相位层析显微镜 (Tomographic Phase Microscopy (TPM))。在相位层析显微镜中，通过使用旋转样品<sup>[63]</sup> 或扫描激光照明方向<sup>[64]</sup> 的方式，不同角度下样品的相位图像被数字全息系统所采集。与衍射层析成像的重构方法不同，相位层析显微镜也不考虑衍射效应，直接将散射图像在滤波反向投影算法下重构为三维折射率分布。相比光学投影层析成像，相位层析显微镜更适合进行单细胞高分辨率动态成像，具有更高的分辨率和动态范围。但是相位层析显微镜亦未考虑光的衍射，分辨率和成像深度都受到较大限制。

2009 年，法国的 Debailleul 等和美国麻省理工学院的 Sung 等几乎同时发表了他们利用振镜扫描照明光方向实现的光学衍射层析显微镜细胞成像的工作。Debailleul 等对花粉颗粒、KCl 结晶、碳栅微膜等薄层样品进行了衍射层析成像<sup>[65]</sup>。Sung 等则首次在 Ryotv 近似模型下修正了衍射层析算法，并在实验上实现了活细胞成像<sup>[66]</sup>。至此光学衍射层析显微技术已经基本成型，开始出现更多相关的研究。

<sup>②⁴</sup> Allan Cormack, 1924–1998, 1979 年诺贝尔生理学或医学奖得主

<sup>②⁵</sup> Godfrey Hounsfield, 1919–2004, 1979 年诺贝尔生理学或医学奖得主

### 1.3.2 光学衍射层析显微镜技术的研究现状

自 2009 年首次实现活细胞的光学衍射层析显微成像以来，关于衍射层析显微成像的研究成果不断涌现，其研究重点大致可分为以下三类：

- 一类是扫描结构的改进与创新。扫描结构决定了衍射层析中用于数据重构的三维频谱分量的采集范围。频谱范围决定了层析成像系统的分辨率。频谱采集方向的多少和准确性也对层析重构结果的精确度有较大影响。
- 一类是散射采集光路的改进与创新。光学衍射层析需要对散射光场的强度和相位进行测量，可通过改进干涉测量结构和方法，提高显微镜的分辨率、三维成像精度、易用性等。
- 还有一类是衍射层析算法的改进与创新。衍射层析算法数据量大、模型复杂。提高重构算法的效率和准确性也是亟需解决的问题。

#### 1.3.2.1 扫描结构的改进与创新

光学衍射层析显微镜的扫描部分与 CT 扫描相类似，可以分为两种：一类是基于固定样品和成像光路，改变照明光方向进行扫描；另一类是保持照明光及成像光路固定，旋转样品进行扫描。前者能收集到更高的横向空间频谱，具有较高的横向分辨率，且对样品的放置没有特定要求，但由于只能从一侧进行照明，空间频谱采集不对称，轴向的分辨率受限；而后者各个方向的分辨力较为均一，但横向分辨率不如前者。另一方面，两种扫描方式都会有一部分低频信息无法被采集，即“锥形频谱缺失”或“苹果核频谱缺失”的问题。

多种器件可以实现照明光方向的扫描。2002 年，Lauer 基于电机控制的反射镜实现照明方向的扫描<sup>[62]</sup>。之后，由于扫描振镜的出现使扫描照明光的速度大幅提高，在光学相位层<sup>[64]</sup>析和衍射层析<sup>[66]</sup>中首先得到了应用。由于扫描振镜扫描速度快，安装控制简单，基于扫描振镜的扫描方式成为相干照明下光学衍射层析显微镜的主流扫描方式<sup>[67-70]</sup>。

2013 年，Cotte 等使用高数值孔径的油浸物镜，利用旋转楔形棱镜实现照明光束扫描，实现了散射收集空间角接近  $2\pi$  的衍射层析显微镜<sup>[71]</sup>。通过三维衍射重构和复解卷积算法，实现了横向 90 nm 和轴向 150 nm 的分辨率，其扫描方法和实验结果如图 1.2。

2014 年，Kim 等人通过白光照明下的全息相位测量方法，即空间光干涉显微镜<sup>[72]</sup>测量白光散射光场的振幅和相位，通过对样品的逐层扫描成像，实现了三维的折射率成像<sup>[73]</sup>。对由于光谱宽度造成具有一定厚度的空间频谱进行解卷积，其实现了对红细胞和大肠杆菌的三维折射率成像，达到了横向 350 nm 和纵向 900 nm 的分辨率，图 1.3 为其三维传递函数及成像结果。

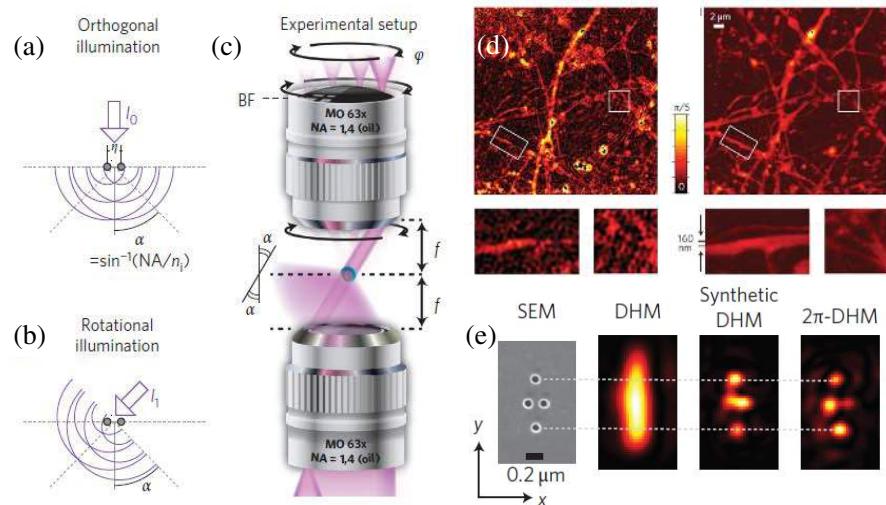


图 1.2  $2\pi$ -数字全息显微镜<sup>[71]</sup>。(a-c) 系统照明光束扫描示意图; (d) 神经网络的相位层析成像结果和衍射断层成像结果; (e) 电镜下纳米小孔的成像结果

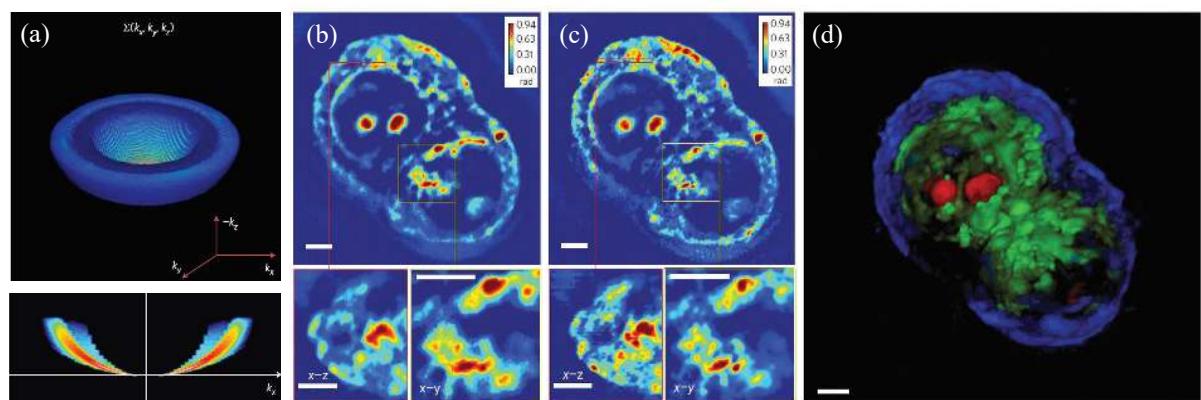


图 1.3 白光衍射层析显微镜的三维光学传递函数及 HT29 细胞成像结果<sup>[73]</sup>。(a) 系统三维光学传递函数; (b) 系统采集的原始相位图像; (c) 经过解卷积之后的相位图像; (d) 三维重构结果

2016年，Momey等还报道了使用机械臂扫描部分相干照明实现的无透镜衍射层析显微镜<sup>[74]</sup>。其照明方向扫描由机械臂带动的准相干光源实现，样品直接贴在感光芯片上方，其装置简图见图1.4。通过共线全息的解算方法和衍射层析的数据处理，其实现了对前列腺细胞RWPE1组织的无透镜层析成像。

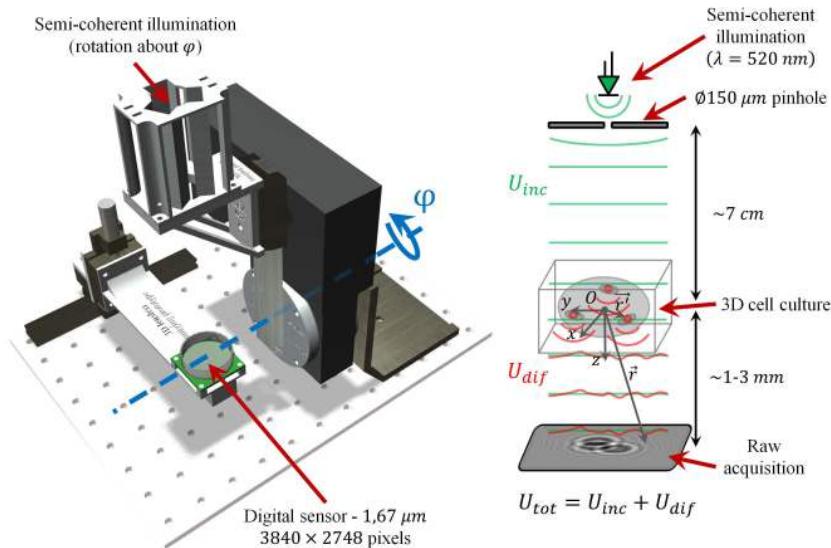


图 1.4 无透镜衍射层析显微镜装置简图<sup>[74]</sup>

2018年，Descloux等则实现了基于扩展白光照明下的衍射层析显微镜<sup>[75]</sup>。通过采用多波长、多角度的白光照明，利用棱镜实现多像面图像的同时采集，实现三维相位恢复，最终在衍射模型下解算了三维的折射率分布。其实现了对活细胞超过200 Hz的成像速度，其成像装置如图1.5。

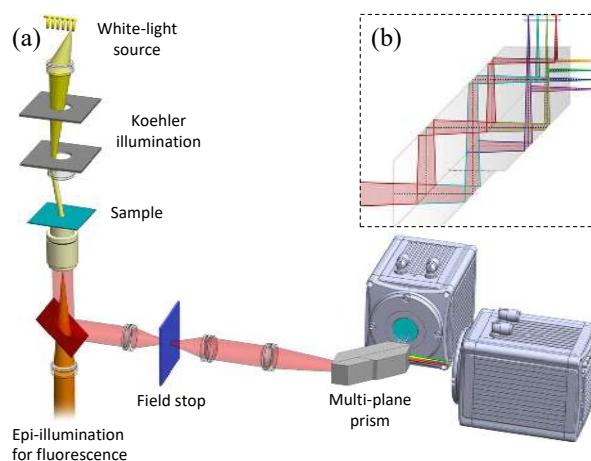


图 1.5 多像面成像相位层析显微镜<sup>[75]</sup>。(a) 科勒照明下的多焦面相位成像装置；(b) 多焦面分光棱镜

其它器件也可用于光学衍射层析中的照明光方向扫描，如空间光调制器<sup>[76,77]</sup>，数

字微镜阵列<sup>[78]</sup>等。由于这些器件响应速度慢，光强损耗较大，目前没能大规模应用于活体细胞的三维成像中。

样品旋转也是一种常用的成像模式，除 2006 年 Charriere<sup>[63]</sup>首先使用外，近来也出现了各种新颖的样品旋转方法，如利用微流通道控制细胞旋转<sup>[79]</sup>、使用光镊控制细胞旋转<sup>[80]</sup>等。最近 Simon 等提出了结合样品旋转与照明光方向扫描的衍射层析方法，通过旋转样品，在两个正交的方向上分别进行基于照明光扫描的层析成像，最终在各个方向获得了较为均一的分辨率，且无“锥形频谱缺失”的问题<sup>[81]</sup>。

### 1.3.2.2 散射采集光路的改进与创新

光学衍射层析显微镜中的散射采集光路一般使用干涉仪成像，其改进主要集中于各种全息成像方法的变化上。2002 年 Lauer 等<sup>[62]</sup>的方法是基于 Mach-Zehnder (MZ) 干涉仪的移相法数字全息。2006 年 Charriere 等<sup>[63]</sup>则使用基于 MZ 干涉仪的离轴数字全息进行散射场的测量，这样在每个角度只需一张全息图像就可实现相位测量。Sung 等<sup>[66]</sup>则使用基于 MZ 干涉仪的外差法数字全息技术实现了相位的测量。

在以上散射光场相位测量方法中，由于参考光和物光分离，显微镜相位测量的稳定性对于环境的变化非常敏感。温度、振动等都会引起相位测量的噪声。2014 年，Kim<sup>[82]</sup>等和 Hsu<sup>[83]</sup>等分别将共光路的离轴全息方法引入了一维和二维扫描的光学衍射层析显微镜中，引入衍射光栅分光后对 0 级光滤波作为参考光与 +1 级衍射光进行离轴干涉测量，如图 1.6。此后，Kim 等<sup>[84]</sup>还提出了使用洛匈棱镜的偏振干涉光路进行共光路的相位测量方法。

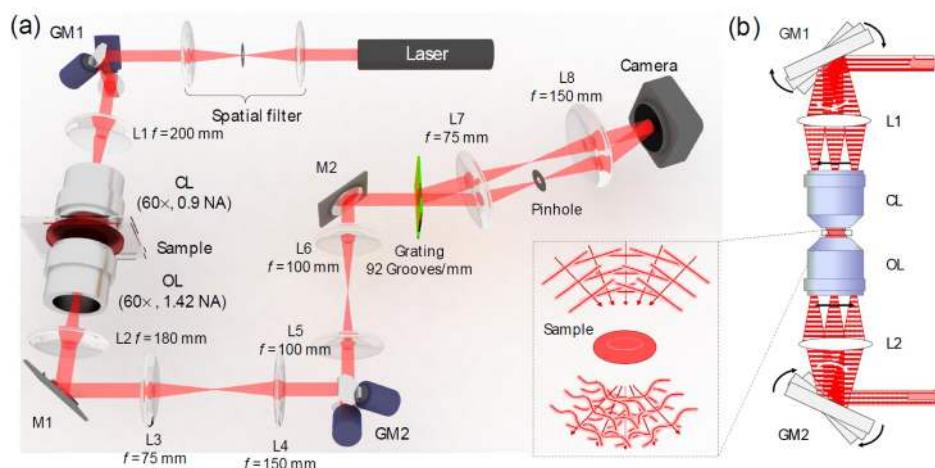


图 1.6 基于共线干涉仪结构的衍射层析显微系统<sup>[82]</sup>。(a) 系统光路简图；(b) 照明与成像光路中使用振镜抵消光束偏转

基于白光照明的衍射层析相位技术中也使用了共光路的干涉测量技术。Kim 等<sup>[73]</sup>使用空间光干涉显微技术<sup>[72]</sup>来测量白光相位，这种测量方式利用空间光调制器，产

生了类似相衬显微镜中的相位调制，利用四幅不同调制相位差下的图像进行相位恢复。另一种基于光梯度干涉显微镜的衍射层析显微技术也被用于三维细胞成像<sup>[85]</sup>，其通过空间光调制器形成类似微分干涉相差显微镜的相位调制机制进行定量相位调制，利用不同调制相位差下的四幅图像解算强度及相位分布。

共光路的干涉测量技术测量光路相对更复杂精密，相位恢复算法需要拍摄多张图像，同时空间光调制器的速度也限制了其成像速度。但是，基于共光路干涉的衍射层析显微镜对实验环境的稳定性要求低，对样品中随时间变化的相位更敏感，具有更高的时间灵敏度；因此，具有很好的工程实用性。

### 1.3.2.3 衍射层析算法的改进与创新

衍射层析显微镜在重构折射率层析图像时需要对多张不同角度下的图像进行处理。为了达到较好的重构效果和精度，图像数量一般在几百到数千幅，大量数据需在成像过程中实现快速高效实时处理。同时，由于成像过程硬件条件的限制，扫描照明角度及散射光收集孔径均有限，求解逆散射问题成为了求解病态方程。提高算法效率在保证重构结果精度及分辨率的前提下减少数据采集量成为这一领域的研究热点。

光学衍射层析的早期实践中主要使用基于沃耳夫提出的基于一阶 Born 近似的衍射层析理论进行数据处理<sup>[62,65]</sup>。但是，Born 近似下细胞连续变化的折射率分布信息发生了丢失，重构结果只能反映具有折射率梯度的细胞膜结构，对于结构内部的折射率恢复不准确。2009 年，Sung 等首先提出了基于 Rytov 近似的数据处理方法，对细胞样品进行了有效三维折射率成像<sup>[66]</sup>。随后出现的衍射层析工作中，基本上使用与 Sung 等<sup>[66]</sup> 类似的邻近点频域反投影算法，Kim 等还比较了两种算法的重构结果<sup>[68]</sup>，指出了基于衍射模型的重构算法在分辨率上的优势。最近，Bailleul 等<sup>[86]</sup> 还实现了此算法的实时数据处理及显示。

未解决少量数据重构和低频频谱缺失的问题，正则化方法被引入了光学衍射层析算法中。正则化算法利用正则项对重构结果进行约束，在数据结果相符的前提下，通过优化迭代算法将优化解收敛到一个能同时满足正则项约束的结果上。2011 年，Vertu 等首先提出了基于最小全变分约束的衍射迭代算法<sup>[87]</sup>。之后，基于光束传播方法<sup>[70,88]</sup>、共轭梯度法<sup>[89]</sup>、迭代 Born 补偿法<sup>[90]</sup>等的正则迭代算法不断涌现。正则化算法中，首先通过对样品折射率分布的先验性假设，如非负假设、分立折射率假设等对结果进行约束；再通过各种散射计算模型模拟从重构结果到散射数据的散射过程；最后通过数据残差逆散射进行迭代矫正，使得结果收敛到一个既满足散射模型又满足先验性假设的结果上。

## 1.4 本文的主要内容

随着光学理论、光学材料及其加工工艺、光电器件的不断完善和发展，各种新的光学显微成像技术不断涌向。以定量相位成像为代表的无标记成像技术，不受限于外源标记物引入的诸多限制，在生物医学研究中有着广泛的应用。以定量相位成像为基础的光学衍射层析显微成像是一种新的无标记光学显微成像技术，在生物医学领域有着广阔的应用前景。

由于衍射层析技术光学架构较为复杂且算法不够成熟，其未能大规模应用于生物医学研究中。衍射层析显微技术有着两方面问题亟需解决：一方面，衍射层析数据量大，计算过程复杂，难以用于对偶发生命现象的连续观察。另一方面，在实现无标记成像的同时，光学衍射层析显微的化学选择性成像能力受限，形态学表征缺乏化学特异性，说服力受限，在实际生物学研究中有必要与荧光、拉曼等特异性成像模态结合。结合以上问题，文本的主要工作围绕光学衍射层析显微镜展开研究，共分六个章节：

第一章，介绍研究背景，阐明研究动机及意义。

第二章，介绍衍射层析的理论基础及算法的具体实现。通过衍射层理理论推导频谱关系，实现了一种适用于高速光学衍射层析成像系统的快速衍射层析重构算法，并引入了复解卷积提高重构质量。实现了具有较高容错能力和鲁棒性的高速衍射层析重构程序，保证了生物细胞成像中高通量、长时间成像数据的处理能力，为光学衍射层析成像的大规模生物医学应用奠定了基础。

第三章，介绍线性光学衍射层析成像系统。首先介绍线性光学衍射层析显微成像系统的硬件架构，并通过生物细胞及微纳结构的成像结果验证了其三维成像能力、无标记成像能力以及快速长时程成像能力。其次，通过进一步集成海森结构光照明荧光显微镜，搭建了双模态显微成像系统，表征了其双模态成像能力，弥合了衍射层析成像无特异性成像能力和结构光照明荧光成像成像速度及时程受限的短板。其成像速度和质量具有世界领先水平，适于进行全面、快速、长时程的细胞代谢研究。

第四章，为解决衍射层析无法特异性成像的问题，提出基于相干反斯托克斯拉曼散射的衍射层析理论，并基于数值模拟实现了共线激发下的相干反斯托克斯拉曼散射衍射层析成像。

第五章，利用光学衍射层析-海森结构光照明荧光双模态成像系统，对一系列活细胞进行了高速无标记-荧光共定位成像。全面鉴别了衍射层析图像中的多种细胞器结构，发现了一种新型内体的存在，并表征了其生化功能。首次对细胞内主要细胞器间的相互作用进行了三维无标记观察，展示了衍射层析显微镜在活细胞成像中的应用潜力。

第六章，总结全文研究内容，并展望衍射层析未来发展方向。



## 第二章 衍射层析的理论及算法研究

当样品细微结构的尺度与入射光波长接近时，微小的折射率变化会致使光波衍射，即光子传播方向的改变。传统的投影模型假设光子沿直线传播，因此无法在此情形中有效重构出波长尺度的结构。而衍射层析成像模型因考虑了光场的衍射传播特性，完整描述了样品的三维折射率分布与样品产生的散射光场间的关系，能通过对散射场的逆传播重构样品三维结构。

在衍射层析成像中，高速成像产生大量数据等待衍射层析重构，并且长时程成像中系统的重复性和稳定性难以保证。因而要求衍射层析算法在保证数据高速处理的同时，能对因系统变化所致的参数漂移和偶发异常有较好的容错能力。为实现快速、鲁棒的数据处理，本章首先讨论衍射层析的基本理论，阐述数据处理的基本思路。在此基础上，本文对衍射层析算法进行了研究：利用衍射层析的基本理论，提出并了基于复解卷积的衍射层析算法；并在此基础上实现了一种基于频域紧邻内插算法、通过照明波矢迭代求解和序列检查而具有高鲁棒性的快速衍射层析重构程序。

### 2.1 衍射层析成像理论

#### 2.1.1 波动方程

光作为一种电磁波，其在介质中的传播可用麦克斯韦方程组描述。真空中，光的传播可被标量近似下的波动方程描述。而在非均匀介质中，由于光场正交分量间存在耦合，波动方程不再完整描述光的传播。但是，在介质双折射效应和界面引起的偏振耦合可忽略时，标量波动方程仍具有较好的近似结果。 $t$  时刻，空间坐标  $\mathbf{r}$  处的波动方程为：

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} \Psi(\mathbf{r}, t) = \left( \frac{c_0}{n(\mathbf{r})} \right)^2 \cdot \nabla^2 \Psi(\mathbf{r}, t) \quad (2.1)$$

其中  $\Psi(\mathbf{r}, t)$  表示振幅波场的含时空间分布， $c_0$  为真空光速， $n(\mathbf{r})$  为介质的空间折射率分布， $\frac{c_0}{n(\mathbf{r})}$  描述了介质中的波速。通过分离变量，我们可以简化式2.1得到 Helmholtz 方程即时谐波动方程：

$$(\nabla^2 + k(\mathbf{r})^2) u(\mathbf{r}) = 0 \quad (2.2)$$

其中  $k(\mathbf{r})$  为依赖折射率空间分布的波矢,  $u(\mathbf{r})$  为光场空间分布。通过引入环境折射率  $n_m$  及局域折射率变化  $\epsilon_n(\mathbf{r})$ , 可简化数学符号为:

$$n(\mathbf{r}) = n_m + \epsilon_n(\mathbf{r}) \quad (2.3)$$

$$k_m = \frac{2\pi n_m}{\lambda} \quad (2.4)$$

$$k(\mathbf{r}) = k_m \left( 1 + \frac{\epsilon_n(\mathbf{r})}{n_m} \right) \quad (2.5)$$

其中  $\lambda$  为时谐电磁波在真空中的波长。

### 2.1.1.1 均匀介质中的 Helmholtz 方程

对于均匀介质, 即  $\epsilon_n(\mathbf{r}) = 0$  时, 式2.2变为均匀介质中的 Helmholtz 方程:

$$(\nabla^2 + k_m^2) u_0(\mathbf{r}) = 0 \quad (2.6)$$

此二阶齐次方程具有平面波解:

$$u_0(\mathbf{r}) = a_0 \exp(i k_m \mathbf{s}_0 \cdot \mathbf{r}) \quad (2.7)$$

其中  $\mathbf{s}_0$  表示指向平面波传播方向的单位矢量,  $a_0$  为平面波振幅。

### 2.1.1.2 非均匀介质中的 Helmholtz 方程

非均匀介质中, 式2.2可改写为:

$$(\nabla^2 + k_m^2) u(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) u(\mathbf{r}) \quad (2.8)$$

其中<sup>①</sup>

$$f(\mathbf{r}) = -k_m^2 \left[ \left( \frac{n(\mathbf{r})}{n_m} \right)^2 - 1 \right] \quad (2.9)$$

被称为散射势, 反映了介质折射率的非均匀分布。此非齐次方程的求解可使用式2.10 定义的格林函数:

$$(\nabla^2 + k_m^2) G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = -\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (2.10)$$

非均匀介质 Helmholtz 方程的格林函数为:

$$G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{\exp(i k_m |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)}{4\pi |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \quad (2.11)$$

<sup>①</sup> 此处采用国际单位制, 高斯单位制下符号略有不同, 但结论一致。

考虑到狄拉克  $\delta$  函数的平移性:

$$\int \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') g(\mathbf{r}') d^3 r' = g(\mathbf{r}) \quad (2.12)$$

可得<sup>(2)</sup>:

$$f(\mathbf{r}) u(\mathbf{r}) = \int \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.13)$$

$$= - \int (\nabla^2 + k_m^2) G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.14)$$

$$= - (\nabla^2 + k_m^2) \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.15)$$

代入式2.8可得积分方程:

$$u(\mathbf{r}) = - \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.16)$$

## 2.1.2 散射理论

本小节分别使用 Born 近似和 Rytov 近似求解式2.16。两种近似下，总光场  $u(\mathbf{r})$  都被看作是入射光场  $u_0(\mathbf{r})$  和散射光场  $u_s(\mathbf{r})$  的叠加:

$$u(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) + u_s(\mathbf{r}) \quad (2.17)$$

### 2.1.2.1 Born 近似

Born 近似认为散射光场远小于原入射光场，即弱散射情况。此时可认为入射光场的传播满足均匀介质的 Helmholtz 方程，即式2.6，则式2.8可改写为描述散射光场的波动方程:

$$(\nabla^2 + k_m^2) u_s(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) u(\mathbf{r}) \quad (2.18)$$

利用格林函数（式2.11）可改写为积分方程:

$$u_s(\mathbf{r}) = - \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.19)$$

考慮到式2.17即得到 Lippmann-Schwinger 方程:

$$u(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) - \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.20)$$

<sup>(2)</sup> 格林函数与  $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$  有关，因此  $(\nabla'^2 + k_m^2) G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = (\nabla^2 + k_m^2) G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$

通过迭代积分中的  $u(\mathbf{r})$ , 上式可以在 Born 近似下展开。其中, 一阶 Born 近似下的总光场在第一次迭代中可表示为:

$$u(\mathbf{r}) \stackrel{\text{Born}}{\approx} u_0(\mathbf{r}) + u_B(\mathbf{r}) \quad (2.21)$$

$$u_B(\mathbf{r}) = - \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') f(\mathbf{r}') u_0(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (2.22)$$

### 2.1.2.2 Rytov 近似

Rytov 近似下, 光场可用复相位  $\psi(\mathbf{r})$  描述, 此时总光场和入射光场可表示为:

$$u(\mathbf{r}) = e^{\psi(\mathbf{r})} \quad (2.23)$$

$$u_0(\mathbf{r}) = e^{\psi_0(\mathbf{r})} \quad (2.24)$$

$$\psi(\mathbf{r}) = \psi_0(\mathbf{r}) + \psi_s(\mathbf{r}) \quad (2.25)$$

其中复相位具有如下形式:

$$\psi(\mathbf{r}) = \ln[a(\mathbf{r})] + i\Phi(\mathbf{r}) \quad (2.26)$$

$$\psi_0(\mathbf{r}) = \ln[a_0(\mathbf{r})] + i\Phi_0(\mathbf{r}) \quad (2.27)$$

$a(\mathbf{r})$  和  $\Phi(\mathbf{r})$  分别代表光场振幅和相位分布。

此时散射场可表示为:

$$\begin{aligned} u_s(\mathbf{r}) &= u(\mathbf{r}) - u_0(\mathbf{r}) \\ &= e^{\psi_0} [e^{\psi_s} - 1] \end{aligned} \quad (2.28)$$

将式2.23代入式2.8中可以得到:

$$(\nabla^2 + k_m^2) e^{\psi(\mathbf{r})} = f(\mathbf{r}) e^{\psi(\mathbf{r})} \quad (2.29)$$

其中  $\nabla^2 e^{\psi(\mathbf{r})}$  可展开为:

$$\nabla^2 e^{\psi(\mathbf{r})} = \nabla[e^{\psi(\mathbf{r})} \cdot \nabla \psi(\mathbf{r})] \quad (2.30)$$

$$= e^{\psi(\mathbf{r})} [\nabla^2 \psi(\mathbf{r}) + (\nabla \psi(\mathbf{r}))^2] \quad (2.31)$$

代入式2.29中可得:

$$\nabla^2 \psi(\mathbf{r}) + (\nabla \psi(\mathbf{r}))^2 + k_m^2 = f(\mathbf{r}) \quad (2.32)$$

上式为复相位  $\psi(\mathbf{r})$  的非线性非齐次微分方程。同理, 入射复相位  $\psi_0(\mathbf{r})$  亦满足齐次方程:

$$\nabla^2 \psi_0(\mathbf{r}) + (\nabla \psi_0(\mathbf{r}))^2 + k_m^2 = 0 \quad (2.33)$$

将式2.25代入式2.32即可得散射复相位  $\psi_s(\mathbf{r})$  满足:

$$\nabla^2[\psi_0(\mathbf{r}) + \psi_s(\mathbf{r})] + \underbrace{(\nabla[\psi_0(\mathbf{r}) + \psi_s(\mathbf{r})])^2}_{(\nabla\psi_0(\mathbf{r}))^2 + 2\nabla\psi_0(\mathbf{r})\cdot\nabla\psi_s(\mathbf{r}) + (\nabla\psi_s(\mathbf{r}))^2} + k_m^2 = f(\mathbf{r}) \quad (2.34)$$

将齐次方程 (式2.33) 代入后可得:

$$\nabla^2\psi_s(\mathbf{r}) + 2\nabla\psi_s(\mathbf{r})\cdot\nabla\psi_0(\mathbf{r}) + (\nabla\psi_s(\mathbf{r}))^2 = f(\mathbf{r}) \quad (2.35)$$

考虑到以下数学变换:

$$\nabla^2u_0(\mathbf{r})\psi(\mathbf{r}) = \nabla^2u_0(\mathbf{r})\cdot\psi_s(\mathbf{r}) + 2\nabla u_0(\mathbf{r})\cdot\nabla\psi_s(\mathbf{r}) + u_0(\mathbf{r})\nabla^2\psi_s(\mathbf{r}) \quad (2.36)$$

$$= -k_m^2u_0(\mathbf{r})\cdot\psi_s(\mathbf{r}) + 2u_0(\mathbf{r})\nabla\psi_0(\mathbf{r})\cdot\nabla\psi_s(\mathbf{r}) + u_0(\mathbf{r})\nabla^2\psi_s(\mathbf{r}) \quad (2.37)$$

即:

$$(\nabla^2 + k_m^2)u_0(\mathbf{r})\psi(\mathbf{r}) = 2u_0(\mathbf{r})\nabla\psi_0(\mathbf{r})\cdot\nabla\psi_s(\mathbf{r}) + u_0(\mathbf{r})\nabla^2\psi_s(\mathbf{r}) \quad (2.38)$$

与式2.35比较可得:

$$\begin{aligned} (\nabla^2 + k_m^2)u_0(\mathbf{r}) \underbrace{\psi_s(\mathbf{r})}_{\substack{\text{Rytov} \\ \approx \psi_R(\mathbf{r})}} &= u_0(\mathbf{r}) \underbrace{[f(\mathbf{r}) - (\nabla\psi_s(\mathbf{r}))^2]}_{\substack{\text{Rytov} \\ \approx f(\mathbf{r})}} \end{aligned} \quad (2.39)$$

在 Rytov 近似中, 需假设相位梯度项  $|\nabla\psi_s(\mathbf{r})|^2 \ll f(\mathbf{r})$  而可被忽略。此时,  $\psi_R(\mathbf{r})$  被称为 Rytov 相位, 并满足波动方程:

$$(\nabla^2 + k_m^2)(u_0(\mathbf{r})\psi_R(\mathbf{r})) = u_0(\mathbf{r})f(\mathbf{r}) \quad (2.40)$$

为求解此非齐次方程, 可类似式2.11至式2.16的推导过程使用格林函数求解为:

$$u_0(\mathbf{r})\psi_R(\mathbf{r}) = - \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')f(\mathbf{r}')u_0(\mathbf{r}')d^3r' \quad (2.41)$$

$$\psi_R(\mathbf{r}) = - \frac{\int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')f(\mathbf{r}')u_0(\mathbf{r}')d^3r'}{u_0(\mathbf{r})} \quad (2.42)$$

将式2.41与式2.22对比可以发现 Rytov 相位  $\psi_R(\mathbf{r})$  与一阶 Born 近似下的散射场  $u_B(\mathbf{r})$  有如下关系:

$$\psi_R(\mathbf{r}) = \frac{u_B(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} \quad (2.43)$$

因此, Rytov 近似下的散射场  $u_R(\mathbf{r}) = u(\mathbf{r}) - u_0(\mathbf{r})$  与一阶 Born 近似下的散射场  $u_B(\mathbf{r})$  具

有换算关系:

$$u_R(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) \left[ \exp \left( \frac{u_B(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} \right) - 1 \right] \quad (2.44)$$

$$u_B(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) \ln \left( \frac{u_R(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} + 1 \right) \quad (2.45)$$

Rytov 近似下, 若已知散射场  $u_R(\mathbf{r})$ , 则 Rytov 相位为:

$$\psi_R(\mathbf{r}) = \ln \left( \frac{u_R(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} + 1 \right) \quad (2.46)$$

此处对复数取对数, 因此式 2.46 可进一步展开为:

$$\psi_R(\mathbf{r}) = \ln \left( \frac{u(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} \right) \quad (2.47)$$

$$= \ln \left( \frac{a(\mathbf{r})}{a_0(\mathbf{r})} \right) + i (\phi(\mathbf{r}) - \phi_0(\mathbf{r})) \quad (2.48)$$

实际测量中, 由于相位  $\phi(\mathbf{r}) - \phi_0(\mathbf{r})$  会被包裹在  $[0, 2\pi)$  的区间上, 通常需要对不连续的包裹相位进行解包裹运算<sup>[91]</sup>。

### 2.1.2.3 近似成立条件

对透明样品, 可忽略其对光场振幅的调制, 即只发生相位变化  $\Phi(\mathbf{r})$ , 此时散射后的总光场可近似描述为

$$u(\mathbf{r}) \approx u_0(\mathbf{r}) e^{i\Phi(\mathbf{r})} \quad (2.49)$$

Born 近似在  $u_s(\mathbf{r}) \ll u_0(\mathbf{r})$  的条件下成立, 即

$$\left| \frac{u_0(\mathbf{r}) - u_0(\mathbf{r}) e^{i\Phi(\mathbf{r})}}{u_0(\mathbf{r})} \right| \ll 1 \quad (2.50)$$

可得相位变化  $\Phi(\mathbf{r})$  需满足条件:

$$|1 - \cos \Phi(\mathbf{r}) - i \sin \Phi(\mathbf{r})| \ll 1 \quad (2.51)$$

因此可得 Born 近似成立条件为:

$$|\Phi(\mathbf{r})| \ll \frac{\pi}{3} \quad (2.52)$$

Rytov 近似则在  $|\nabla \psi_s(\mathbf{r})|^2 \ll |f(\mathbf{r})|$  时成立, 即:

$$|\nabla \psi_s(\mathbf{r})|^2 \ll k_m^2 \left| \left( \frac{n(\mathbf{r})}{n_m} \right)^2 - 1 \right| \quad (2.53)$$

整理可得：

$$|n(\mathbf{r})^2 - n_m^2| \approx |2n_m\epsilon_n(\mathbf{r})| \gg \left| \frac{\nabla\psi_s(\mathbf{r})\lambda}{2\pi} \right|^2 \quad (2.54)$$

忽略透明样品的振幅调制，即  $\psi_s(\mathbf{r}) = i\Phi(\mathbf{r})$  时，可得 Rytov 近似成立条件为：

$$|\nabla\Phi(\mathbf{r})| \ll \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{2n_m |\epsilon_n(\mathbf{r})|} \quad (2.55)$$

比较式2.52和2.55可知，Rytov 近似的有效性与样品引入的绝对相位变化无关，而仅由局域的折射率变化量限制了相位梯度的上限。因此 Rytov 近似比 Born 近似的使用条件更为宽松，更加适用于细胞成像应用<sup>[66,92]</sup>。同时，式2.55表明，使用较短波长和更高折射率的浸润环境，有助于提高 Rytov 近似的适用性，提高数据恢复准确性。

### 2.1.3 傅里叶衍射定理

三维笛卡尔坐标系中，格林函数（式2.11）可利用角谱理论展开为二重积分<sup>[93]</sup>：

$$G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{i}{8\pi^2} \iint \frac{1}{k_z} \exp \left\{ i [k_x(x - x') + k_y(y - y') + k_z(z - z')] \right\} dk_x dk_y \quad (2.56)$$

$$k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_m^2 \quad (2.57)$$

$$k_m \mathbf{s} = (k_x, k_y, k_z) \quad (2.58)$$

其中， $\mathbf{s}$  为指向散射方向的单位矢量。为保持  $k_z$  为实数，需要求  $k_x^2 + k_y^2 \leq k_m^2$ ，即不考虑近场信息。

若入射光场为沿单位矢量  $\mathbf{s}_0$  方向传播的平面波：

$$u_0(\mathbf{r}) = a_0 \exp(ik_m \mathbf{s}_0 \cdot \mathbf{r}) \quad (2.59)$$

$$k_m \mathbf{s}_0 = (k_{0x}, k_{0y}, k_{0z}) \quad (2.60)$$

则 Born 近似下的散射场，即式2.22可展开为：

$$\begin{aligned} u_B(\mathbf{r}) &= -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iiint d^3 r' \iint dk_x dk_y \frac{f(x', y', z')}{k_z} \\ &\times e^{i[k_x(x-x')+k_y(y-y')+k_z(z-z')]} \\ &\times e^{i(k_{0x}x'+k_{0y}y'+k_{0z}z')} \end{aligned} \quad (2.61)$$

$$\begin{aligned} &= -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iiint d^3 r' \iint dk_x dk_y \frac{f(x', y', z')}{k_z} \\ &\times e^{-i[(k_x-k_{0x})x'+(k_y-k_{0y})y'+(k_z-k_{0z})z']} \\ &\times e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)} \end{aligned} \quad (2.62)$$

交换积分顺序, 被积坐标  $\mathbf{r}' = (x', y', z')$  中函数形式满足三维傅里叶变换的形式, 因此可得:

$$u_B(\mathbf{r}) = -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iint \frac{1}{k_z} \underbrace{\mathcal{F}(k_x - k_{0x}, k_y - k_{0y}, k_z - k_{0z})}_{k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)} e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)} dk_x dk_y \quad (2.63)$$

其中,  $\mathcal{F}(k_x, k_y, k_z)$  为  $f(x, y, z)$  的傅立叶变换。假设在  $(x = x^D, y = y^D, z = z_0)$  平面上记录对散射光场进行成像记录, 则像面上的二维散射场为:

$$u_B(x^D, y^D) = u_B(\mathbf{r})|_{x=x^D, y=y^D, z=z_0} \quad (2.64)$$

$$= -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iint \frac{1}{k_z} \mathcal{F}(k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)) e^{i(k_x x^D + k_y y^D + k_z z_0)} dk_x dk_y \quad (2.65)$$

计算此二维场的傅里叶变换:

$$\mathcal{U}_B(k_x^D, k_y^D) = \iint u_B(x^D, y^D) e^{-i(k_x^D x^D + k_y^D y^D)} dx^D dy^D \quad (2.66)$$

$$= -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iint \frac{e^{ik_z z_0}}{k_z} \mathcal{F}(k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)) \times \iint e^{i[(k_x - k_x^D)x^D + (k_y - k_y^D)y^D]} dx^D dy^D dk_x dk_y \quad (2.67)$$

使用傅里叶积分定理得到二维狄拉克  $\delta$  函数:

$$\delta(k_x - k_x^D, k_y - k_y^D) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint e^{i[(k_x - k_x^D)x^D + (k_y - k_y^D)y^D]} dx^D dy^D \quad (2.68)$$

可进一步化简式2.67为:

$$\mathcal{U}_B(k_x^D, k_y^D) = \frac{a_0 e^{ik_z^D z_0}}{2ik_z^D} \mathcal{F}(k_x^D - k_{0x}, k_y^D - k_{0y}, k_z^D - k_{0z}) \quad (2.69)$$

$$k_x^{D2} + k_y^{D2} + k_z^{D2} = k_m^2 \quad (2.70)$$

可得 Born 近似下的傅里叶衍射定理<sup>[59]</sup>:

$$\mathcal{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{2ik_z}{a_0} \mathcal{U}_B(k_x, k_y) e^{-ik_z z_0} \quad (2.71)$$

$$k_x = K_x + k_{0x}; \quad k_y = K_y + k_{0y}; \quad k_z = K_z + \sqrt{k_m^2 - k_{0x}^2 - k_{0y}^2} \quad (2.72)$$

$$k_x^2 + k_y^2 \leq k_m^2 \quad (2.73)$$

式2.71-2.73给出了一阶 Born 近似下散射势的傅里叶变换  $\mathcal{F}$  和二维散射场的傅里叶变换  $\mathcal{U}$  之间的关系。公式右侧的二维频谱在式2.72给出的坐标关系下被映射在一个球面上。对于不同的入射场方向, 此球面会沿着  $-k_m \mathbf{s}_0 = (-k_{0x}, -k_{0y}, -k_{0z})$  平移, 如图2.1

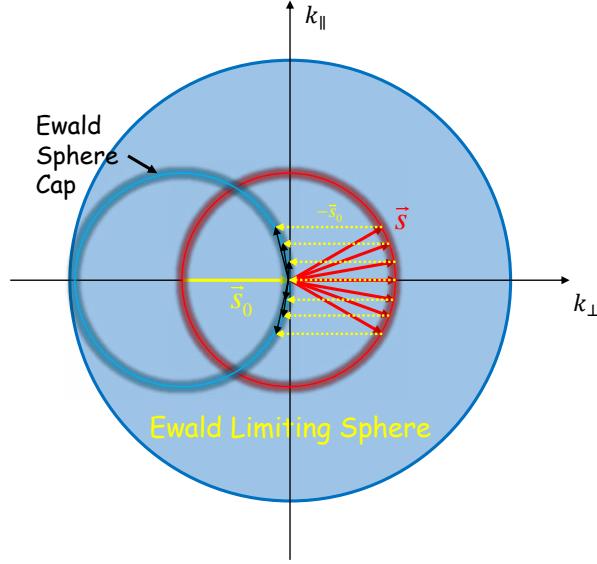


图 2.1 Ewald 球盖和 Ewald 极限球

所示形成经过原点的 Ewald 球盖。因此，通过记录不同入射场方向  $\mathbf{s}_0$  下的散射场，不同方向的 Ewald 球盖可实现对散射势的傅里叶变换  $\mathcal{F}$  最大截止频率为  $k_m |\mathbf{s} - \mathbf{s}_0| = 2k_m$  的连续频域采样，此采样范围被称为 Ewald 极限球。最终通过对 Ewald 极限球内的频谱信息进行逆滤波，即可解算散射势  $f(\mathbf{r})$ ，即折射率的三维分布  $n(\mathbf{r})$ 。

Rytov 近似下，与上述推导过程相似，将式 2.56 代入式 2.41 可得：

$$u_0(\mathbf{r})\psi_R(\mathbf{r}) = -\frac{ia_0}{8\pi^2} \iint \underbrace{\frac{1}{k_z} \mathcal{F}(k_x - k_{0x}, k_y - k_{0y}, k_z - k_{0z}) e^{i(k_x x + k_y y + k_z z)}}_{k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)} dk_x dk_y \quad (2.74)$$

在像面上有：

$$\begin{aligned} \psi_R(x^D, y^D) e^{i(k_{0x} x^D + k_{0y} y^D + k_{0z} z_0)} \\ = -\frac{i}{8\pi^2} \iint \frac{1}{k_z} \mathcal{F}(k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)) e^{i(k_x x^D + k_y y^D + k_z z_0)} dk_x dk_y \end{aligned} \quad (2.75)$$

则 Rytov 相位  $\psi_R(x^D, y^D)$  的二维傅里叶变换  $\mathcal{U}_R(k_x^D, k_y^D)$  满足方程：

$$\begin{aligned} \mathcal{U}_R(k_x^D - k_{0x}, k_y^D - k_{0y}) e^{ik_{0z} z_0} \\ = -\frac{i}{8\pi^2} \iint \frac{e^{ik_z z_0}}{k_z} \mathcal{F}(k_m(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)) \iint e^{i[(k_x - k_x^D)x^D + (k_y - k_y^D)y^D]} dx^D dy^D dk_x dk_y \end{aligned} \quad (2.76)$$

利用式2.68可得：

$$\mathcal{U}_R(k_x^D - k_{0x}, k_y^D - k_{0y}) e^{ik_{0z} z_0} = \frac{e^{ik_z^D z_0}}{2ik_z^D} \mathcal{F}(k_x^D - k_{0x}, k_y^D - k_{0y}, k_z^D - k_{0z}) \quad (2.77)$$

因此，Rytov 近似下得傅里叶衍射定理为<sup>[94,95]</sup>：

$$\mathcal{F}(K_x, K_y, K_z) = 2ik_z \mathcal{U}_R(K_x, K_y) e^{i(k_{0z} - k_z)z_0} \quad (2.78)$$

$$k_x = K_x + k_{0x}; \quad k_y = K_y + k_{0y}; \quad k_z = K_z + \sqrt{k_m^2 - k_{0x}^2 - k_{0y}^2} \quad (2.79)$$

$$k_x^2 + k_y^2 \leq k_m^2 \quad (2.80)$$

Rytov 近似下，Rytov 相位亦满足以上傅里叶衍射定理。比较式2.78和式2.71可知，Rytov 近似下与 Born 近似下傅里叶衍射定理的区别有三：一是二维频谱在映射至三维频谱时是否需要平移；二是 Born 近似下需进行强度归一；最后是离焦图像使用的传播项不同。但式2.78和式2.71都给出了二维频谱与三维频谱的映射关系，都可以通过改变照明光方向的方式实现 Ewald 极限球内的连续频谱采样。在实际测量中，细胞样品引起的相位变换一般已经超过式2.52的条件，而通常仍满足式2.55。因此，本文主要使用基于 Rytov 近似的傅里叶衍射定理（即式2.78-2.80）作为层析成像算法的基本方程。

## 2.1.4 衍射层析三维重构

### 2.1.4.1 相干传输函数

由于远场成像系统的低通滤波作用，第  $j$  个照明角度下实际测量所得三维散射场  $U_{\text{measure}}^j(x, y, z)$  是实际散射场  $U_s^j(x, y, z)$  与相干成像系统振幅点扩散函数  $h(x, y)$  的卷积：

$$U_{\text{measure}}^j(x, y, z) = \iiint U_s^j(x' - x, y' - y, z' - z) h(x', y') G(x', y', z') dx' dy' dz' \quad (2.81)$$

其中  $G(x, y, z)$  为远场传播项，可由标量近似下的格林函数描述：

$$G(x, y, z) = \frac{e^{\pm ik_m \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}}}{4\pi \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \quad (2.82)$$

其中  $\pm$  区分了正向和反向传播成分。

在空间频域，式2.81可改写为：

$$\mathcal{U}_{\text{measure}}^j(k_x, k_y, k_z) = \mathcal{U}_s^j(k_x, k_y, k_z) \mathcal{C}(k_x, k_y, k_z) \quad (2.83)$$

其中  $\mathcal{U}_{\text{measure}}^j(k_x, k_y, k_z)$  和  $\mathcal{U}_s^j(k_x, k_y, k_z)$  分别为  $U_{\text{measure}}^j(x, y, z)$  和  $U_s^j(x, y, z)$  的三维傅

里叶变换。而相干传输函数  $\mathcal{C}(k_x, k_y, k_z)$  可表示为:

$$\mathcal{C}(k_x, k_y, k_z) = \text{F.T.}^{3D} \{ h(x, y) G(x, y, z) \} \quad (2.84)$$

其中 F.T. 表示傅里叶变换。由于单色波传播过程中具有常波矢  $k_m$ , 因此三维相干传输函数  $\mathcal{C}(k_x, k_y, k_z)$  可看作二维相干传输函数  $\mathcal{C}(k_x, k_y)$  在三维球面  $k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_m^2$  上的映射。其中二维相干传输函数为:

$$\mathcal{C}^{2D}(k_x, k_y) = \text{F.T.}^{2D} \{ h(x, y) \} \quad (2.85)$$

#### 2.1.4.2 复解卷积衍射层析三维重构

在考虑相干传输函数的情况下, 则第  $j$  个照明方向  $\mathbf{k}_0^j = (k_{0x}^j, k_{0y}^j, k_{0z}^j)$  下采集的散射势的三维频谱成分  $\mathcal{F}_{\text{measure}}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j)$  与真实频谱成分  $\mathcal{F}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j)$  的有如下关系:

$$\mathcal{F}_{\text{measure}}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j) = \frac{\mathcal{F}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j)}{\mathcal{C}(k_x, k_y, k_z)} \quad (2.86)$$

其中频谱坐标满足:

$$K_x = k_x - k_{0x}^j; \quad K_y = k_y - k_{0y}^j; \quad K_z = k_z - k_{0z}^j \quad (2.87)$$

利用 Rytov 近似下的傅里叶衍射定理, 式 2.78 可在像面成像情况 ( $z_0 = 0$ ) 下改写为:

$$\mathcal{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{2ik_z \mathcal{U}_R(K_x, K_y)}{\mathcal{C}(k_x, k_y, k_z)} \quad (2.88)$$

为将不同照明角度 ( $j = 1, 2, \dots$ ) 下的散射图像进行频谱拼接并归一重叠部分, 可使用 Wiener 逆滤波对散射势进行重构。此时三维散射势可求解为:

$$f(x, y, z) = \text{IFFT.} \left\{ \frac{\sum_j 2i(K_z + k_{0z}^j) \mathcal{U}_R(K_x, K_y, K_z) \mathcal{C}(K_x + k_{0x}^j, K_y + k_{0y}^j, K_z + k_{0z}^j)}{\sum_j |\mathcal{C}(K_x + k_{0x}^j, K_y + k_{0y}^j, K_z + k_{0z}^j)|^2 + \alpha^2} \right\} \quad (2.89)$$

其中,  $\mathcal{U}_R(K_x, K_y, K_z)$  是二维 Rytov 相位的频谱按式 2.87 在三维频谱中的映射;  $\mathcal{C}(K_x + k_{0x}^j, K_y + k_{0y}^j, K_z + k_{0z}^j)$  为沿照明波矢  $\mathbf{k}_0^j$  反向平移后的三维相干传输函数;  $\alpha$  为 Wiener 滤波中用于减少除法产生噪声的正则参数<sup>[96]</sup>。

## 2.2 快速衍射层析成像算法

基于上节推导的傅里叶衍射定理及衍射层析三维重构方法，衍射层析成像算法对衍射层析成像系统采集的全息数据进行处理，以期得到能准确反映样品三维折射率分布的计算结果。本文提出并实现了一种适用于高速衍射层析成像的快速衍射层析重构算法，下面介绍其具体实现方法。

### 2.2.1 频域内插方法

根据衍射层析成像理论，在衍射层析三维重构中，按式2.87将不同角度下的散射场数据填充于对应的三维频谱的对应位置上，即可按式2.89恢复三维折射率分布。但实际采集的散射场数据是离散采样的二维矩阵，而三维频谱也是一个离散矩阵。离散计算中，Ewald球盖上的格点数据很难恰好落在三维频谱的离散格点上，因此数据处理中需使用频域内插进行数值计算。常用内插法包括紧邻内插、线性内插等方法，不同内插方法并不会产生额外的频谱信息，仅对计算精度产生影响。其中紧邻内插直接将二维格点内插至距离最近的三维格点进行计算，无需额外的插值或频谱扩展计算，因而基本无需耗费额外计算时间。对于需进行大量数据处理的衍射层析显微成像应用，基于频域紧邻内插的算法可实现快速的图像处理，且已被证明在全息带宽重组的情况下有较好的计算精度<sup>[66]</sup>。

### 2.2.2 数据处理流程

按照前述理论，基于频域紧邻内插的频谱映射方法，本文实现的高速衍射层析重构算法流程如图2.2所示。有/无样品情况下的两组数据作为原始数据输入。其中，没有样品情况下采集了*I*张不同照明角度下的背景全息图。而在对活细胞样品连续成像过程中，每个时间点也采集了相同照明角度下的*I*张全息图。下面按数据处理流程介绍各子模块功能。

#### 2.2.2.1 全息处理模块

按照数字离轴全息的数据处理方法（式1.14），全息处理模块从原始全息图解算数字波前，即二维光场振幅和相位。由于全息离轴角度未知，这里首先在全息图频域测量直流项和调制项的距离来确定每张图像参考光和信号光中透射的照明光之间夹角。记第*j*张全息图得到的频域距离为  $\mathbf{k}_{\text{ref}}^j = (k_{\text{ref},x}^j, k_{\text{ref},y}^j)$ ，其单位为像素；由于此距离测量仅有单位像素的精度，不足以用于后续计算。但考虑到实验中使用等间隔的一周环形照明光扫描方式，故可通过计算*I*个距离的平均值便可以得到亚像素精度的参考波

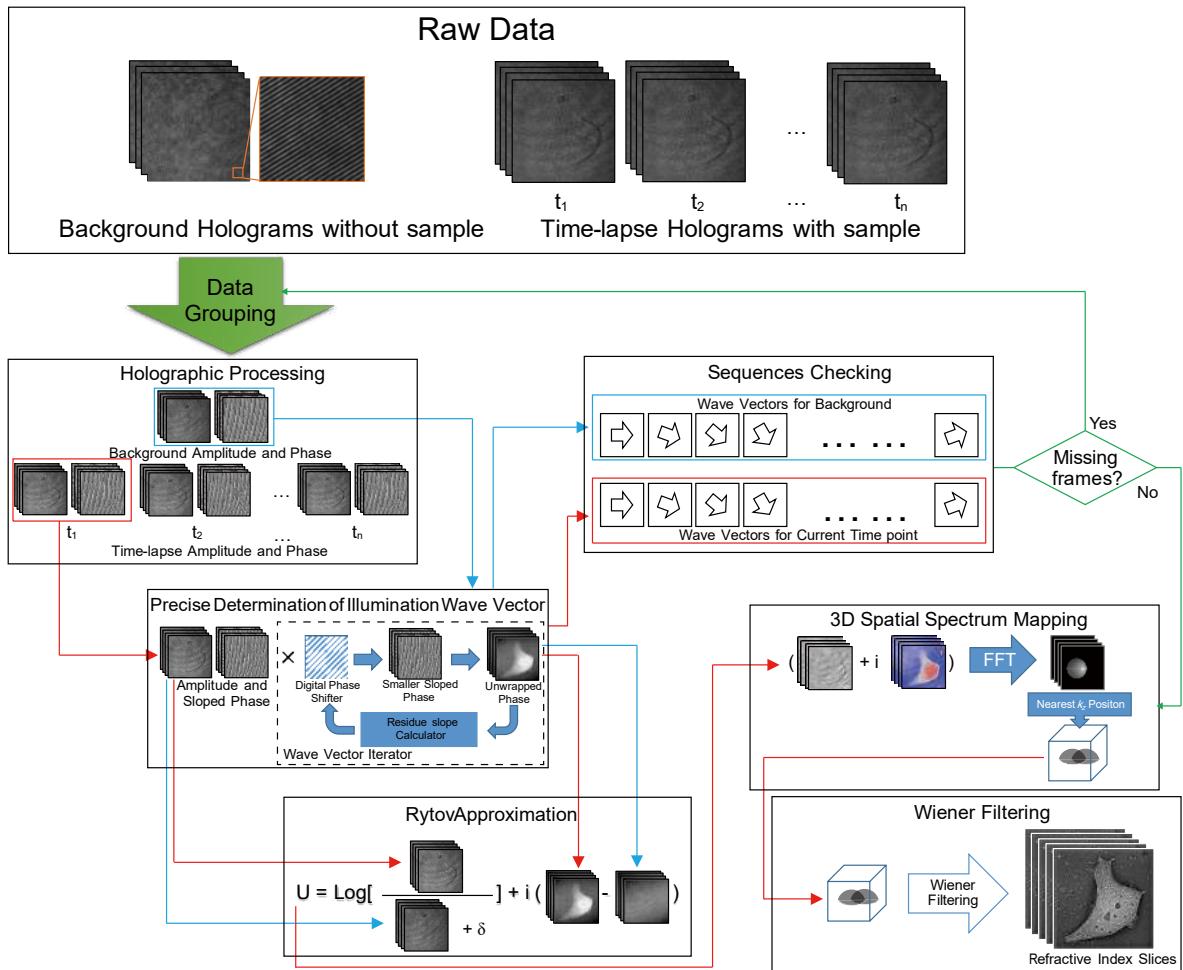


图 2.2 快速衍射层析重构算法流程图。使用有/无样品的两组数据作为输入，其中背景数据按蓝线所示流程处理，样品数据按红线所示流程处理；主要处理模块包括全息处理、照明波矢参数计算、序列检查、Rytov 相位计算、频谱拼接和 Wiener 滤波共六部分；由于高速数据采集中易出现丢帧，绿线所示控制流可检测丢帧并进行数据分组矫正

矢:

$$\mathbf{k}_{\text{ref}} = \frac{\sum_{j=1}^{j=l} \mathbf{k}_{\text{ref}}^j}{l} \quad (2.90)$$

同时, 可以估计第  $j$  个照明角度下照明光波矢的横向分量为:

$$\mathbf{k}_0^j = \mathbf{k}_{\text{ref}}^j - \mathbf{k}_{\text{ref}} \quad (2.91)$$

### 2.2.2.2 照明波矢参数计算

在高速衍射层析成像中, 高速扫描的光束无法避免地受到光机装置机械运动中微小震颤的影响<sup>[97]</sup>。在长时程衍射层析成像中, 由于照明光方向在不同时间点上的重复性难以保证, 对不同时间点的数据重构使用同样的参数会导致一定的误差。如图2.3所示, 带样品数据的照明波矢与背景数据的照明波矢的平均偏差为  $0.018(7) \mu\text{m}^{-1}$ ; 偏移量对应  $k_m$  的 0.2%, 对应扫描角度差  $0.05^\circ$ 。同时, 100 组连续时间点下照明波矢波动标准差为  $\sigma_{k_{0x}} = 0.0061 \mu\text{m}^{-1}$  和  $\sigma_{k_{0y}} = 0.0080 \mu\text{m}^{-1}$ , 波动为  $k_m$  的 0.07%。根据式2.87及式2.89所得的扫描波矢的误差会导致三维频谱拼接的错位, 并降低图像质量。

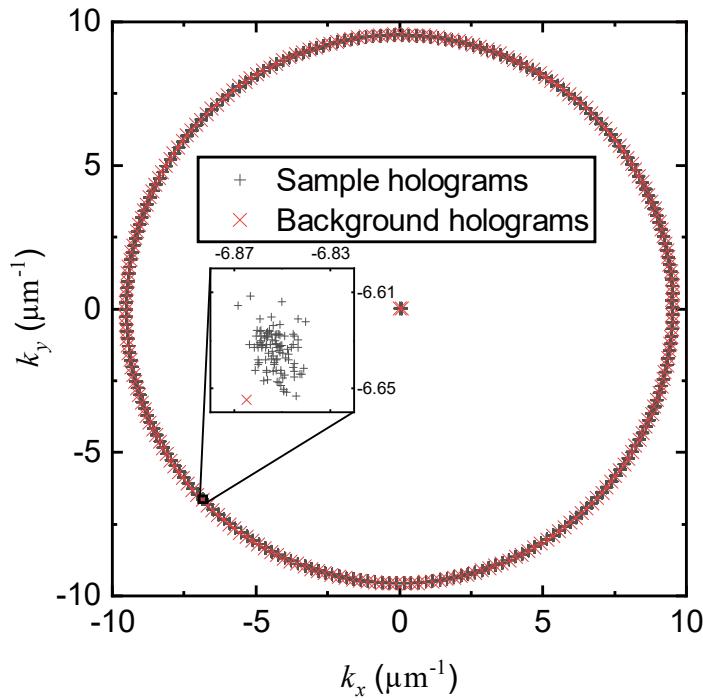


图 2.3 照明光波矢  $\mathbf{k}_0^j = (k_{0x}^j, k_{0y}^j)$  的偏离。“ $x$ ”标记由背景全息图计算出的扫描波矢, “+”标记 100 组间隔 1 s 的带样品全息图计算所得扫描波矢。插图: 某个角度下的扫描波矢偏移

为解决这一问题, 本文提出一种扫描波矢迭代算法用于精确求解不同角度下的扫描波矢。其迭代流程如图2.4所示, 主要包含四个步骤:

- 首先将数字波前与数字相移  $e^{i\mathbf{k}_0^j \cdot \mathbf{r}}$  相乘, 其中  $\mathbf{k}_0^j$  为式2.91给出的初始估计。

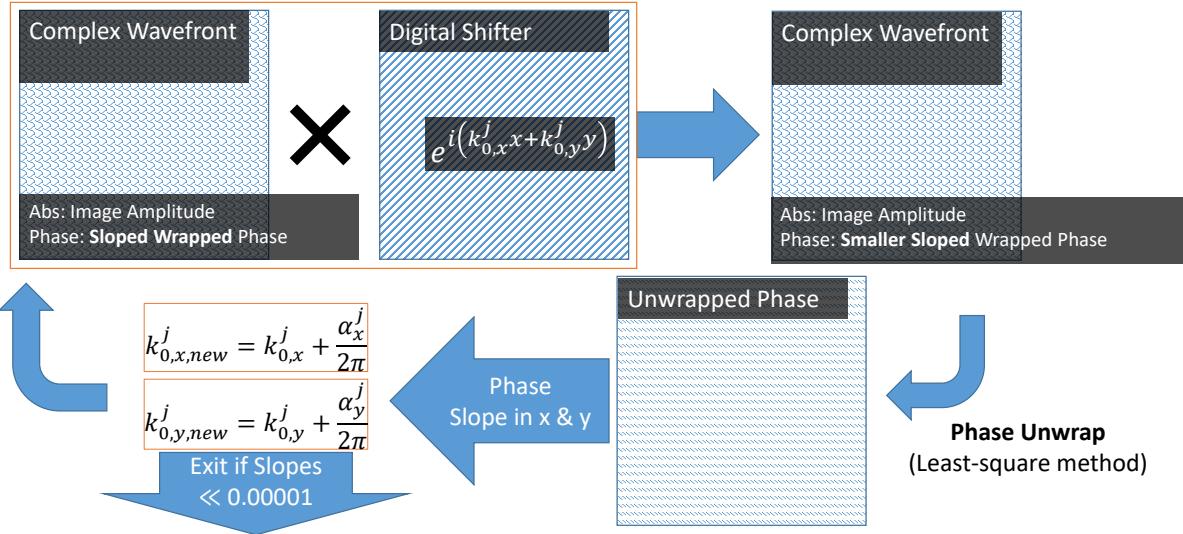


图 2.4 扫描波矢迭代算法流程图

- 接下来使用基于最小二乘的相位解缠绕算法<sup>[98,99]</sup>对新波前的相位进行解缠绕。
- 然后，对解缠绕后的相位图像在  $x, y$  方向上的斜率  $\mathbf{a}^j = (a_x^j, a_y^j)$  进行线性拟合，并更新扫描波矢：

$$\mathbf{k}_{0,new}^j = \mathbf{k}_{0,old}^j + \frac{\mathbf{a}^j}{2\pi} \quad (2.92)$$

- 最后，使用新的扫描波矢进行重复迭代，直至残留斜率大小  $|\mathbf{a}^j|$  低于预设阈值 ( $|\mathbf{a}^j| \leq 0.00001 \cdot 2\pi$ )。

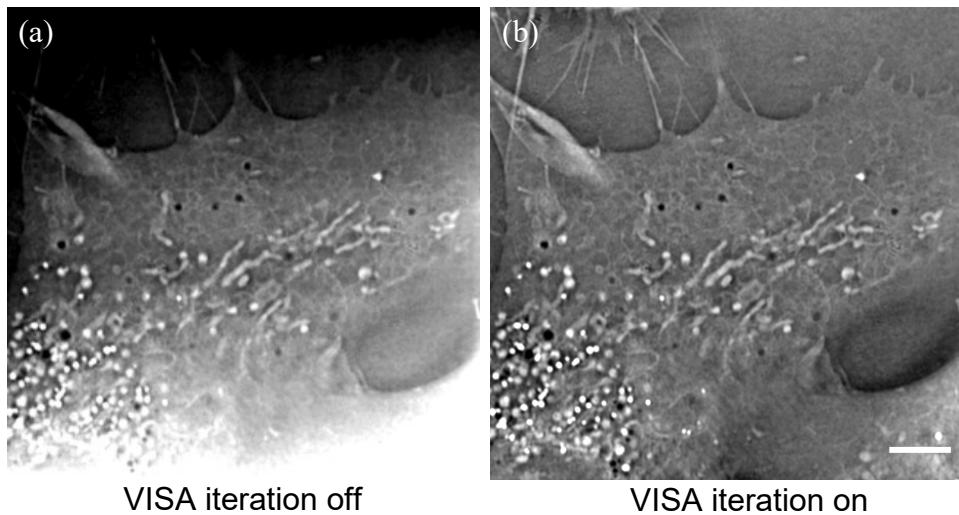


图 2.5 扫描波矢迭代算法的 COS-7 细胞衍射层析重构结果比较。(a) 关闭扫描波矢迭代；(b) 开启扫描波矢迭代。比例尺：5 μm

图2.5比较了有无扫描波矢迭代情况下的数据重构结果，可见扫描波矢迭代使得重构结果背景更加均一且有更好的对比度。

### 2.2.2.3 图像序列检查

实际数据处理中，每张全息图恢复的数字波前都通过上述过程对照明波矢进行了精确求解。通过对同一时间点的一组全息图的照明波矢与背景全息图的照明波矢进行比较，可以将具有较大扫描误差的数据进行剔除。同时，在实际高速成像系统中，由于高通量数据存储过程中偶发的文件 I/O 问题，偶尔会出现单帧丢失现象。图像序列检查模块利用每张图像对应的精确波矢数据，在一定差异阈值下判断图像序列异常，并反馈控制原始数据分组和频谱拼接模块，以保证偶发丢帧问题不影响长时程数据重构结果。

### 2.2.2.4 Rytov 相位计算、频谱拼接与 Wiener 逆滤波

前述步骤产生的全息振幅图像和低残留斜率解缠绕相位图像首先按照式 2.48 计算得到二维 Rytov 相位场。之后经频域滤波后按照式 2.89 和 2.87 在频域进行拼接，此时二维频谱通过紧邻内插映射在距离最近的三维频谱格点上。频谱映射过程中，三维频谱格点在  $K_x$  和  $K_y$  方向的间隔和二维格点间隔一致，因此 Rytov 近似下仅需在  $K_z$  方向上进行内插。在此情况下  $K_z$  方向格点间隔越小，紧邻内插精度就越高。但增加  $K_z$  方向格点总数会显著增加逆滤波过程中的计算时间。综合考虑计算效率和成像精度，实践中使用与  $K_x$  和  $K_y$  方向 1-2 倍的格点间隔即可保证重构效果。

### 2.2.2.5 算法实现及性能比较

本节所述的快速衍射层析算法首先使用 MATLAB 语言进行了实现，验证了算法的可行性和有效性。但是受限于 MATLAB 语言数据结构和文件 I/O 速度限制，其处理 2GB 大小的一组静态成像数据耗时在 300 s 以上。为提高数据处理速度，该算法在多线程 C++ 语言架构下被重构，其计算效率有了显著提升，可适用于长时程高速衍射层析成像的离线数据处理。

此多线程 C++ 重构程序在高性能计算平台上编译并用于数据的离线处理。原始数据使用 Micro-Manager 软件<sup>[100-102]</sup> 控制相机采集并存储为标签图像文件格式（TIFF）。重构程序使用 LibTIFF 4.0.9 库<sup>[103]</sup> 进行 TIFF 文件的读写，并使用 FFTW 3.3.8 库<sup>[104,105]</sup> 加速傅里叶变换的计算。

## 2.3 本章小结

本章首先从波动方程出发，讨论 Born 近似和 Rytov 近似下的散射理论及近似适用条件，指出 Rytov 近似更适用于细胞层析成像中；并进一步推导了傅里叶衍射定理，在其基础上提出带复解卷积的衍射层析重构算法。其次，本章实现了一种适合高速衍射

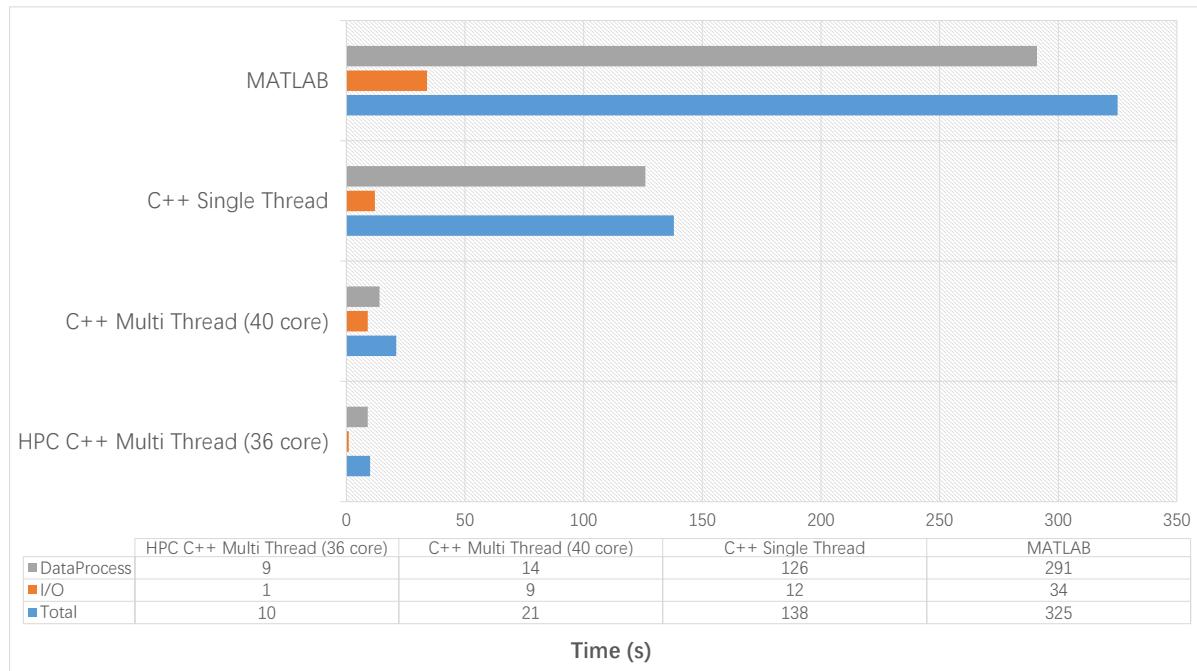


图 2.6 快速衍射层析重构算法计算性能比较。原始数据大小： $1200 \times 1200 \times 360 \times 2 \times 16\text{bit} \sim 2\text{GB}$ 。计算配置：2×Intel Xeon E5-2697A V4, 2.6 GHz 128GB。HPC：高性能计算平台

层析成像的快速衍射层析迭代算法：基于频域紧邻插值算法，具有较快的计算速度；通过照明波矢迭代求解精确重构参数，能主动适应系统参数波动；利用图像序列检查反馈解决图像偶发异常。此算法具有较高的容错性和鲁棒性，被用于后述工作中更大数据量下的离线快速处理。

在实际生物细胞成像中，往往难以预测特定现象的发生，通过成像手段观察细胞生物学过程往往会产生大量的数据。传统衍射层析算法速度慢、容错性差，单一时间点的数据重构往往需要反复调整参数。本文实现的具有高容错性和鲁棒性的快速衍射层析算法有效解决了这一问题，保证了长时间、高通量的光学衍射层析数据的处理，为真正实现衍射层析显微技术的生物医学应用铺平了道路。



## 第三章 线性光学衍射层析显微成像

散射是光与非均匀样品间最基本的相互作用。被样品散射的光子大部分经历弹性散射，因此光子频率不发生改变。弹性散射情形下，散射光子的数量和散射方向与样品的三维极化率分布相关，并在传播过程中改变光场的强度和相位。在弱散射情形下，利用第二章所述 Born 或 Rytov 近似下的散射理论，便可通过测量散射场，唯一地确定物质的结构信息。线性光学衍射层析显微镜即是利用对不同照明角度下散射光场的测量，通过傅里叶衍射定理恢复样品三维折射率分布的一种无标记显微成像技术。

光学衍射层析成像技术光学架构复杂、数据量大、计算过程复杂，目前在生物学研究中的应用较少。层析成像过程中，需要采集不同角度下的几百张原始图像，因此提高其成像速度是开展生物细胞成像的重要前提。本章首先实现了一套可用于高速活细胞成像的光学衍射层析成像系统，并通过一系列细胞成像结果体现了其三维高分辨、无损超长时程、无标记的优势。其次，通过集成海森结构光照明荧光超分辨成像模态，搭建了一套光学衍射层析-结构光照明荧光双模态成像系统，表征了其双模态成像能力，并用于活细胞成像。双模态成像系统中，荧光成像结果可为无标记的光学衍射层析图像的形态学分析提供具有化学特异性的有力佐证；光学衍射层析模态则有力地突破了荧光成像模态中荧光漂白效应对成像维度、成像速度、成像总时程等方面的限制。

### 3.1 线性光学衍射层析成像系统

本论文研究中首先实现了一套高速线性衍射层析成像系统，下面介绍其软硬件系统构成、校准表征、全息带宽控制及成像结果。

#### 3.1.1 光学系统架构

高速衍射层析成像系统如图3.1所示，其成像光路是在商用显微镜（OLYMPUS, IX73）上改装的一个基于 MZ 干涉仪的离轴全息显微镜。成像使用波长为561 nm的单纵模激光器（长春新产业光电技术有限公司，MSL-FN-561-50mW）作为光源，在被声光调制器（中电科技集团重庆声光电有限公司）调制后，+1 级衍射光被偏振分光棱镜（Thorlabs, CCM1-PBS251）分为两路，并分别通过耦合器（Thorlabs, PAF2-7A）耦合进入保偏单模光纤（上海翰宇，PM460-HP HA, FC/APC）。其中参考光耦合前经过一延时光路，使得两路光同时到达相机。旋转偏振片（Thorlabs, LPVISA100-MP2）可调节总光强，旋转二分之一波片（Thorlabs, AHWP10M-600）可调节分光比。

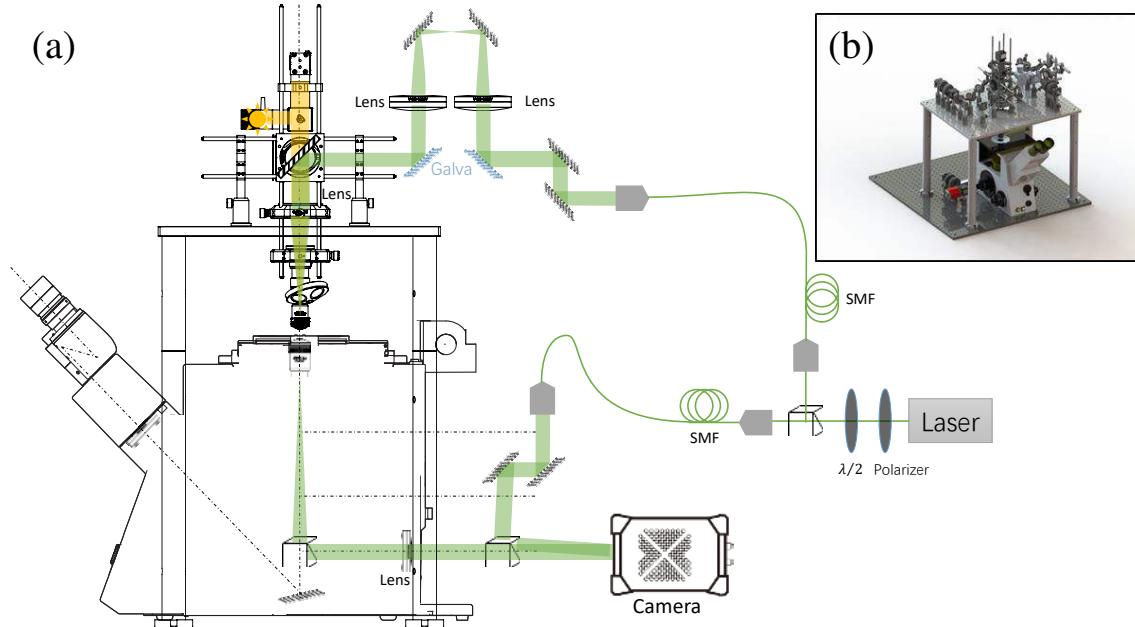


图 3.1 线性光学衍射层析成像系统。(a) 系统示意图; (b) 光机设计。SMF: 单模光纤

信号光从光纤输出后，首先被透镜（Thorlabs, AC254-040-A,  $f = 40 \text{ mm}$ ）准直，之后通过一个两端装有偏转方向正交的一对扫描振镜（Thorlabs, GVS211/M  $\times 2$ ）的  $4-f$  系统（Thorlabs, AC254-100-A  $\times 2$ ,  $f = 100 \text{ mm}$ ），以实现准直光束偏转方向的二维扫描。之后，扫描光束被套筒透镜（Thorlabs, AC508-180-A,  $f = 180 \text{ mm}$ ）聚焦在照明物镜（OLYMPUS, LUMPlanFLN,  $60\times \text{NA} = 1.0$ ）后焦面上，以实现在样品上不同方向的准直光束照明。

照明物镜、套管透镜、以及  $4-f$  系统中的两个透镜一起组成一个  $8-f$  系统，物镜焦面，即样品所在平面与两个振镜所在平面都是共轭面；因此，振镜偏转即可在样品上实现准直光束照明方向的扫描。设置振镜伺服驱动卡上的跳线，使得扫描振镜工作在  $0.5 \text{ V}^\circ/\text{度}$  的最小电压/角度比例因子下。

透过样品的光被成像物镜（OLYMPUS, ApoN,  $100\times \text{NA} = 1.45$ ）收集后，经  $4-f$  透镜对（Thorlabs, ITL200,  $f = 200 \text{ mm}$ , TTL180-A,  $f = 180 \text{ mm}$ ）后被套筒透镜（Thorlabs, AC508-250-A,  $f = 250 \text{ mm}$ ）重新准直。

同时参考光从光纤输出后，首先被透镜（Thorlabs, AC508-100,  $f = 100 \text{ mm}$ ）准直。之后通过偏振无关分光棱镜（Thorlabs, BS013）与上述准直的信号光合束，并在一定离轴角下形成离轴全息条纹，被成像套筒透镜焦面附近的 sCMOS 相机（Hamamatsu, OCRA-flash4.0 V3 C13440）接收。

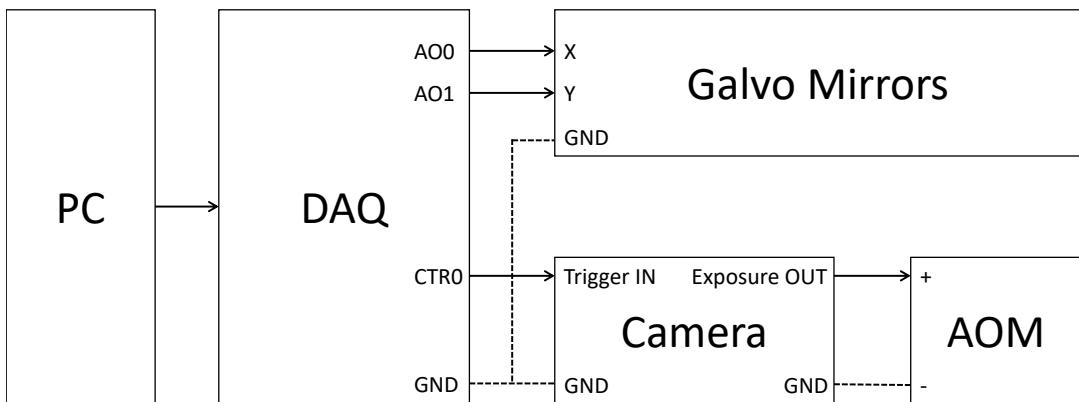


图 3.2 控制系统示意图。PC: 控制电脑, DAQ: 数据采集卡, AOM: 声光调制器

### 3.1.2 同步控制系统

系统同步控制系统由电脑控制下的数据采集卡 (National Instruments, USB-6363) 对振镜和相机进行同步控制, 如图3.2所示。数据采集卡分别在模拟输出端 AO0 和 AO1 端口输出扫描电压输出控制电压至振镜伺服电路, 实现光束  $x, y$  方向的偏转; 同时, 计数输出端口输出延迟和占空比可调的方波信号到相机外部触发端口, 控制相机在振镜扫描时同步进行曝光。扫描电压为 $\pm 205\text{ mV}$ 范围内的正余弦锯齿电压, 相机触发使用 $5\text{ V}$ 的 TTL 电平。同时相机曝光输出端口输出 $5\text{ V}$ 的 TTL 曝光信号到声光调制器, 用以控制曝光时间。

控制系统时序如图3.3所示, 每个时间点的数据由 240 张不同照明角度下的离轴全息图组成。 $1024 \times 1024$  画幅下相机最大帧率为 $200\text{ fps}$ , 实际使用帧率为 $196\text{ fps}$ , 因而单组数据采集耗时 $1.225\text{ s}$ 。其中第一张和最后一张图照明光均为垂直入射样品平面; 其他图像拍摄时, 振镜控制光束在物镜的后焦面上的焦点进行环形扫描。

为提高数据采集速度, sCMOS 相机工作在同步曝光模式下, 如图3.4所示。相机曝光触发上升沿与相机内第 1023 行和 1024 行的曝光开始时刻同步, 待 513 行至 1535 行都进入曝光状态后, 相机输出一时间宽度可调的方波开关信号至 AOM, 使得系统同步曝光一定时间。曝光结束后, sCMOS 芯片开始从中间向上下两侧逐行读出数据, 并紧接着进入下一轮曝光时序中。为最大限度减少系统随时间变化的噪声和振动的影响, AOM 打开时间设置在 $50\mu\text{s}$ 。

每组数据中垂直照明的图像被用于数据处理过程中的时序检查, 以减少相机高速数据采集时偶发丢帧造成的数据时序错乱。同时, 为消除照明光束由于光学系统瑕疵造成的不均匀振幅分布和残余不均匀相位影响, 每次更换样品前均会在样品玻片上无样品区域采集一组背景数据用于数据处理中。

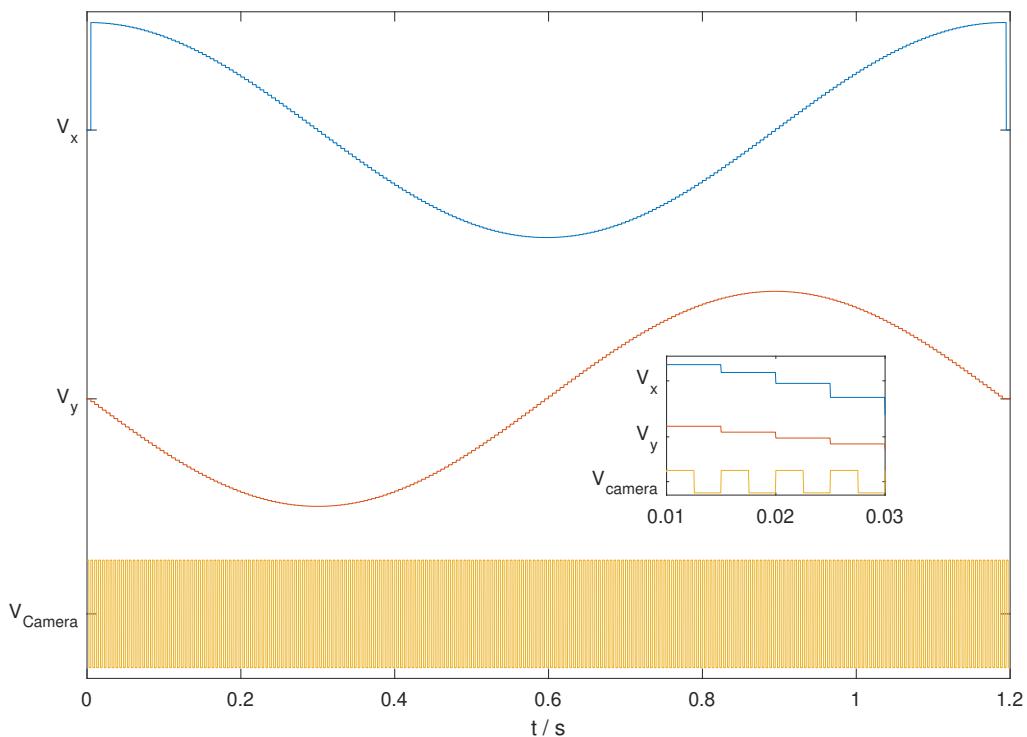


图 3.3 控制电压时序图

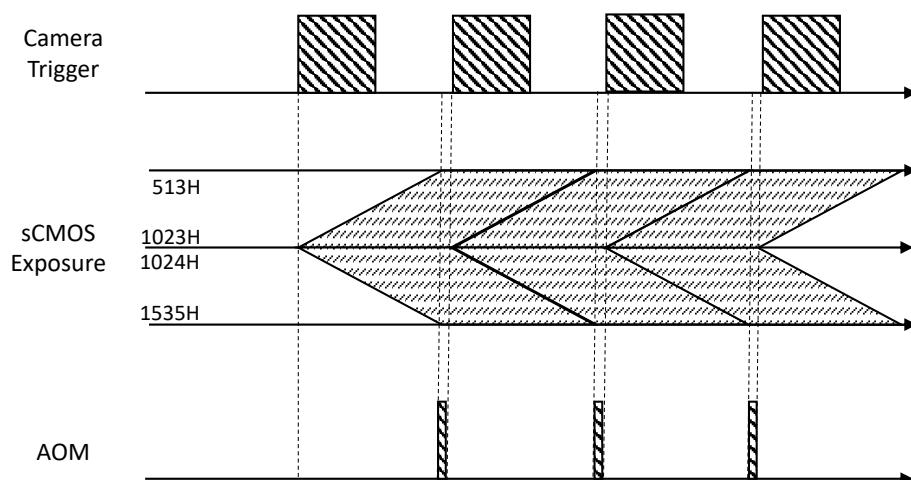


图 3.4 同步曝光控制时序图

### 3.1.3 校准和表征

在数据处理中，系统放大率是重构的重要参数，其误差会导致折射率三维重构结果偏离真实值<sup>[97]</sup>。同时，相干传输函数的测量需要使用理想点源<sup>[71]</sup>。本文使用聚焦离子束刻蚀在120 nm的铝膜（福州逐日光电科技有限公司）上加工了如图3.5所示的结构用于系统校准和表征。

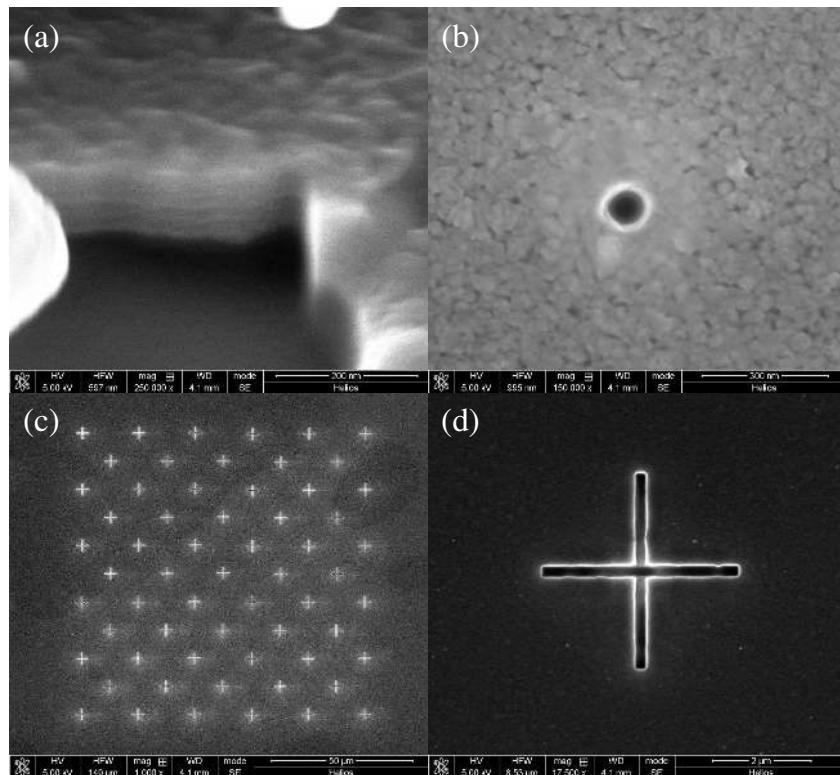


图 3.5 120 nm 铝膜上加工的微纳结构电镜图。(a) 铝膜剖面; (b) 直径100 nm的小孔; (c) 用于放大率表征的十字阵列; (d) 单个十字结构

在白光明场照明下,图3.5 (c) 中十字阵列(横向间隔20  $\mu\text{m}$ )的成像结果如图3.6所示。考虑到 sCMOS 相机单像素尺寸6.5  $\mu\text{m}$ 、画幅为 2048×2048, 单像素采样大小为42.8 nm, 对应成像系统放大率为 151.847 $\times$ 。

图3.5 (b) 所示的微纳小孔被用于系统传输函数的测量。首先, 由小孔的透射强度图像(图3.7 (a))可求出强度测量下系统的光学传递函数(OTF)如图3.7 (c)。加入参考光后, 由于全息系统对残留照明激光的相位测量仍然有较高灵敏度, 因此通过对不同角度照明下的全息测量结果取中位数图像可有效滤除其干扰。全息处理后, 利用式2.85可求得相干传输函数(CTF)如图3.7 (d-e) 所示。

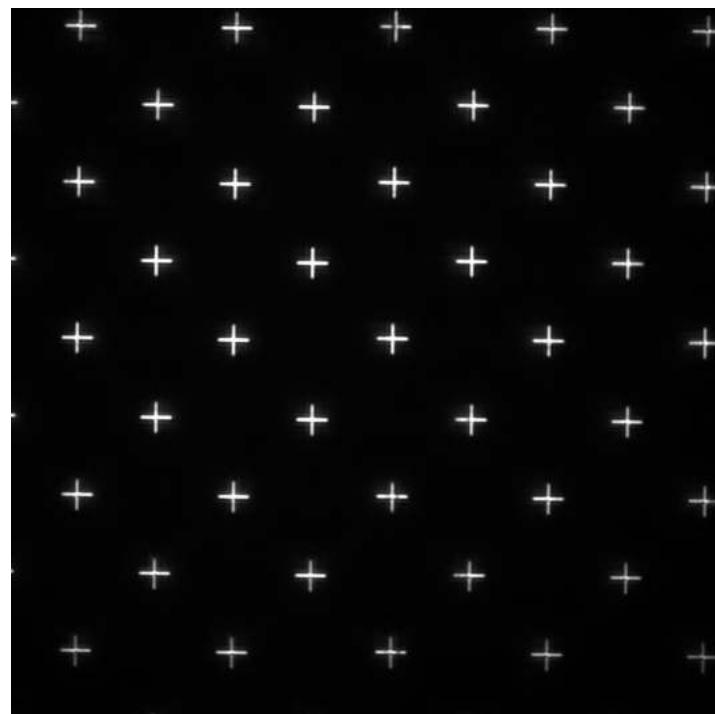
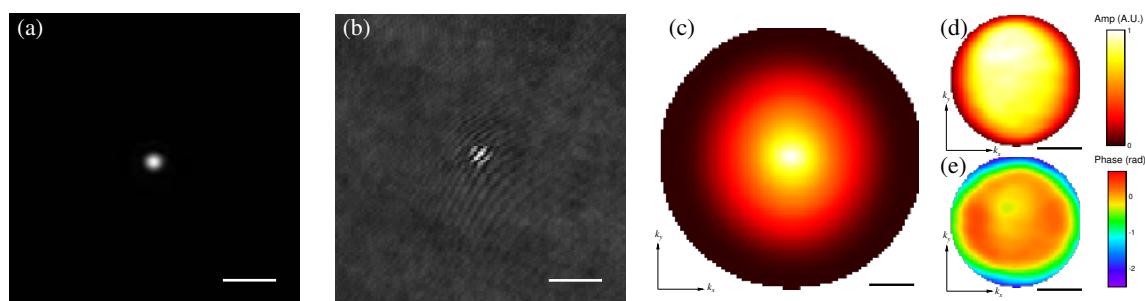
图 3.6 成像 sCMOS 相机拍摄的十字阵列 ( $2048 \times 2048$ )

图 3.7 成像系统传输函数测量。(a) 小孔的透射成像结果, 比例尺  $1 \mu\text{m}$ ; (b) 小孔的全息成像结果, 比例尺:  $1 \mu\text{m}$ ; (c) 由 (a) 得到的系统光学传递函数, 比例尺  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ; (d-e) 由 (b) 得到的相干传输函数的振幅 (d) 和相位 (d) 分布, 比例尺  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$

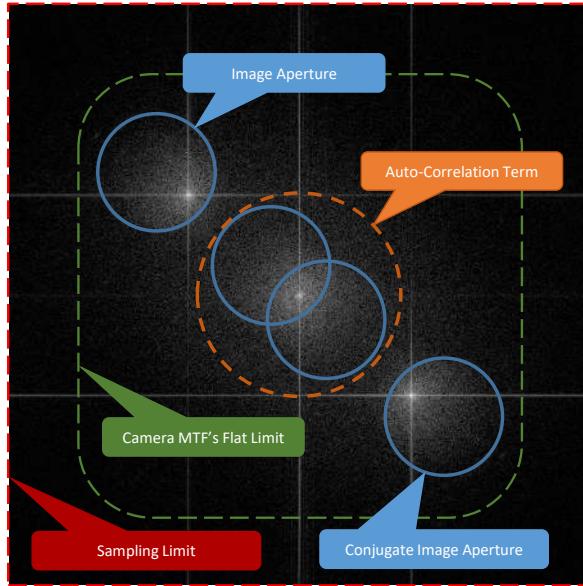


图 3.8 线性光学衍射层析成像中全息频谱示意图

### 3.1.4 全息带宽控制

根据1.2.2.2关于离轴全息成像带宽的讨论，实际成像中倾斜照明下的全息图频谱如图3.8所示。式1.17给出数字离轴全息成像时，成像带宽对离轴载频下限的要求，即图3.8中自相关项与离轴全息项的分离。同时，采样定律决定了频谱上限，即给出离轴载频的上限。实践中，由于CMOS器件结构特点，感光层中的光电子在与空穴分离的过程中，有一定概率扩散至邻近像素并转化为光电流。因此，实际相机可用采样带宽一般低于采样极限，由芯片的调制传输函数（MTF）决定。

实际成像中，为在有限带宽范围内对图像在频域充分采样，需调节成像系统放大率和离轴角，使得图3.8所示的相机有效采样范围内离轴全息项不与自相关项重合。

### 3.1.5 分辨率估算

在衍射层析成像中，照明角度的旋转变换使得对样品频谱的横向采样得到扩展。如在图3.9中，照明物镜数值孔径决定两个轴对称方向上的最大照明角度，所得成像物镜孔径范围内的散射信息在频谱拼接时分别向两侧平移，此时得到的横向频谱截止频率为：

$$k_{\parallel,odt} = k_{\parallel,det} + k_{\parallel,ill} \quad (3.1)$$

其中  $k_{\parallel,det}$  和  $k_{\parallel,ill}$  分别是由成像和照明物镜最大数值孔径决定的最大横向截至频率。在本系统中，照明物镜数值孔径为 1.0。对成像物镜，尽管其数值孔径为 1.45，但是由于浸润环境折射率 ( $n_m \approx 1.333$ ) 的限制，其远场成像时有效的数值孔径为 1.333，因此，

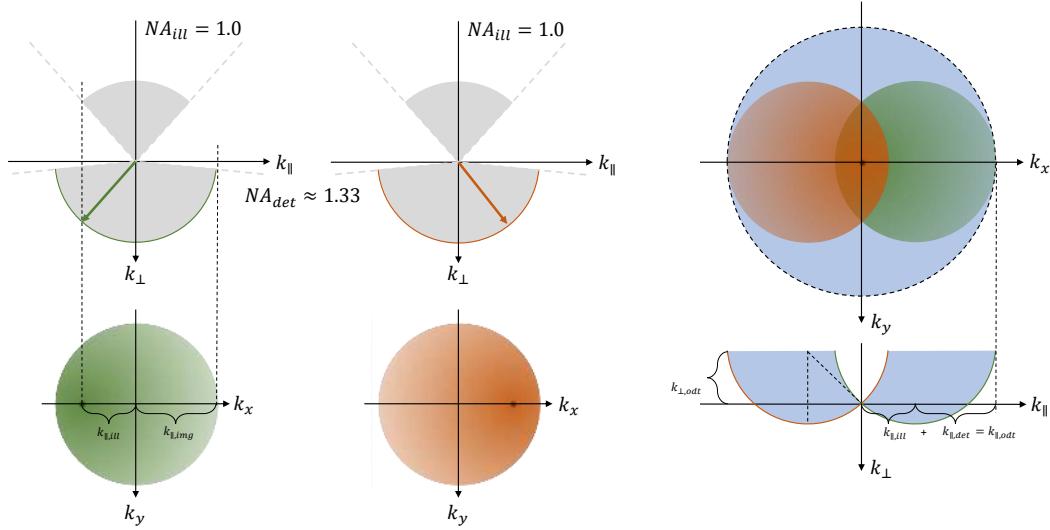


图 3.9 线性光学衍射层析成像频谱拼接示意图

线性光学衍射层析成像系统的等效横向数值孔径为：

$$\text{NA}_{eff} = \text{NA}_{det} + \text{NA}_{ill} \approx 2.33 \quad (3.2)$$

利用式1.3可给出本光学衍射层析成像系统在561 nm波长下横向分辨率约为197 nm。

对于轴向分辨率，图3.9右下所示的拼接频谱轴向分布并不均匀，且在原点附近缺失了一部分低频信息，这使得轴向分辨率不同于一般三维成像。对细胞成像时，一般可认为轴向结构具有一定的横向频谱成分，因此可根据在一定横向频率上的轴向最大频率：

$$k_{\perp,odt} = \frac{2\pi n_m}{\lambda} \times \cos \arcsin \frac{\text{NA}_{ill}}{n_m} \quad (3.3)$$

估算轴向分辨率为：

$$\Delta z = 0.82 \times \frac{2\pi}{k_{\perp,odt}} \approx 522 \text{ nm} \quad (3.4)$$

分辨率的实验表征将在3.2.5节给出。

### 3.1.6 成像结果

#### 3.1.6.1 三维成像能力

为验证光学衍射层析显微镜的三维成像能力，我们使用一系列样品进行了单组光学衍射层析成像。

图3.10所示为固定的INS-1细胞的光学衍射层析成像结果。衍射层析成像结果与传统相位成像相比，具有更佳的分辨率和三维成像能力。同时，通过与标记脂滴的宽

场荧光图像对比，可见光学衍射层析图像除了能清晰表征脂滴外，还可表征细胞内其他未标记的结构。

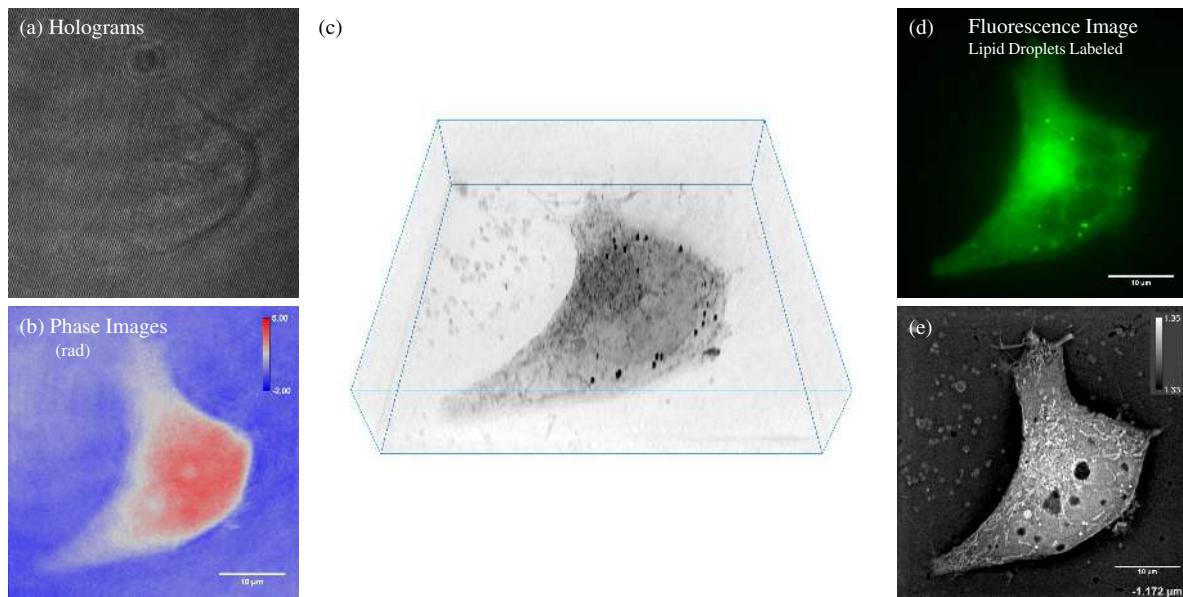


图 3.10 固定的 INS-1 细胞光学衍射层析成像结果。(a) 原始全息图; (b) 相位图像; (c) 折射率分布三维渲染; (d) 宽场荧光图像; (e) 与荧光图像对应的单层衍射层析图像

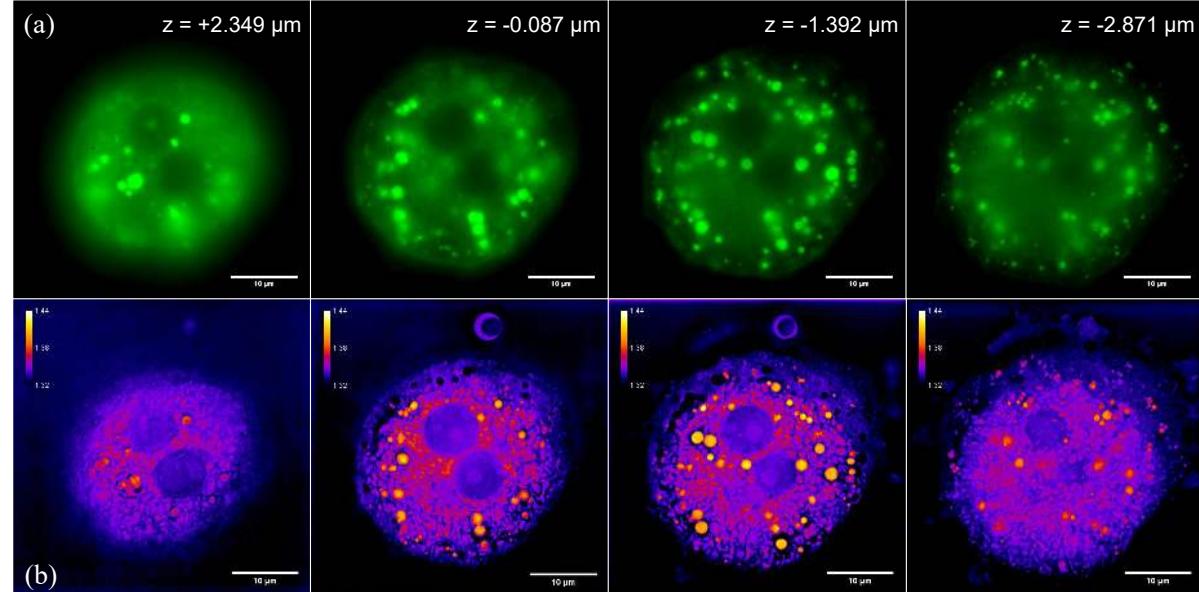


图 3.11 固定的原初肝细胞宽场荧光层扫图像与光学衍射层析成像结果对比。(a) 不同深度的宽场荧光图像; (b) 对应深度的单层衍射层析图像

图3.11所示在不同成像深度下标记脂滴的宽场荧光图像和对应深度下的光学衍射层析图像。光学衍射层析图像中不同深度的脂滴结构均可与宽场荧光图像对应，验证了光学衍射层析成像的三维成像能力。

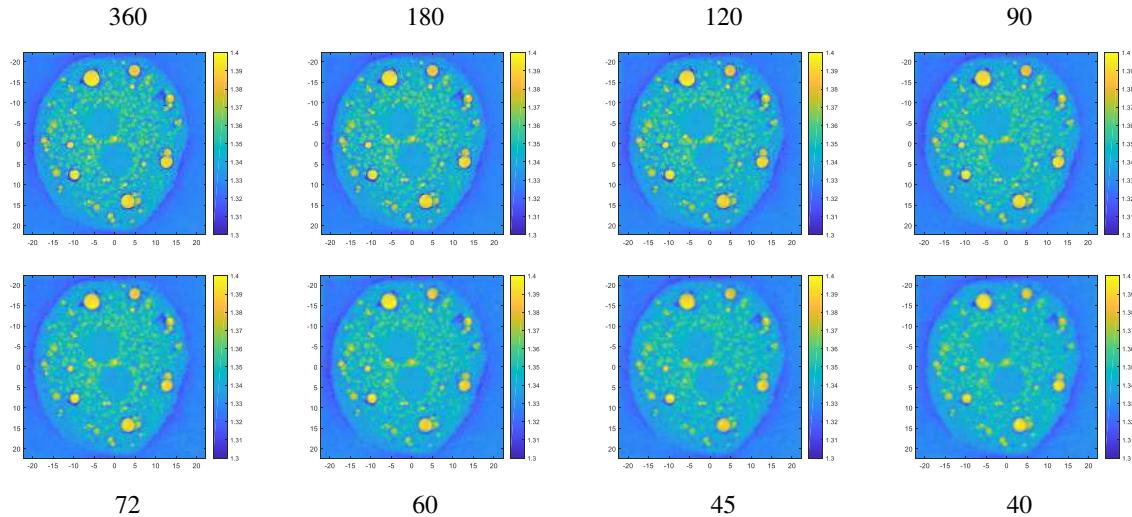


图 3.12 同一固定原初肝细胞在 360、180、120、90、72、60、45、40 个照明角度下光学衍射层析重构结果比较。坐标轴单位:  $\mu\text{m}$ , 色表: 折射率

利用固定的细胞样品可比较了不同数量照明角度下的细胞折射率恢复结果, 如图3.12。随着照明角度的减少, 重构得到的折射率图像信噪比逐渐下降, 同时脂滴结构的边缘逐渐模糊。在衍射层析成像中, 由于直接对激光成像, 相机光子计数较大, 暗噪声已可忽略。此时主要噪声来源为散粒噪声(泊松噪声), 散粒噪声的标准差等于平均光子计数的平方根, 信噪比(SNR)为:

$$\text{SNR} = \sqrt{N} \quad (3.5)$$

其中  $N$  探测器的平均光子计数。离轴全息的相位图像主要噪声来源仍为散粒噪声, 其信噪比亦可用式3.5估算<sup>[106,107]</sup>。频域拼接过程可认为是空域的平均过程, 因此, 光学衍射层析系统重构结果信噪比可估算为:

$$\text{SNR} = \sqrt{Nl} \quad (3.6)$$

因此, 提高照明角度数量可提高成像结果信噪比, 但其效果有一定的饱和趋势。受限于相机单次拍摄满阱限制及活细胞对激光耐受阈值, 我们选用 240 个角度以保证成像结果的信噪比。

光学衍射层析成像还可对激光直写样品的折射率变化进行表征。图3.13所示为400  $\mu\text{m}$  厚的载玻片中用二氧化碳激光器直写的校徽图案的成像结果。激光聚焦照射引起材料折射率改变不足 0.01, 仍可被光学衍射层析显微三维成像。

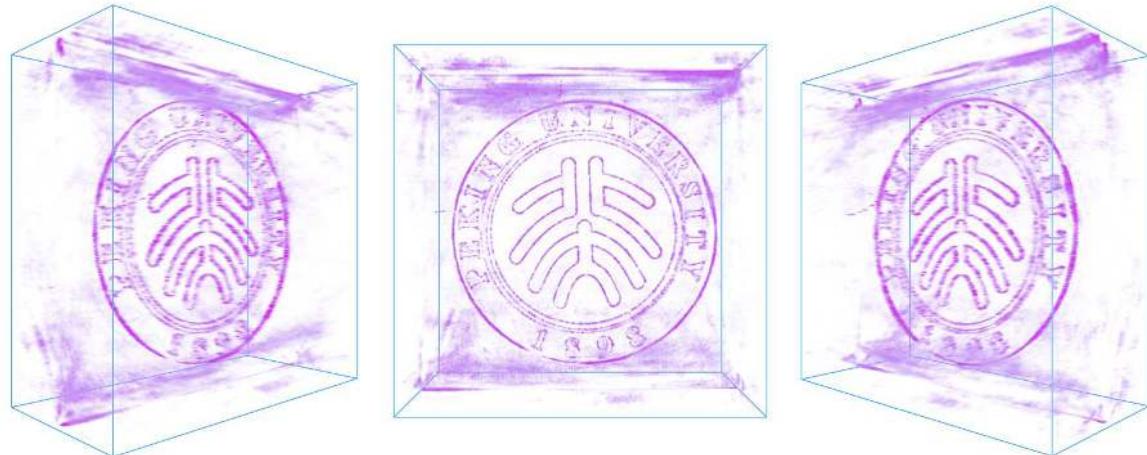


图 3.13 激光直写加工的北大校徽样品光学衍射层析图像三维渲染图。沿垂直方向旋转 $-45^\circ$ （左）、 $0^\circ$ （中）、 $45^\circ$ （右）的透视投影

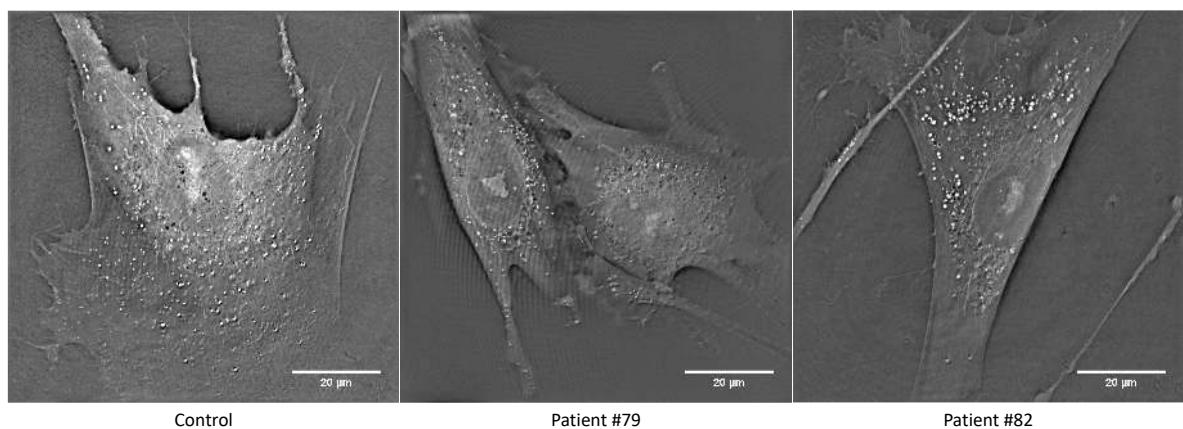


图 3.14 佩梅病人 Fibroblast 细胞的光学衍射层析图像。左：对照组细胞，中：79号病人的细胞，右：82号病人的细胞

### 3.1.6.2 无标记成像能力

图3.14所示为对佩梅病（Pelizaeus-Merzbacher Disease）人成纤维细胞的光学衍射层析图像。通过与对照组形态学上的比较，可发现病人细胞具有线粒体数目偏少、线粒体长度变短、溶酶体变大且结构异常等特点。在传统病理成像中，因伦理要求无法对人的活细胞进行外源荧光标记，因而鲜有细胞器尺度上的病理研究。光学衍射层析显微镜因其优异的无标记成像能力，在医学研究中应用前景广阔。

### 3.1.6.3 快速、长时程无损成像能力

光学衍射层析显微镜无需对细胞进行染色标记，因而对细胞光毒性低，适用于对细胞的长时程成像。

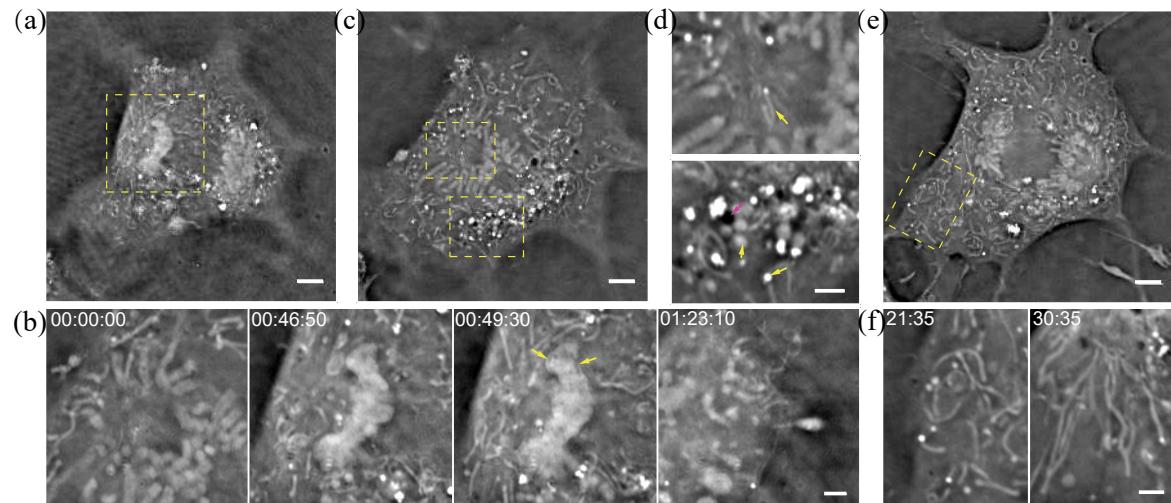


图 3.15 COS-7 细胞有丝分裂光学衍射层析图像，成像时间约 1.5 h。(a) 00:49:30 时刻细胞某 Z 平面图像；(b) 四个不同时刻 (a) 中黄色虚线框域的放大图像，分别显示了染色体分离聚拢、核膜的形成及染色质聚集成核的过程；(c) 00:00:00 时刻另一个 Z 平面 ((a) 中平面 0.86  $\mu\text{m}$  以下) 的细胞图像，(d) 为 (c) 中黄色虚线框所示区域的放大；(e) 00:43:10 时刻第三个 Z 平面 ((a) 中平面 1.72  $\mu\text{m}$  以下) 的细胞图像；(f) 为 (e) 中黄色虚线框所示区域两个不同时刻的图像，管状的细胞器在细胞分裂中伸展扭曲，细胞分裂后在核膜外径向排布。比例尺：5  $\mu\text{m}$  (a,c,e), 2  $\mu\text{m}$  (b,d,f)

图3.15为COS-7细胞间隔10 s共83 min的连续成像结果。其中图3.15 (b)中可看到有丝分裂过程中染色体被拉开、聚集融合分别形成新的细胞核的过程。得益于光学衍射层析的无标记成像特性，可同时观察到细胞胞浆中其它细胞器的动态，如图3.15 (f)所示管状线粒体在分裂过程中伸展扭曲，并在分裂后在核膜外径向排布。

此外，高速光学衍射层析成像还可用于观察其它细胞的生物学过程，如花粉管生长（图3.16）、线虫胚胎发育（图3.17）等。

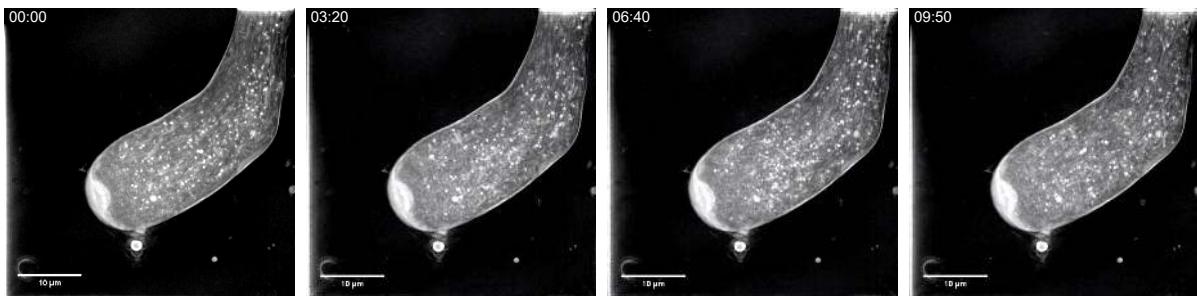


图 3.16 花粉管生长过程的光学衍射层析图像。从左至右依次为 00:00、03:20、06:40 及 09:50 时刻的轴向极值投影

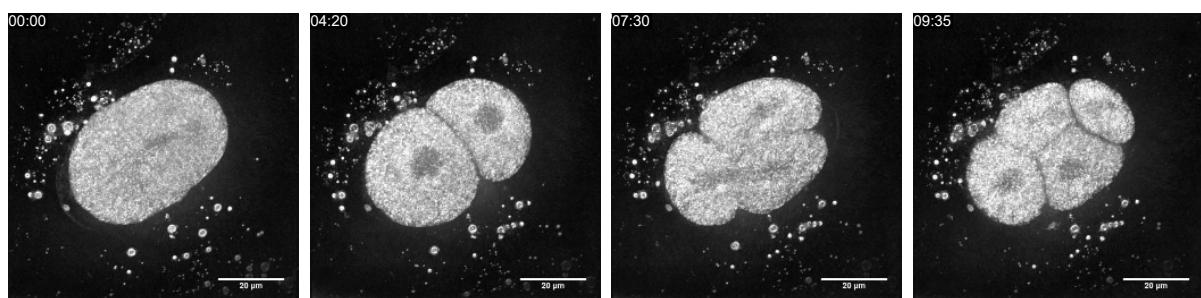


图 3.17 线虫胚胎发育过程的光学衍射层析图像。从左至右依次为 00:00、04:20、07:30 及 09:35 时刻的轴向极值投影

### 3.2 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统

在荧光成像中，由于激发光的高光子通量和光毒性，成像总次数受限，因而目前还未能全面揭露细胞内部细胞器的相互作用及动态过程。活细胞的高分辨长时程成像目前仍然是生物学研究中的巨大挑战，由于轴向扫描速度的限制，三维荧光成像需要更大的激发光子通量，而光漂白效应则极大限制了三维成像的总时长。同时，由于荧光光谱较宽，成像过程中通道数目受限，荧光成像一般仅能同时标记有限种类的分子。而电镜等辅助成像手段虽可观察多种细胞器，但仅能提供静态快照作为辅助。

光学衍射层析显微成像具有光通量低，光毒性小的特点，可有效解决荧光成像遇到的问题。光学衍射层析成像系统中，先前的工作缺少荧光成像作为辅助，衍射层析图像中的多数结构缺乏标定，仅能进行形态学分析。一些与荧光相结合的光学衍射层析工作中，由于分辨率的限制，也仅对脂滴、染色体和线粒体进行了鉴别标定。因此，本文提出一种结合光学衍射层析显微成像和结构光照明超分辨荧光成像的双模态显微成像方法，用超分辨荧光成像辅助光学衍射层析进行共定位成像。

本节首先概述结构光照明荧光成像技术；其次介绍双模态系统的光学系统架构和同步控制系统；最后对系统的分辨率进行表征。

### 3.2.1 结构光照明荧光显微技术概述

传统荧光显微镜受限于显微镜的成像带宽，分辨率受限于光学衍射极限。精细样品结构信息对应较高的空间频率，当此频率超出显微系统光学传递函数的截止频率时，便无法被成像。为了获得这些高频超分辨信息，2000年，Gustafsson提出并组装了第一台结构光照明显微镜 (Structured Illumination Microscope (SIM))<sup>[108]</sup>。结构光照明荧光显微镜通过光栅给照明光加载一定的空间频率，样品的高频信息将与其混频出一个较低的空间频率，即莫尔条纹效应。莫尔条纹将本无法被收集的空间高频信息移频到光学传递函数截止频率以内，从而可被成像系统收集，并通过解算提高显微系统的分辨率。由于照明光的空间频率也受到照明系统光学传递函数的影响，故线性结构光照明成像一般分辨率只能提高至两倍。为了进一步提高分辨率，Gustafsson还利用荧光的饱和效应提出了非线性结构光照明显微技术，分辨率可进一步提高到50 nm左右<sup>[109]</sup>。此外，若将光栅形成的三束光干涉，可得到具有三维调制结构的照明光，进而实现三维的超分辨成像<sup>[110]</sup>。通过结合光片显微镜和结构光照明显微镜，同时利用贝塞尔光的抗散射和自愈特性形成晶格状照明光片，可对样品进行三维快速高分辨成像<sup>[111]</sup>。

#### 3.2.1.1 二维结构光照明显微成像原理

在二维结构光照明显微镜中，两个方向的相干照明光干涉形成正弦结构光：

$$I^i(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} |1 - \gamma \cos(2\pi \mathbf{p} \cdot \mathbf{r} + \phi)| \quad (3.7)$$

其中  $\gamma$  为干涉深度， $\mathbf{p}$  为结构光空间频率， $\phi$  为结构光初始相位。

对于荧光成像系统，荧光光强与照明光强成正比，宽场成像系统的光强图像为：

$$I^e(\mathbf{r}) = I^i(\mathbf{r}) D(\mathbf{r}) * p(\mathbf{r}) \quad (3.8)$$

其中  $D(\mathbf{r})$  表示荧光分子密度分布， $*$  表示卷积操作， $p(\mathbf{r})$  表示系统的光强点扩散函数，根据式2.85定义为：

$$p(\mathbf{r}) = |h(\mathbf{r})|^2 \quad (3.9)$$

$$= \text{FT.}^{2D} \{ \mathcal{C}^{2D}(\mathbf{k}) \otimes \mathcal{C}^{2D}(\mathbf{k}) \} \quad (3.10)$$

$$= \text{FT.}^{2D} \{ \mathcal{O}(\mathbf{k}) \} \quad (3.11)$$

其中  $\mathcal{O}(k_x, k_y)$  即为光学传输函数，表征光强成像系统的频谱传输特性。

式3.8可在频域展开为：

$$\mathcal{I}^e(\mathbf{k}) = \frac{1}{2} \left[ \mathcal{D}(\mathbf{k}) - \frac{\gamma}{2} \mathcal{D}(\mathbf{k} - \mathbf{p}) e^{-i\phi} - \frac{\gamma}{2} \mathcal{D}(\mathbf{k} + \mathbf{p}) e^{+i\phi} \right] \cdot \mathcal{O}(\mathbf{k}) \quad (3.12)$$

其中  $\mathcal{D}(\mathbf{k})$  为荧光分子密度分布的空间频谱。结构光照明荧光图像频谱中包含了原频谱及移频  $\pm \mathbf{p}$  的频谱，三项频谱信息被光学传输函数  $\mathcal{O}(\mathbf{k})$  以截止频率进行了滤波。为分离三部分频谱信息，需改变  $\phi$  进行三次测量，分别得到频谱：

$$\begin{bmatrix} \mathcal{J}_1^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_2^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_3^e(\mathbf{k}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{i\phi_1} & 1 & e^{-i\phi_1} \\ e^{i\phi_2} & 1 & e^{-i\phi_2} \\ e^{i\phi_3} & 1 & e^{-i\phi_3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \frac{\gamma}{4} \mathcal{D}(\mathbf{k} + \mathbf{p}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \\ \frac{1}{2} \mathcal{D}(\mathbf{k}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \\ \frac{\gamma}{4} \mathcal{D}(\mathbf{k} - \mathbf{p}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

分离各频谱成分  $S_n(\mathbf{k})$ :

$$\begin{bmatrix} S_1(\mathbf{k} + \mathbf{p}) \\ S_2(\mathbf{k}) \\ S_3(\mathbf{k} - \mathbf{p}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\gamma}{4} \mathcal{D}(\mathbf{k} + \mathbf{p}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \\ \frac{1}{2} \mathcal{D}(\mathbf{k}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \\ \frac{\gamma}{4} \mathcal{D}(\mathbf{k} - \mathbf{p}) \mathcal{O}(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.14)$$

$$= \begin{bmatrix} e^{i\phi_1} & 1 & e^{-i\phi_1} \\ e^{i\phi_2} & 1 & e^{-i\phi_2} \\ e^{i\phi_3} & 1 & e^{-i\phi_3} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathcal{J}_1^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_2^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_3^e(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

在实际二维图像中，一般通过在三个夹角  $\frac{\pi}{3}$  的方向  $\mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2, \mathbf{p}_3$  分别重复测量，以实现在二维各个方向上较为均匀的超分辨结果。九个频谱分量可表示为：

$$\begin{bmatrix} S_1(\mathbf{k} + \mathbf{p}_1) \\ S_2(\mathbf{k}) \\ S_3(\mathbf{k} - \mathbf{p}_1) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{i\phi_1} & 1 & e^{-i\phi_1} \\ e^{i\phi_2} & 1 & e^{-i\phi_2} \\ e^{i\phi_3} & 1 & e^{-i\phi_3} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathcal{J}_1^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_2^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_3^e(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

$$\begin{bmatrix} S_4(\mathbf{k} + \mathbf{p}_2) \\ S_5(\mathbf{k}) \\ S_6(\mathbf{k} - \mathbf{p}_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{i\phi_1} & 1 & e^{-i\phi_1} \\ e^{i\phi_2} & 1 & e^{-i\phi_2} \\ e^{i\phi_3} & 1 & e^{-i\phi_3} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathcal{J}_4^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_5^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_6^e(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.17)$$

$$\begin{bmatrix} S_7(\mathbf{k} + \mathbf{p}_3) \\ S_8(\mathbf{k}) \\ S_9(\mathbf{k} - \mathbf{p}_3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{i\phi_1} & 1 & e^{-i\phi_1} \\ e^{i\phi_2} & 1 & e^{-i\phi_2} \\ e^{i\phi_3} & 1 & e^{-i\phi_3} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathcal{J}_7^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_8^e(\mathbf{k}) \\ \mathcal{J}_9^e(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

解出以上频谱分量后，可利用 Wiener 逆滤波求解高分辨荧光密度分布频谱为：

$$\mathcal{D}(\mathbf{k}) = \frac{\sum_{n=1}^9 S_n(\mathbf{k}) \mathcal{O}_n^*(\mathbf{k})}{\sum_{n=1}^9 |\mathcal{O}_n(\mathbf{k})|^2 + \alpha^2} \quad (3.19)$$

其中：

$$\mathcal{O}_n(\mathbf{k}) = \begin{cases} \frac{1}{2}\mathcal{O}(\mathbf{k}) & n = 2, 5, 8, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} - \mathbf{p}_1) & n = 1, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} + \mathbf{p}_1) & n = 3, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} - \mathbf{p}_2) & n = 4, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} + \mathbf{p}_2) & n = 6, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} - \mathbf{p}_3) & n = 7, \\ \frac{\gamma}{4}\mathcal{O}(\mathbf{k} + \mathbf{p}_3) & n = 9. \end{cases} \quad (3.20)$$

$\alpha$  为 Wiener 滤波中为减少噪声而引入的正则参数。式3.20表明最终频谱共包含 7 个频谱成分，其中六个均匀分布在六个方向上而扩充一定频谱范围。最终可求得荧光密度分布图像为：

$$D(\mathbf{r}) = \text{IFT.}^{2D} \{ \mathcal{D}(\mathbf{k}) \} \quad (3.21)$$

### 3.2.1.2 超快、长时程海森结构光照明显微镜<sup>[112]</sup>

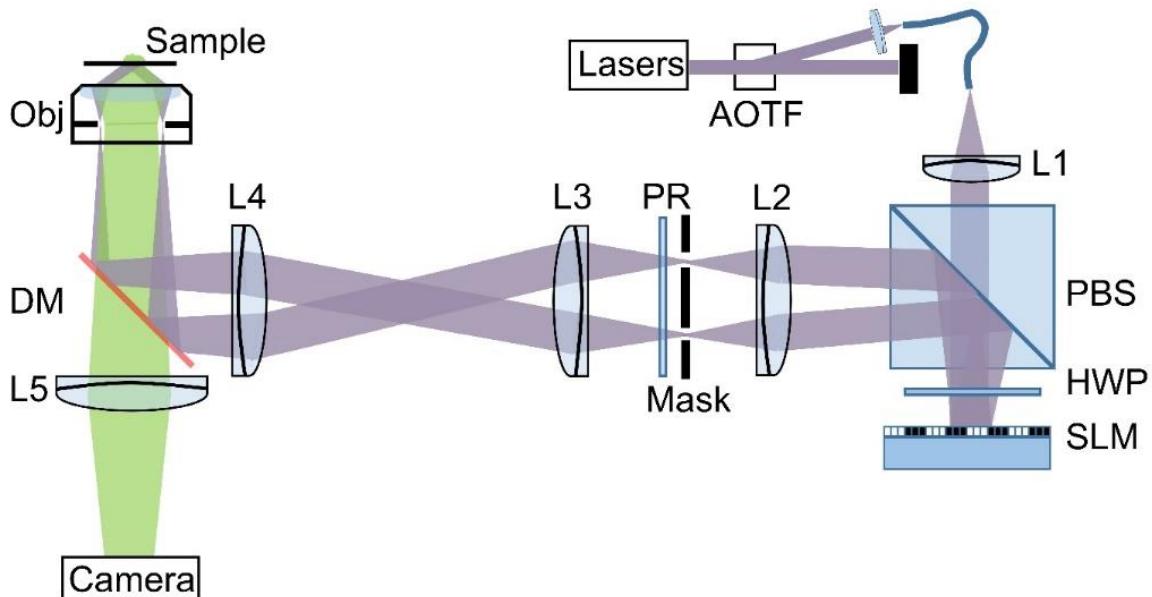


图 3.18 海森结构光照明显微镜系统示意图。AOTF：声光可调衰减器，SLM：空间光调制器，HWP：二分之一波片，PBS：偏振分光棱镜，PR：偏振旋转器，DM：二向色镜，Obj：显微物镜，L1-L5：透镜

超快、长时程海森结构光照明显微镜系统如图3.18所示，其中紫色表示激发光路，绿色为荧光成像光路。激光通过声光可调滤波器（AOTF）进行开关调节，+1 级光经

单模光纤滤波后被透镜准直作为光源。经过偏振分光棱镜、二分之一波片和空间光调制器（SLM）后，光场加载了空间光调制器上的结构光调制图案。结构光被透镜聚焦在空间滤波器上，滤除空间光调制器产生的杂散光。之后不同方向调制的结构光经液晶偏振旋转器（PR）改变偏振方向，保持在样品玻片上干涉形成调制光场始终为 S 偏振方向入射。之后通过  $4-f$  系统（L3、L4）将  $\pm 1$  级光聚焦在物镜后焦面上，在样品处干涉为衍射极限的调制条纹并激发荧光。荧光由同一物镜收集后由二色镜与激发光分离，通过透镜在相机上成像。

使用快速的空间光调制器，超快、长时程结构光照明显微镜原始荧光图像采集速度最高为 188 Hz（使用 CMOS 相机 72 行，对应成像宽度  $4.5 \mu\text{m}$ ），超分辨成像速度最高可达 9.78 Hz。实际成像速度还受限于荧光标记情况及信号强度。利用生物样本在  $xyt$  利用三维空间的连续性作为先验知识，可进一步采用基于海森范数的正则化方式，重构出伪影更少的超分辨荧光图像。与维纳逆滤波的经典重构算法相比，海森反卷积仅需前者百分之十的光子数就可达到同样的超分辨图像。

### 3.2.2 光学系统架构

本文提出并实现了一种结合光学衍射层析显微成像和结构光照明超分辨荧光成像的双模态显微成像方法，利用超分辨荧光成像辅助光学衍射层析成像。其系统架构如图 3.19 所示。成像光路基于商用显微镜（OLYMPUS, IX73）并配备高数值孔径成像物镜（OBJ2: OLYMPUS, ApoN, 100 $\times$  NA = 1.45）。光学衍射层析和结构光照明荧光模态通过二色镜 DM1（Chroma, ZT405/488/561/640-phase R）及二色镜 DM2（Thorlabs, DMLP550L）结合。光学衍射层析主要元器件与 3.1 所属相同。结构光荧光照明荧光模态使用波长为 488 nm 激光器（Coherent, Sapphire 488LP-200）作为光源，经声光可调滤波器（AA Opto-Electronic, AOTF）调制光强和开关时间后，+1 级衍射光经耦合透镜（Lightpath,  $f = 10 \text{ mm}$ ）耦合到保偏单模光纤。激光经光纤滤波后由透镜（L8: Thorlabs, AC254-100-A,  $f = 100 \text{ mm}$ ）准直。准直后的线偏振激光经由偏振分光棱镜（PBS: Thorlabs, CM1-PBS251）、二分之一玻片（HWP: Thorlabs, AHWP10M-600）及空间光调制器（SLM: Fourth Dimension Display, QXGA-3DM）组成的结构光系统后被加载二值相位调制。调制后光场被透镜（L5: Thorlabs, AC508-500-A,  $f = 500 \text{ mm}$ ）聚焦在空间滤波器（Mask）上，滤出所需的  $\pm 1$  级衍射，并由透镜（L6: Thorlabs, AC508-200-A,  $f = 200 \text{ mm}$ ）重新准直。在光束汇聚处，液晶偏振旋转器根据条纹方向旋转照明光偏振，保持相对样品为 S 偏振方向入射形成干涉条纹。结构光经透镜（L4: Thorlabs, AC508-200-A,  $f = 200 \text{ mm}$ ）和高数值孔径物镜组成的  $4-f$  系统成像在样品上，形成衍射极限下的调制条纹。激发出的荧光经物镜收集，通过显微镜自带管透镜（L5,  $f = 180 \text{ mm}$ ）

成像在 sCMOS 相机（Hamamatsu, OCRA-flash4.0 V2 C11440）上。

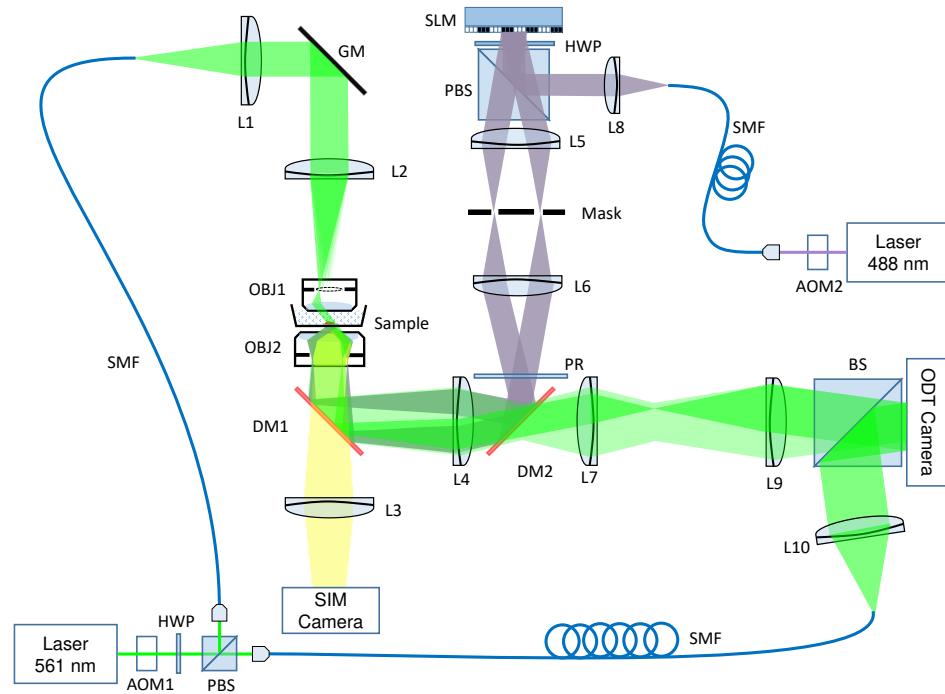


图 3.19 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统示意图。AOM：声光调制器，HWP：二分之一波片，PBS：偏振分光棱镜，SMF：单模光纤，OBJ：显微物镜，DM：二向色镜，PR：偏振旋转器，SLM：空间光调制器，L1-L10：透镜

### 3.2.3 同步控制系统

光学衍射层析-结构光照明荧光双模态成像系统的同步控制系统如图3.20所示。数据采集卡（Natinal Instruments, USB-6363）的四个模拟输出通道分别控制两轴振镜扫描、z 轴压电平移台及液晶偏振旋转器。液晶偏振旋转器由信号发生器产生的调幅20 kHz方波信号控制，调幅电压由数据采集卡产生。空间光调制器和两个相机则由数据采集卡的四路可编程数字输出端口控制，其中 PFI0.0 和 PFI0.1 控制空间光调制器的开关和触发，PFI0.2 和 PFI0.3 输出相机外触发信号。

系统同步触发时序如图3.21。通常使用 CMOS 相机共 1024 行的曝光区域，对应成像区域为  $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ 。在每次循环中，衍射层析系统采集 240 张全息图像，之后拍摄 9 张荧光图像。光学衍射层析使用的 sCMOS 相机工作在同步触发模式下，采集一组数据共耗时 1.225 s。为保证荧光图像信噪比并避免漂白细胞样品，荧光相机曝光时间设为 30 ms，每三张图像需改变一次偏振旋转器的旋转角度。双模态单组数据采集时间约 2 s。

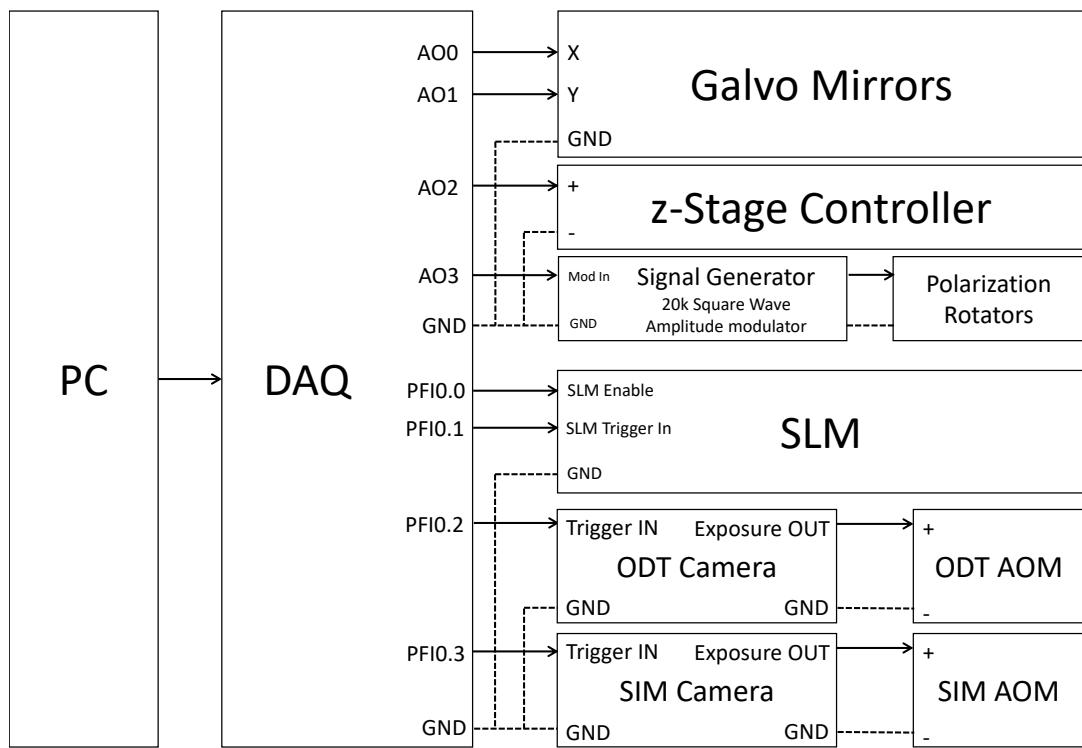


图 3.20 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像控制系统示意图。PC: 控制电脑, DAQ: 数据采集卡, SLM: 空间光调制器

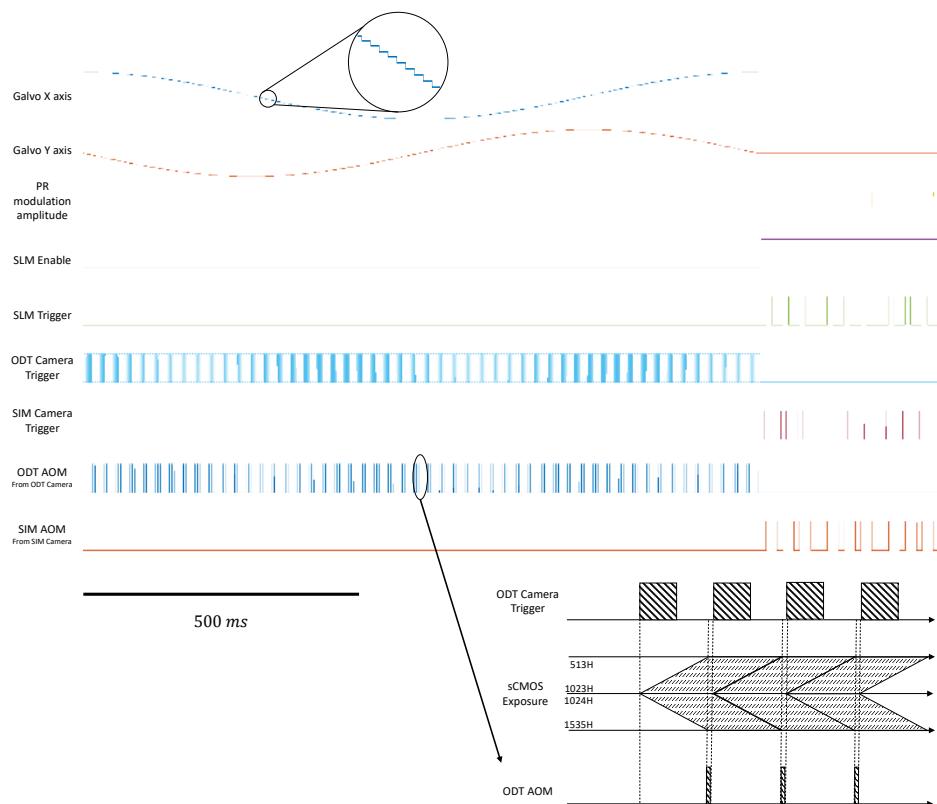


图 3.21 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统控制时序图。比例尺 500 ms

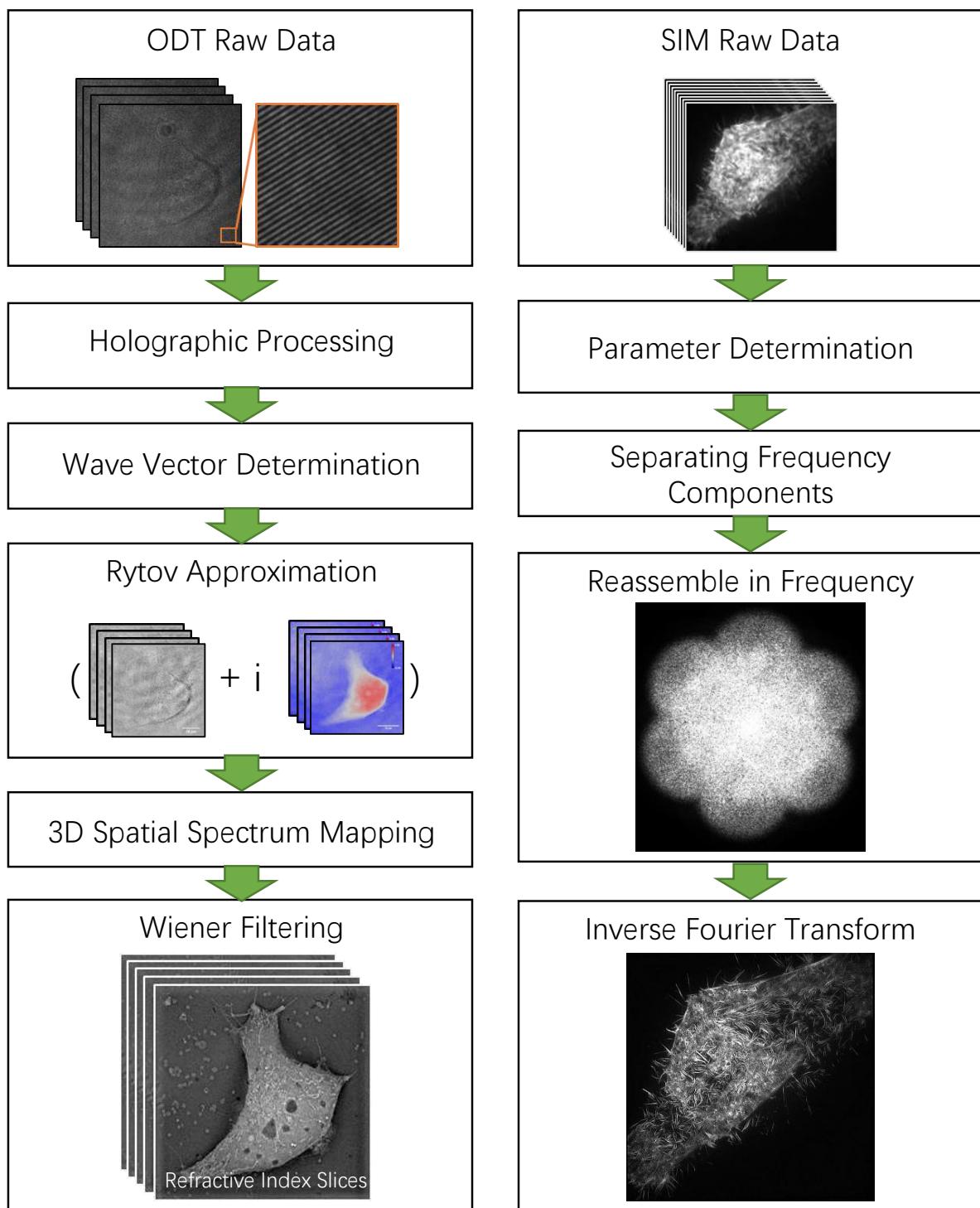


图 3.22 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像数据处理流程图

### 3.2.4 双模态成像数据处理

双模态成像结果的数据处理流程如图3.22所示。结构光照明荧光图像数据首先需根据图像数据计算重构参数，之后经过频谱成分分离及拼接得到高分辨荧光图像。光学衍射层析数据经全息处理、波矢计算、Rytov 近似、频谱拼接及逆滤波等过程得到三维的折射率图像。实验中，数据由相机传输到计算机并进行高速存储；并在实验后上传至超算平台批量离线处理。

### 3.2.5 系统分辨率表征

本文使用 Lifeact-EGFP 标记的 COS-7 细胞的双模态成像结果对双模态成像系统的分辨率进行了表征。细胞中肌动蛋白微丝的双模态图像如图3.23 (a-b) 所示。通过对 50 个时刻的连续采集的沿肌动蛋白微丝垂直方向上的折射率变化和荧光强度分布的统计（图3.23 (c-f)），可得出超分辨结构光照明荧光成像模态横向分辨率约为100 nm，与理论预期相符<sup>[112]</sup>；光学衍射层析成像模态的横向分辨率约为200 nm，纵向分辨率约为560 nm，与3.1.5节所述理论预期相符。

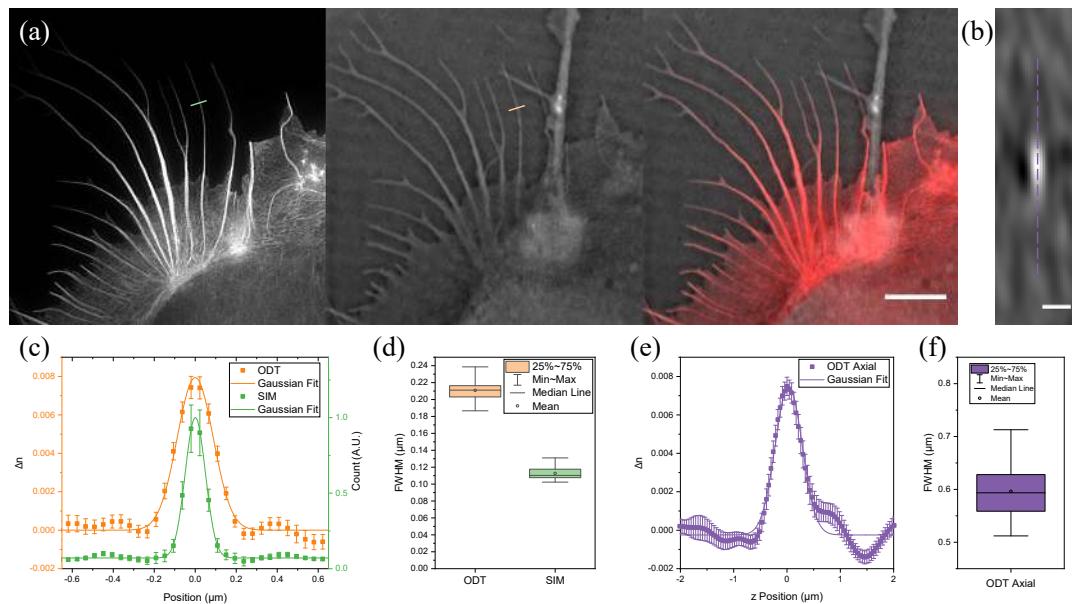


图 3.23 光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统横向分辨率表征。(a) 使用 Lifeact-EGFP 标记了肌动蛋白的光学衍射层析-结构光照明荧光双模态图像：左，结构光照明荧光超分辨图像；中，对应深度的光学衍射层析图像；右，共定位图像。比例尺：5  $\mu\text{m}$  (b) 沿 (a) 中橙色和绿色实线上的折射率变化的轴向剖面图。比例尺：0.5  $\mu\text{m}$ 。(c) 沿 (a) 中橙色和绿色实线上的折射率变化和荧光强度分布。(d) 对 (c) 中沿肌动蛋白微丝垂直方向连续 50 次测量并统计的的横向半高全宽 (FWHM)。(e) 沿 (b) 中紫色虚线上的折射率变化分布。(f) 对 (e) 中沿肌动蛋白微丝垂直方向连续 50 次测量并统计的的轴向半高全宽 (FWHM)

### 3.3 本章小结

本章对线性光学衍射层析显微镜的系统构成进行了介绍，并对其成像能力表征。在其基础上，进一步集成了结构光照明荧光双模态成像系统，用以辅助无标记的光学衍射层析成像。

本章首先实现了一套高速线性光学衍射层析成像系统，通过对振镜高速扫描系统的同步控制，实现了 $0.82\text{ Hz}$ 的高速三维成像（成像区域为 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ ），高于传统荧光层扫分钟级的成像速度。经成像系统的校准表征、全息带宽的精细调控，其具有优异的成像质量。一系列生物细胞成像结果、微纳器件表征结果验证了高速线性光学衍射层析显微系统在三维成像、无标记成像、快速长时程成像中的优势。

本章还提出光学衍射层析-结构光照明荧光双模态成像系统，通过结构光照明荧光成像辅助无标记的光学衍射层析成像。首先介绍了构光照明成像技术的原理和超快、长时程结构光照明荧光成像技术的实现方法。其次，搭建了双模态成像系统，通过同步控制实现在 $2\text{ s}$ 内完成一组双模态成像。最后，通过活细胞中肌动蛋白微丝的实测数据对系统分辨率进行了表征，系统横向分辨率达到了结构光照明荧光的约 $100\text{ nm}$ 和光学衍射层析的约 $200\text{ nm}$ ，光学衍射层析成像系统纵向分辨率约为 $560\text{ nm}$ 。

光学衍射层析成像虽然在三维成像及快速长时程成像中有巨大优势，但受限于其无标记特性，在其应用初期的生物学研究中有必要辅以荧光成像模态。海森结构光照明荧光成像通过时空连续性的先验性假设，使用海森范数正则化算法，减少了超分辨重构中的伪影，并提高了成像信噪比，相比传统结构光照明荧光成像有更快的成像速度和成像时间，非常适合于对光学衍射层析成像结果的标定和验证。

虽然结构光照明荧光成像模态在分辨率和特异性成像能力上有一定优势，但受限于荧光成像本身的特点，相比光学衍射层析模态，其在实际成像中仍在多方面受限。在成像维度上，受限于荧光过程有限的光子数量，在秒量级的成像时间中，超分辨荧光仅对细胞中一层二维结构进行超分辨率成像，而光学衍射层析模态可进行三维高分辨率成像。在成像总时程上，海森结构光照明荧光成像虽可节省激发光功率，有效延长成像时间，但依然受限于光漂白效应，成像总时程往往取决于荧光样品。[5.1](#)节的成像结果中也体现了这些限制因素。这更加突出了光学衍射层析成像在三维成像、无标记成像、快速长时程成像中的优势。

光学衍射层析成像模态和结构光照明荧光成像模态的结合充分弥补了两者的短板。光学衍射层析成像提供了新的成像对比机制，其高速三维成像可更全面的表征细胞内部的动力学过程。同时，超分辨荧光成像为光学衍射层析图像的形态学鉴别提供了有力的化学特异性佐证，将极大推进衍射层析在生物医学研究中的应用。

## 第四章 基于相干反斯托克斯拉曼散射的光学衍射层析

尽管线性光学衍射层析可以无标记地对样品进行三维成像，但由于其缺乏化学选择性，不能表征特定分子或化学基团分布，难以独立对细胞代谢过程成像。荧光成像虽可对特定生物大分子进行标记，但仍受限于光漂白效应，且无法标记细胞内的小分子。综合以上两点，细胞代谢研究亟需一种非标记、同时具有化学特异性的成像技术。

拉曼散射携带分子特异化学结构振转能级的指纹信息，使得无标记的分子探测成为可能。然而由于可见光波段自发拉曼散射截面很小、信号强度低，较长的积分时间限制了其在生物动态成像中的应用。为提高拉曼信号强度，一种方法是使用中红外光源进行共振激发，但此方法的成像分辨率受限；另一种方法是利用非线性光学效应增强拉曼散射，相关的非线性过程有受激拉曼散射（Stimulated Raman Scattering (SRS)）和相干反斯托克斯拉曼散射（Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)）。SRS 成像中一般探测泵浦光在有无斯托克斯光时的强度变化，需用锁相探测器进行信号测量，一般进行点扫描显微成像。而 CARS 信号在光谱短波端产生新的频谱成分，因而有利于分离泵浦光、探测光及自发荧光信号干扰，进行宽场动态成像。

CARS 信号是相干信号，可用全息技术对其散射信号的强度和相位进行测量。利用光学衍射层析理论所给散射光场信号与样品三维结构之间的关系，本章提出基于 CARS 的光学衍射层析成像方法，以实现对非线性极化率三维分布的层析成像。

### 4.1 相干反斯托克斯拉曼散射

#### 4.1.1 相干反斯托克斯拉曼散射技术概述

CARS 是一种基于拉曼共振的四波混频效应。与自发拉曼散射不同，多光子过程增强了分子振动，并产生相干的 CARS 信号。如图4.1所示，CARS 过程是一个三阶非线性过程。频率为  $\omega_p$  的泵浦光场  $E_p$  和频率为  $\omega_s$  的斯托克斯光场  $E_s (\omega_s < \omega_p)$  同时作用在样品上。若泵浦光和斯托克斯光的频率差恰好为样品的分子振动特征频率  $\Omega_R = \omega_p - \omega_s$ ，则分子在两个光场作用下发生受迫振动，进入拉曼相干态。在拉曼相干态的弛豫寿命内，分子若再吸收一个与泵浦光频率相同的探测光子（简并激发），便会产生一个频率为  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$  的反斯托克斯光子。此过程的三阶非线性极化强度为：

$$P^{(3)} = \chi^{(3)}(\omega_{as}) E_p^2 E_s^* \quad (4.1)$$

其中  $\chi^{(3)}$  为样品的三阶非线性极化率，可表示为：

$$\chi^{(3)}(\omega_{as}) = \frac{A_R}{\Omega_R - (\omega_p - \omega_s) - i\Gamma_R} - \chi_{NR}(\omega_{as}) \quad (4.2)$$

其中  $A_R$  为拉曼散射截面， $\Gamma_R$  为特征拉曼谱线半高宽， $\chi_{NR}$  为由电子振动引起的非共振非线性极化率。

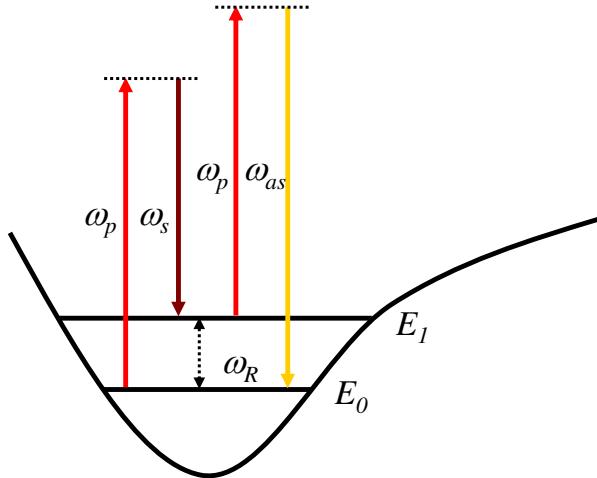


图 4.1 CARS 能级示意图

若泵浦光和斯托克斯光的波矢分别为  $\mathbf{k}_p$  和  $\mathbf{k}_s$ ，则产生的反斯托克斯光场  $E_{as}$  满足：

$$\frac{\partial |E_{as}|}{\partial z} = \frac{i\omega_{as}}{2k_{as}} \chi^{(3)} |E_p|^2 |E_s| e^{i|\Delta\mathbf{k}|z} \quad (4.3)$$

其中  $\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k}_{as} - (2\mathbf{k}_p - \mathbf{k}_s)$  为相位匹配因子。可见 CARS 信号的产生还需要满足一定的相位匹配条件：

$$l_c = \frac{\pi}{|\Delta\mathbf{k}|} \quad (4.4)$$

$$= \frac{\pi}{|\mathbf{k}_{as} - (2\mathbf{k}_p - \mathbf{k}_s)|} \quad (4.5)$$

$$\gg l_i \quad (4.6)$$

即相干距离  $l_c$  远大于待测分子作用距离  $l_i$ 。早期的 CARS 装置主要采用共线的相位匹配方式（图4.2 (a)）。这种相位匹配方式下光束传播方向上所有介质都产生 CARS 信号，在点扫描成像中分辨率受限。为解决此问题，Eckbreth 等在 1978 年提出了一种非共线相位匹配方式，称为 BOXCARS<sup>[113]</sup>（图4.2 (b)）。在这种相位匹配方式下，仅焦点附近可产生 CARS 信号，因此在点扫描成像中具有较高的空间分辨率。PriorI 还进一步提出了三维 BOXCARS 的概念<sup>[114]</sup>，而 Shirley 等则提出折叠 BOXCARS<sup>[115]</sup>，目的都是减小

信号产生区域，提高空间分辨率。

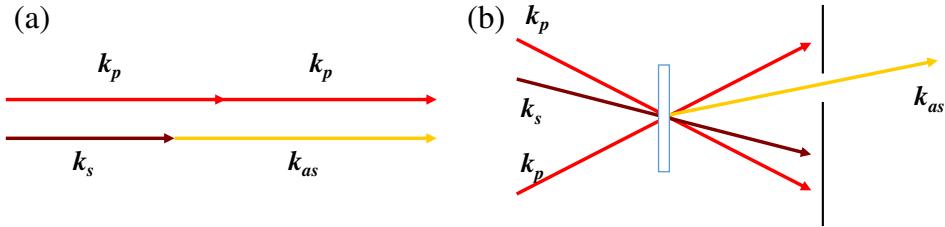


图 4.2 CARS 相位匹配方式。(a) 共线相位匹配, (b) 非共线相位匹配

### 4.1.2 相干反斯托克斯拉曼散射在显微成像中的应用

CARS 无标记特异性成像能力使其在显微成像中有巨大应用潜力。1982 年, Duncan 等首次利用染料皮秒激光器在非共线相位匹配下实现了 CARS 显微成像<sup>[116]</sup>。由于非共线的相位匹配方式无法充分利用物镜数值孔径, 成像分辨率受限; 同时可见波段的激发波长, 会引发荧光背景, 降低图像对比度。受限于以上原因, CARS 显微成像当时未能引起人们注意。

1999 年, Zumbusch 及谢晓亮等使用近红外飞秒光源在共线相位匹配方式下进行 CARS 成像, 有效避免了双光子荧光的干扰<sup>[117]</sup>。同时, 他们证明高数值孔径下紧聚焦光斑内激光各方向分量间可实现相位匹配以产生信号。因此, 他们实现了基于生物样品特有振动能谱的高分辨率三维成像。此后, CARS 显微技术迅猛发展。

谢晓亮研究组在 CARS 显微成像做了很多具开创性的系统性工作。2001 年, Cheng 等利用皮秒光源实现了 CARS 显微成像, 解决了宽谱飞秒光源在拉曼光谱分辨率上受限的问题, 并抑制了背景信号<sup>[118]</sup>。Volkmer 等实现了背向 CARS 成像, 更适合细胞样品成像<sup>[119]</sup>。Muller 等利用同步的窄带皮秒脉冲和宽带飞秒脉冲实现了多特征谱线的 CARS 显微成像, 大大提高了多通道成像的速度<sup>[120]</sup>。为提高 CARS 显微成像对比度, 谢晓亮课题组还利用偏振<sup>[121]</sup>、时间分辨<sup>[122]</sup>、干涉测量<sup>[123]</sup>、相干调控<sup>[124]</sup>、相位成像<sup>[125]</sup>等方法抑制成像中的非共振背景。经过十余年的发展, CARS 显微技术已成为一种重要的生物显微成像方法。

由于点扫描的 CARS 显微成像中扫描速度受限, 宽场 CARS 显微成像应运而生。Heinrich 等首先摆脱传统 CARS 的共聚焦模式, 利用暗场聚光镜来做到相位匹配, 使用纳秒激光实现了宽场 CARS 显微成像<sup>[126]</sup>。之后, Toytman 等进一步提出利用非相位匹配照明抑制非共振背景干扰、利用散射的斯托克斯光激发的 CARS 信号进行宽场成像<sup>[127]</sup>。

由于 CARS 信号为相干信号, 基于离轴数字全息<sup>[128]</sup> 和同轴数字全息<sup>[129]</sup> 的 CARS 全息显微成像得以实现。在此基础上, 振动相位成像<sup>[130,131]</sup> 和偏振调控<sup>[132]</sup> 也被用于

抑制宽场全息成像中的非共振背景。然而，全息成像测量的是 CARS 光场的振幅和强度分布，而非三阶非线性系数的空间分布。光学衍射层析技术可利用散射光场和样品散射势空间分布间的关系重构样品三维分布，因此本章提出基于 CARS 的光学衍射层析成像，以实现对样品的无标记、化学特异三维成像。

## 4.2 相干反斯托克斯拉曼散射层析成像原理

在小信号近似下，若忽略泵浦光和斯托克斯光的损耗，CARS 信号满足以下波动方程：

$$(\nabla^2 + k_{as}^2) E_{as}(\mathbf{r}) = k_{as}^2 \chi^{(1)}(\mathbf{r}) E_{as}(\mathbf{r}) + k_{as}^2 \chi^{(3)}(\omega_{as}, \mathbf{r}) E_p^2(\mathbf{r}) E_s^*(\mathbf{r}) \quad (4.7)$$

其中  $k_{as}$  为 CARS 光的波矢， $\chi^{(1)}(\mathbf{r})$  为样品的线性极化率分布， $\chi^{(3)}(\omega_{as}, \mathbf{r})$  为三阶非线性极化率分布，使得不同波长下表现不同的拉曼指纹信息。

假设样品折射率均匀分布，线性极化率很小，几乎不会引起激发光场和 CARS 光场的散射。此时式 4.7 可改写为：

$$(\nabla^2 + k_{as}^2) E_{as}(\mathbf{r}) = k_{as}^2 \chi^{(3)}(\omega_{as}, \mathbf{r}) E_p^2(\mathbf{r}) E_s^*(\mathbf{r}) \quad (4.8)$$

利用格林函数（式 2.11）可将上式改写为积分方程：

$$E_{as}(\mathbf{r}) = -k_{as}^2 \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \chi^{(3)}(\omega_{as}, \mathbf{r}') E_p^2(\mathbf{r}') E_s^*(\mathbf{r}') d^3 r' \quad (4.9)$$

当泵浦光和斯托克斯光均为准直光：

$$E_p(\mathbf{r}) = a_p e^{i\mathbf{k}_p \cdot \mathbf{r}} \quad (4.10)$$

$$E_s(\mathbf{r}) = a_s e^{i\mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r}} \quad (4.11)$$

则可记

$$E_p^2(\mathbf{r}) E_s^*(\mathbf{r}) = a_p^2 a_s e^{i(2\mathbf{k}_p - \mathbf{k}_s) \cdot \mathbf{r}} \quad (4.12)$$

$$= a_p^2 a_s e^{i(k_{as} \mathbf{s}_{as} - \Delta \mathbf{k}) \cdot \mathbf{r}} \quad (4.13)$$

其中， $k_{as} \mathbf{s}_{as} = (k_{as,x}, k_{as,y}, k_{as,z})$  为 CARS 信号波矢， $\mathbf{s}_{as}$  为 CARS 信号传播方向的单位矢量， $\Delta \mathbf{k} = (\Delta k_x, \Delta k_y, \Delta k_z)$  为相位匹配因子。此时式 4.9 与线性情形下的散射场有相似的形式，因此可利用类似线性光学衍射层析的方法求解携带拉曼指纹信息的三阶非线性极化率的三维分布。

利用式2.56可将4.9改写为:

$$E_{as}(\mathbf{r}) = -\frac{i a_p^2 a_s k_{as}^2}{8\pi^2} \iiint d^3 r' \iint dk_x dk_y \frac{\chi^{(3)}(x', y', z')}{k_z} \times e^{i[k_x(x-x')+k_y(y-y')+k_z(z-z')]} e^{i(k_{as}\mathbf{s}_{as}-\Delta\mathbf{k})\cdot\mathbf{r}'} \quad (4.14)$$

整理可得:

$$E_{as}(\mathbf{r}) = -\frac{i a_p^2 a_s k_{as}^2}{8\pi^2} \iiint d^3 r' \iint dk_x dk_y \frac{\chi^{(3)}(x', y', z')}{k_z} \times e^{-i[(k_x-k_{as,x}+\Delta k_x)x'+(k_y-k_{as,y}+\Delta k_y)y'+(k_z-k_{as,z}+\Delta k_z)z']} e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}} \quad (4.15)$$

其中:

$$k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_{as}^2 \quad (4.16)$$

$$k_{as}\mathbf{s} = (k_{as,x}, k_{as,y}, k_{as,z}) \quad (4.17)$$

$\mathbf{s}$  为指向点源特定散射方向的单位矢量。交换积分顺序可得:

$$E_{as}(\mathbf{r}) = -\frac{i a_p^2 a_s k_{as}^2}{8\pi^2} \times \iint \underbrace{\frac{1}{k_z} \mathcal{X}^{(3)}(k_x - k_{as,x} + \Delta k_x, k_y - k_{as,y} + \Delta k_y, k_z - k_{as,z} + \Delta k_z)}_{k_{as}(\mathbf{s}-\mathbf{s}_0)-\Delta\mathbf{k}} e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}} dk_x dk_y \quad (4.18)$$

其中,  $\mathcal{X}^{(3)}(k_x, k_y, k_z)$  为  $\chi^{(3)}(x, y, z)$  的傅立叶变换。假设在  $(x = x^D, y = y^D, z = z_0)$  平面上记录对散射光场进行成像记录, 则像面上的二维散射场为:

$$E_{as}(x^D, y^D) = E_{as}(\mathbf{r})|_{x=x^D, y=y^D, z=z_0} \quad (4.19)$$

$$= -\frac{i a_p^2 a_s k_{as}^2}{8\pi^2} \iint \frac{1}{k_z} \mathcal{X}^{(3)}(k_{as}(\mathbf{s}-\mathbf{s}_0) - \Delta\mathbf{k}) e^{i(k_x x^D + k_y y^D + k_z z_0)} dk_x dk_y \quad (4.20)$$

其二维频谱傅立叶变换为:

$$\begin{aligned} \mathcal{E}_{as}(k_x^D, k_y^D) &= \iint E_{as}(x^D, y^D) e^{-i(k_x^D x^D + k_y^D y^D)} dx^D dy^D \\ &= -\frac{i a_p^2 a_s k_{as}^2}{8\pi^2} \iint \frac{e^{ik_z z_0}}{k_z} \mathcal{X}^{(3)}(k_{as}(\mathbf{s}-\mathbf{s}_0) - \Delta\mathbf{k}) \\ &\quad \times \iint e^{i[(k_x - k_x^D)x^D + (k_y - k_y^D)y^D]} dx^D dy^D dk_x dk_y \quad (4.21) \end{aligned}$$

由此可得 CARS 信号的傅立叶衍射定理:

$$\mathcal{E}_B(k_x^D, k_y^D) = \frac{a_p^2 a_s k_{as}^2 e^{ik_z^D z_0}}{2ik_z^D} \mathcal{X}^{(3)}(k_x^D - k_{as,x} + \Delta k_x, k_y^D - k_{as,y} + \Delta k_y, k_z^D - k_{as,z} + \Delta k_z) \quad (4.22)$$

其中:

$$k_x^D + k_y^D + k_z^D = k_{as}^2 \quad (4.23)$$

比较式4.22与2.71可得, CARS 信号依然满足傅立叶衍射定律, 可通过改变泵浦光或斯托克斯光照明方向实现对非线性极化率三维分布的重构。同时, 式4.22给出的 Ewald 球盖有了额外沿  $\Delta\mathbf{k}$  的平移。因此, CARS 情形下 Ewald 极限球的截止频率会有所提高, 可实现更高的分辨率。

### 4.3 基于光束传播的相干反斯托克斯拉曼散射层析成像的数值模拟

本文使用基于光束传播方法的非线性信号产生与传播算法<sup>[133]</sup> 对 CARS 散射过程进行了模拟。

#### 4.3.1 散射过程的相位匹配问题

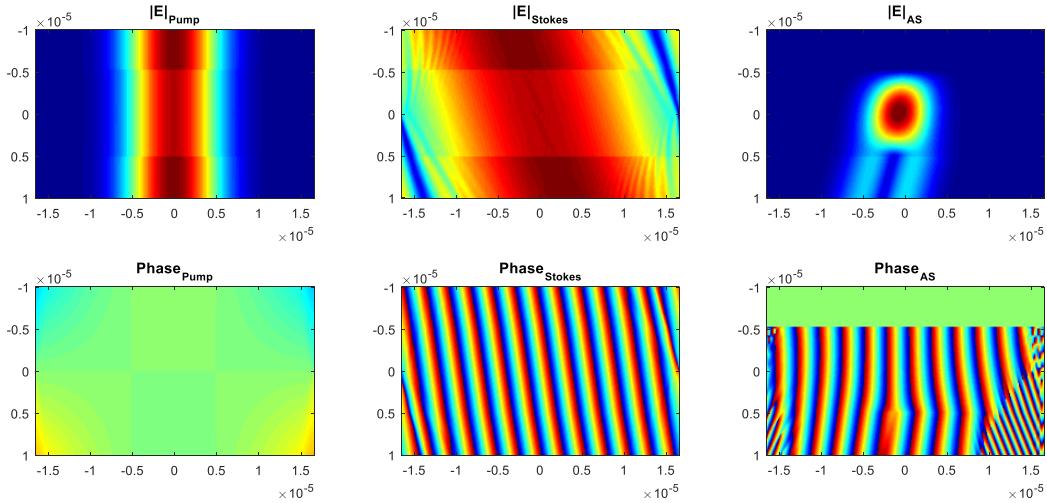


图 4.3 相位失配时均匀薄层样品产生的 CARS 信号

为验证算法的正确性, 首先模拟了相位失配情况下的  $10\text{ }\mu\text{m}$  厚薄层样品 (图4.3) 和直径  $6.5\text{ }\mu\text{m}$  的微球 (图4.4) 上产生的 CARS 信号。

在均匀分布的非线性材料中, 材料被均匀极化,  $\Delta\mathbf{k}$  引起的相位失配使得体块的总辐射场相干相消, 导致向远场辐射的总信号减弱。图4.3中, 由于相位失配, 且薄层样品厚度大于相干长度, 未能产生可传播的远场信号。而在非均匀结构中, 空间结构的

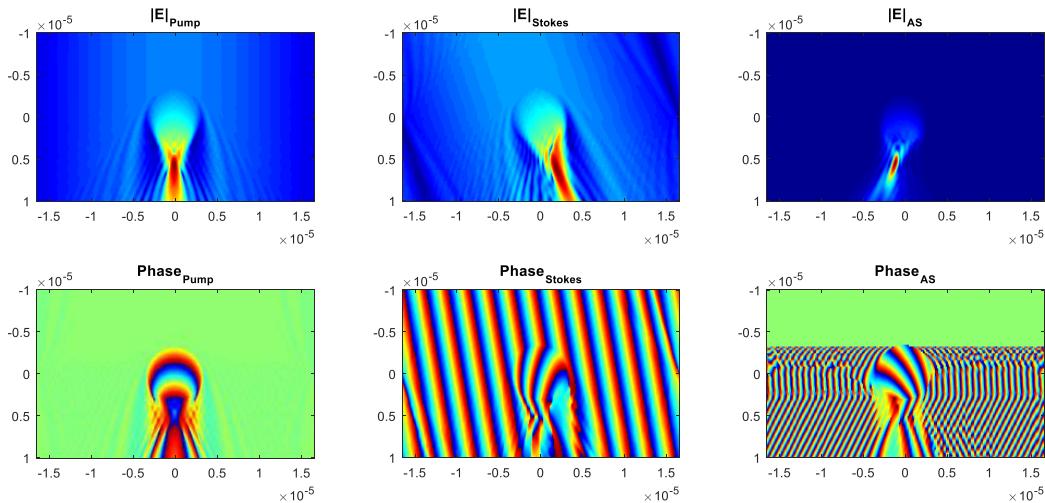


图 4.4 直径 $6.5 \mu\text{m}$ 微球产生的 CARS 信号

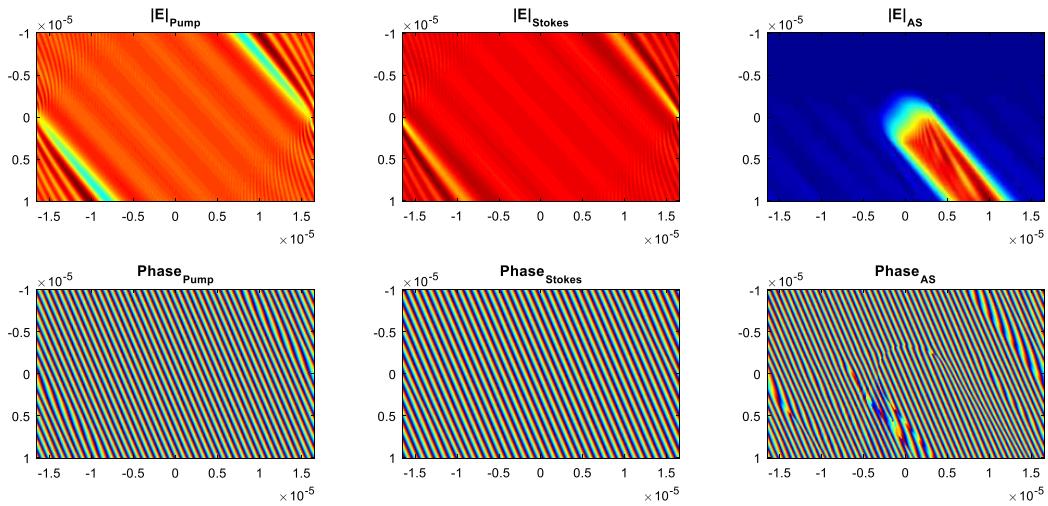
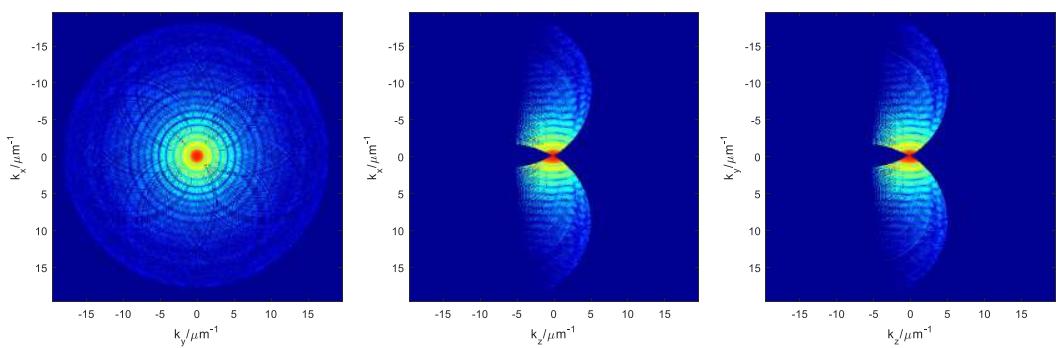
不均匀本身会导致局域极化场向四周辐射，因此，远场仍可收集到携带结构信息的散射场。在图4.4中，微球结构使得界面上发生 CARS 信号散射，这部分散射信号可被远场接收成像，其光场特别是相位中包含了微球的结构信息。因此，非均匀介质中通过调控相位失配实现更高分辨率是可行的。

但在微观角度看，过大的相位失配会导致相干长度内可累积信号的同相极化分子数量下降，从而使得信号变弱。因此，过大的相位失配不利于成像信噪比的提高。

### 4.3.2 基于数值模拟的 CARS 光学衍射层析

利用泵浦光和斯托克斯光不同照明角度下模拟产生的 CARS 散射信号，光学衍射层析算法可重构非线性极化率的三维分布。为避免泵浦光和斯托克斯光分离的非共线扫描引起的延时的变化，本模拟中使用了泵浦光和斯托克斯光共线传播的配置。两束光均与 z 轴成固定 $45^\circ$ 夹角，并相伴绕其旋转一周。模拟中使用泵浦光波长为 $1064 \text{ nm}$ ，斯托克斯光波长 $961 \text{ nm}$ ，拉曼共振峰在 $1001 \text{ cm}^{-1}$ 。其中样品为直径为 $6.5 \mu\text{m}$ ，线性折射率为 1.5735。浸润环境与微球折射率与其相同，以减少线性散射。对于三阶非线性极化率，根据式4.2，微球的非线性极化率实部设为 0，虚部设为 100。同时，模拟中为整个模拟区间加入了均值为 1 的非共振背景噪声，并仅存在于非线性极化率的实部。

图4.5所示为共线倾斜照明下产生的 CARS 信号。由于聚苯乙烯在泵浦光波长和斯托克斯光波长上的色散较小，相位失配很小，CARS 信号基本仍然沿原方向传播。旋转照明光方向，可得到 360 个不同角度的远场散射谱，按照式4.22及式4.23在频谱拼接可得如图4.6所示的三维频谱。相比线性光学衍射层析的频谱，由于没有透射光的干扰，散射频谱采样信噪比更高，频谱的干涉结构更为清晰。对其进行逆滤波可得到三阶非

图 4.5 直径 $6.5 \mu\text{m}$ 微球在共线倾斜照明下产生的 CARS 信号图 4.6 直径 $6.5 \mu\text{m}$ 微球 CARS 光学衍射层析的三维拼接频谱截面

线性极化率的三维分布，如图4.7所示。

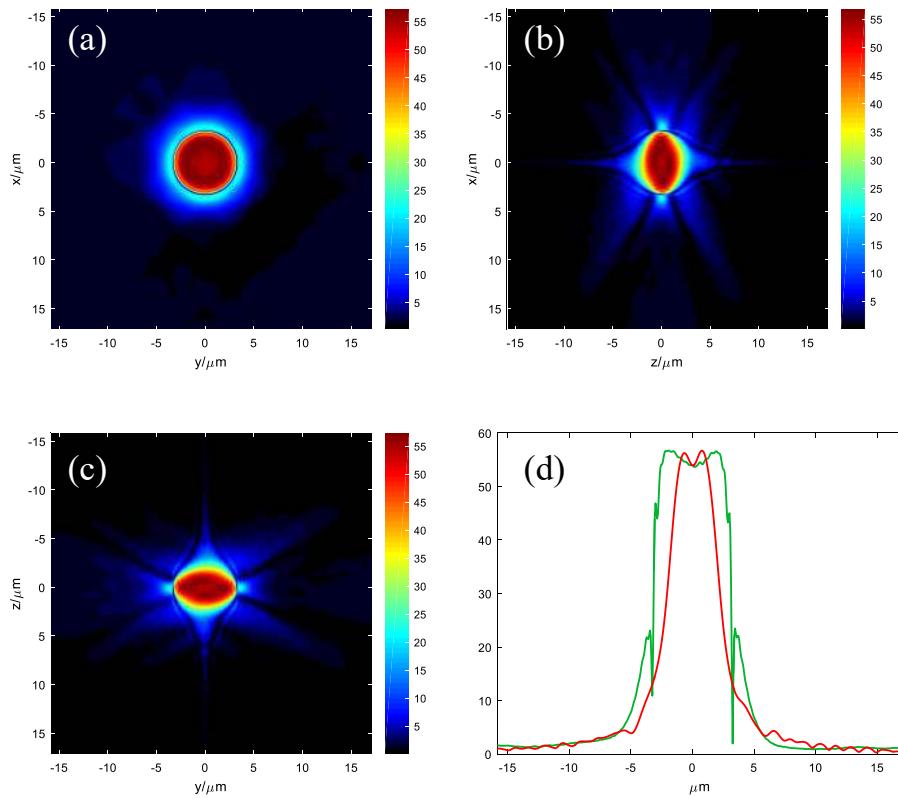


图 4.7 直径 $6.5\text{ }\mu\text{m}$ 微球 CARS 光学衍射层析所得  $|\chi^{(3)}|$  三维分布截面。(a) $z = 0$  截面; (b) $y = 0$  截面; (c) $x = 0$  截面; (d) 轴向(红色)和横向(绿色)的  $|\chi^{(3)}|$  曲线

## 4.4 本章小结

本章提出了利用相干反斯托克斯拉曼散射进行化学特异性光学衍射层析成像的新方法。推导 CARS 信号的光学衍射层析理论，并指出利用相位失配调控可获得更高频散射结构信息。使用基于光束传播方法的非线性信号产生，模拟了 CARS 信号在体块和非均匀散射样品上的产生过程，并证实结构散射信息可远场传播。进一步利用此算法模拟了共线 CARS 光学衍射层析，对微球样品的三阶非线性极化率进行了重构，证明其可行性。

CARS 光学衍射层析实验目前仍存在诸多困难。首先，由于拉曼散射截面限制，宽场成像中对脉冲能量要求远高于点扫描成像，过高的单脉冲能量限制了照明扫描和成像中物镜的数值孔径，仅可用单透镜进行成像，像差和色差无法得到有效控制。其次，过高的脉冲能量可能损伤生物样品，使其应用受限。最后，相位失配会进一步降低样品向远场辐射的信号强度，对相机的性能提出了更高要求。



## 第五章 双模态成像系统的生物学应用

细胞代谢是细胞内维持生命的化学反应的总称<sup>[134]</sup>。随着人类对构成生物体的关键生物大分子如核算、蛋白质逐步完成分离测序，对细胞内各种分子参与的代谢及其调控成为生物医学的研究重点。从热力学角度看，细胞实际上是一个典型耗散结构，通过与外界的物质和能量交换来而处于内部平衡。因此，参与能量代谢的细胞器如线粒体和脂滴、参与物质代谢的内质网、溶酶体以及细胞遗传和代谢调控中心细胞核等细胞器上的各种分子动力学过程是解密各种生理及药理现象的关键。

光学衍射层析-海森结构光照明荧光双模态成像系统同时提供了细胞内的细胞器的概览和特异性分子分布信息。其中，光学衍射层析提供了约 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ 范围内的高分辨三维动态成像能力，成像速度为 $0.82\text{ Hz}$ ；同时，结构光照明荧光可对特定深度的细胞进行特异性二维超分辨动态成像；光学衍射层析对应视场范围内双模态系统的成像速度为 $0.5\text{ Hz}$ 。本节展示了一系列细胞生物学研究，利用双模态成像系统首次全面展现了活细胞内各种细胞器的相互作用。

### 5.1 基于荧光共定位的高速细胞成像

作为细胞器间相互作用的枢纽，内质网是细胞内最重要的细胞器之一。然而，前人的各种光学衍射层析成像结果中一直未能有效解析单层膜结构的内质网动态<sup>[71,73,85]</sup>。由于线性光学衍射层析成像在时空分辨能力上的提升，本文在 COS-7 细胞的光学衍射层析图像中首次观察到了内质网微管的动态，并准确地与 KDEL-EGFP 标记的荧光成像结果相对应（图5.1 (a)）。对于光学衍射层析图像中出现的长条状并不断扭转的结构，通过线粒体标记 MitoTracker Green 的共定位数据确定其为线粒体（图5.1 (b)）。尽管光学衍射层析不能像结构光照明荧光图像那样解析线粒体的内部结构，无标记的光学衍射层析结果可以同时提供整个细胞器内所有线粒体的三维动态，其生物动力学信息远高于二维荧光成像。并且光学衍射层析模态无光毒性和光漂白效应对成像时间的限制<sup>[135]</sup>，可对活细胞进行长达小时级的三维连续成像（图3.15）。

光学衍射层析图像中明亮的囊泡结构则由在脂滴中聚集的染料 Lipidspot 488 的荧光共定位图像证实为脂滴（图5.1 (c)）。同时，光学衍射层析图像中较暗的囊泡则由用于标记酸性溶酶体的 Lysoview 488 的荧光共定位图像证实为晚期内体或溶酶体（图5.1 (d)）。

在细胞核附近，光学衍射层析图像中连续的膜状结构因与 laminA-EGFP 标记的荧

光图像共定位，被确认为核膜（图5.1 (e)）。核膜内的不规则状结构与 H2B-EGFP 标记的染色质共定位（图5.1 (f)）。在结构光照明荧光成像过程中，不可忽略的光毒性使得纺锤状分布的染色体在有丝分裂前期被阻断（图5.2）；这与只进行衍射层析成像拍摄到的完整有丝分裂过程（图3.15）形成鲜明对比。

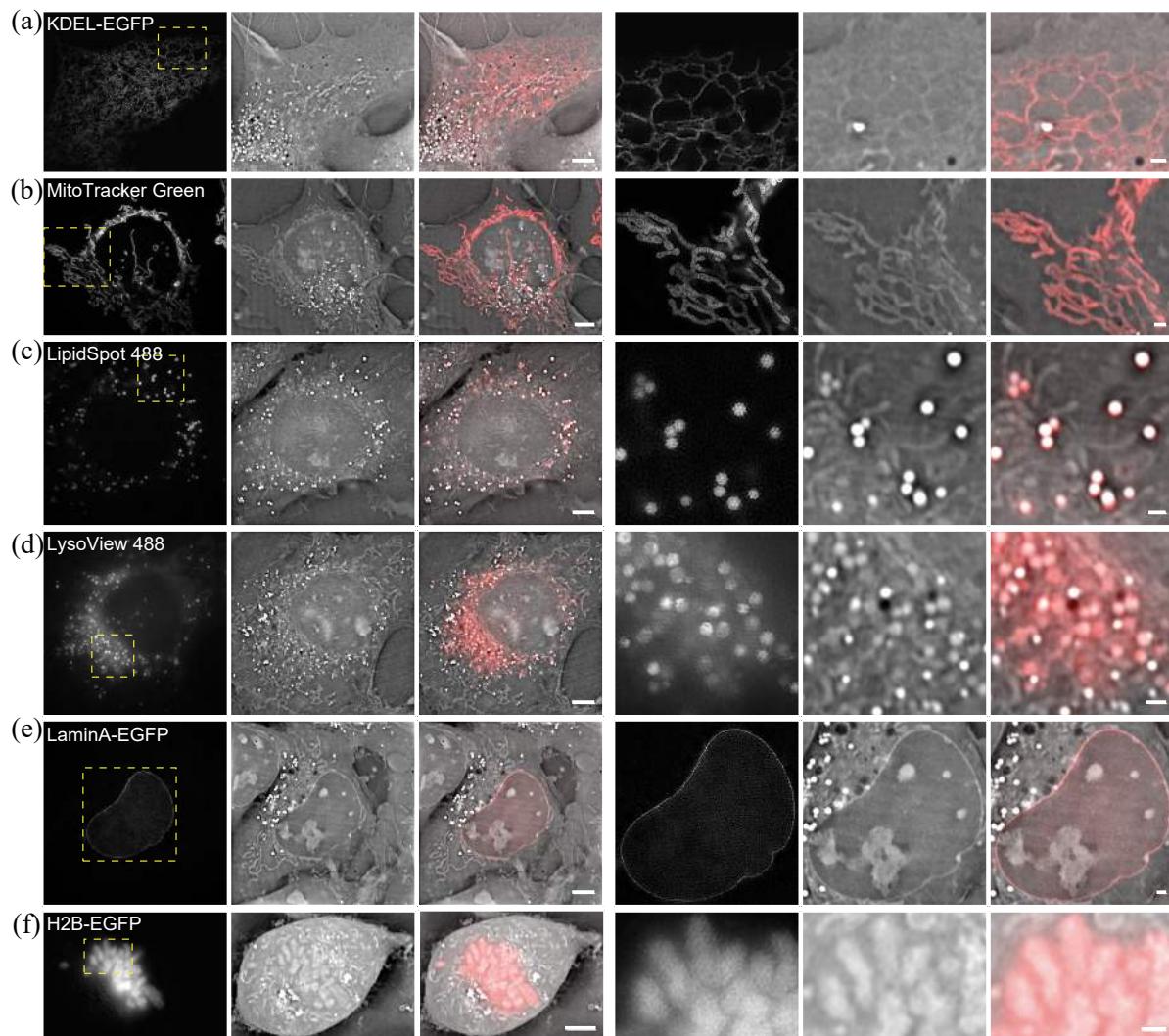


图 5.1 COS-7 活细胞中六种主要细胞器光学衍射层析-荧光共定位图像。左侧三列中，第一列为结构光照明荧光重构图像，第二列为光学衍射层析图像，第三列为双模态融合图像；右侧三列为第一列图像中黄色虚线框所示区域的放大图像。(a) 光学衍射层析图像中管状内质网与 KDEL-EGFP 标记的结构光照明荧光图像共定位结果；(b) 光学衍射层析图像中线粒体与 MitoTracker Green 标记的结构光照明荧光图像共定位结果；(c) 光学衍射层析图像中脂滴与 LipidSpot 488 标记的结构光照明荧光图像共定位结果；(d) 光学衍射层析图像中溶酶体与 LysoView 488 标记的结构光照明荧光图像共定位结果；(e) 光学衍射层析图像中核膜与 LaminA-EGFP 标记的结构光照明荧光图像共定位结果；(f) 光学衍射层析图像染色体与 H2B-EGFP 标记的结构光照明荧光图像共定位结果。比例尺：5 μm (左)，1 μm (右)

在标记了高尔基体、过氧化物酶体、吞噬体的双模态共定位图像中，光学衍射层析图像中没有明显结构能够与荧光图像相对应。其原因为这些细胞器未能与细胞胞浆产

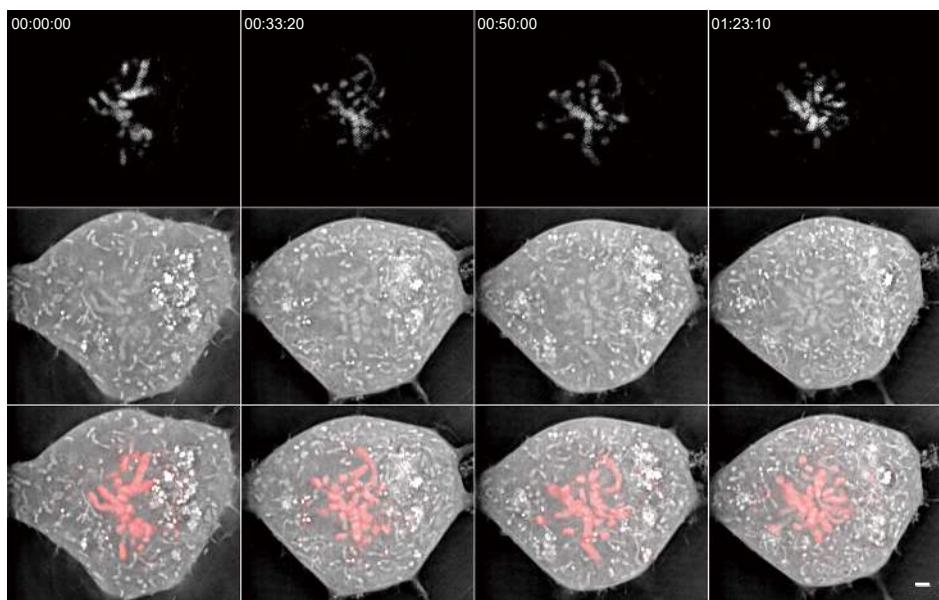


图 5.2 COS-7 细胞有丝分裂衍双模态荧光共定位图像。第一行为结构光照明荧光重构图像，第二行为光学衍射层析图像，第三行为双模态融合图像，四列分别为成像中四个时刻。比例尺：2 μm

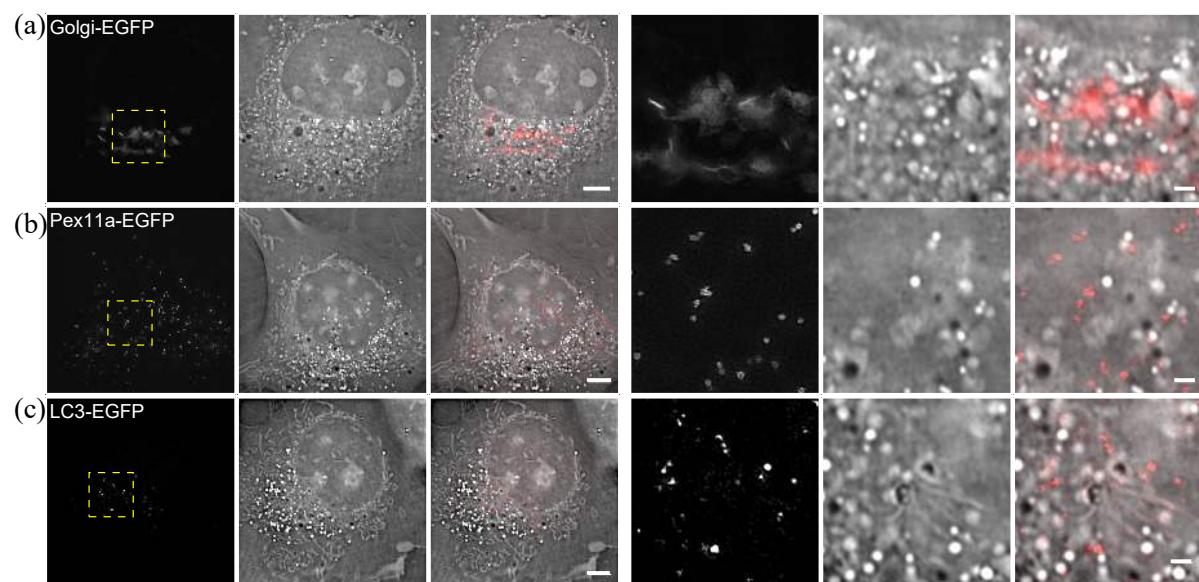


图 5.3 COS-7 活细胞中光学衍射层析无法解析的细胞器的光学衍射层析-荧光共定位图像。第一列为结构光照明荧光重构图像，第二列为光学衍射层析图像，第三列为双模态融合图像，右侧三列为第一列图像中黄色虚线框所示区域的放大图像。(a) Golgi-EGFP 标记高尔基体的结构光照明荧光图像共定位结果；(b) Pex11-EGFP 标记的过氧化物酶体的结构光照明荧光图像共定位结果；(c) LC3-EGFP 标记的吞噬体的结构光照明荧光图像共定位结果。比例尺：5 μm (左)，1 μm (右)

生较大的折射率差异。总之，加上图3.23 (a) 中的肌动蛋白微丝，共有内质网、线粒体、脂滴、溶酶体、核膜、染色体及肌动蛋白微丝七种主要细胞器可在光学衍射层析成像中被有效解析。这使得光学衍射层析成像可无需标记且免于光毒性限制地对这些细胞器进行高速连续成像。

## 5.2 光学衍射层析成像中低折射率囊泡的研究

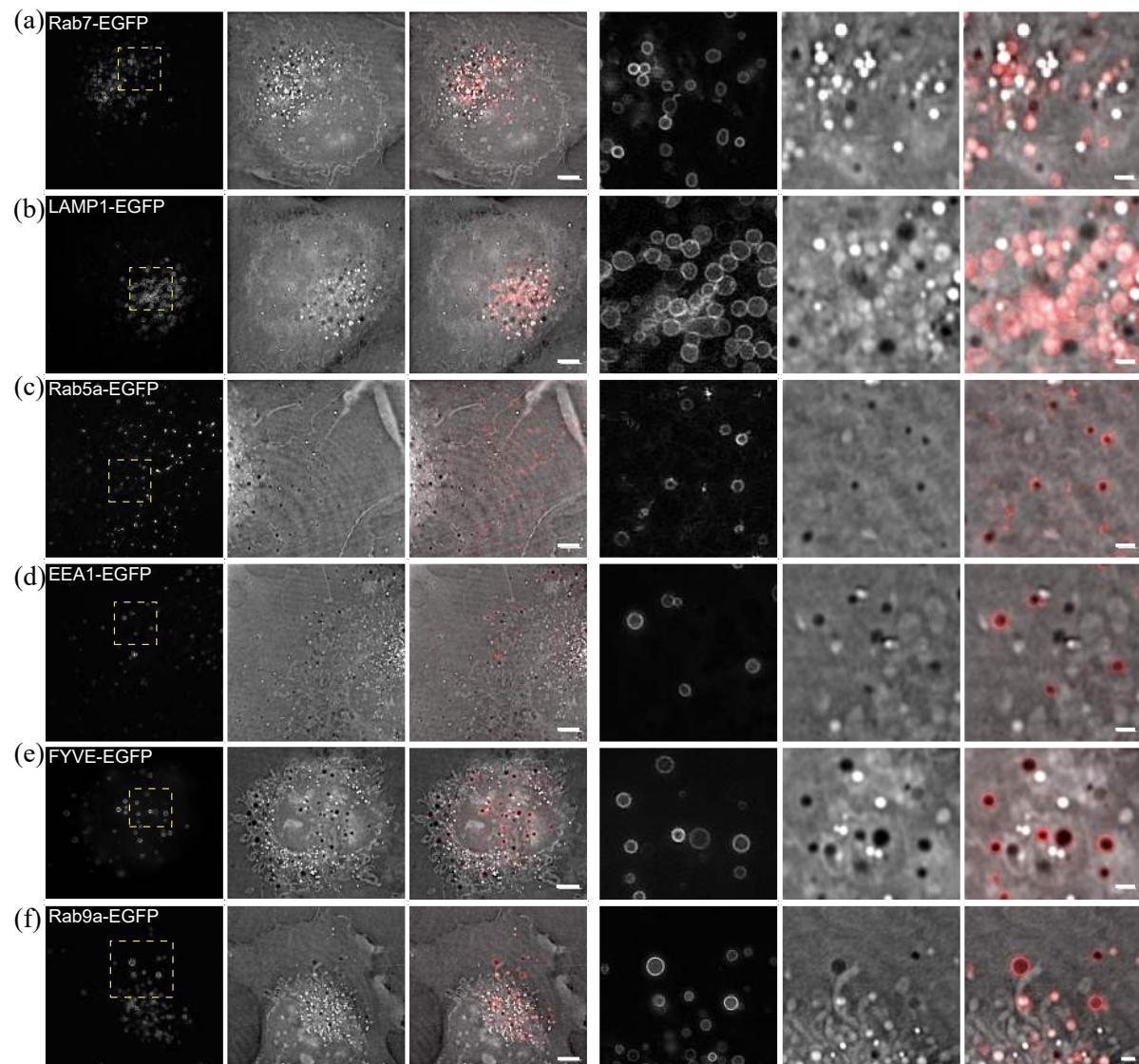


图 5.4 活的 COS-7 细胞光学衍射层析图像中出现的低折射率囊泡为一种新型的内体，其与 Rab7-EGFP 标记的溶酶体 (a) 及 LAMP1-EGFP 标记的晚期溶酶体 (b) 不共定位；其与 Rab5a-EGFP 标记的囊泡 (c)、EEA1-EGFP 标记的囊泡 (d)、FYVE-EGFP 标记的囊泡 (e) 及 Rab9a-EGFP 标记的囊泡 (f) 部分共定位。第一列为结构光照明荧光重构图像，第二列为光学衍射层析图像，第三列为双模态融合图像，右侧三列为第一列图像中黄色虚线框所示区域的放大图像。比例尺：5 μm (左)，1 μm (右)

除了以上传统细胞器，光学衍射层析图像中还可以观察到一种低折射率的囊泡结构，其折射率显著低于周围胞浆折射率。活细胞中一般可认为折射率与物质干重相关，这些囊泡结构与植物细胞或酵母菌中液泡类似<sup>[136,137]</sup>。然而，在动物细胞中观察到的这些囊泡明显尺寸小、数量多，且不被酸性荧光标记染料标记（图5.1 (d)）。显然，其为与植物细胞和酵母菌中液泡不同的一种细胞器。

为鉴定这种囊泡的作用，本文对不同外源表达荧光标记的细胞进行了双模态共定位成像。低折射率囊泡几乎不与晚期内体或溶酶体的标记如 Rab-7 或 LAMP1 共定位（图5.4 (a-b)），却显著地与 EEA1、Rab-5、FYVE 这些早期内体来源相关的标记物的荧光图像重叠（图5.4 (c-f)）<sup>[138]</sup>。同时，Rab-9a 标记的共定位表明低折射率囊泡可能参与到晚期内体到高尔基体网络的输运过程<sup>[139]</sup>。

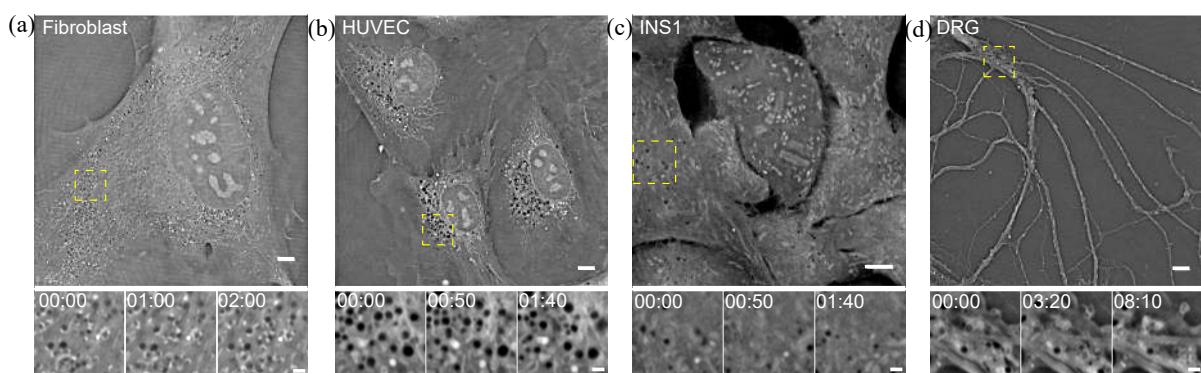


图 5.5 不同种类细胞光学衍射层析图像中出现的低折射率囊泡。(a) 人类成纤维细胞；(b) 人类脐静脉内皮细胞；(c) 大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞；(d) 小鼠背根神经节神经细胞。第二列为对应上方图像中黄色虚线框区域低折射率囊泡的运动图像。比例尺：5 μm (上)，1 μm (下)

这种低折射率囊泡在哺乳动物细胞中广泛存在：在人类成纤维细胞、人类脐静脉内皮细胞、大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞、小鼠背根神经节神经细胞及人类骨髓间质干细胞的光学衍射层析图像中均有出现（图5.5、图5.6）。不同种类细胞中低折射率囊泡的数量和形状略有不同，其中早衰表型的骨髓间质干细胞中低折射率囊泡的数量与对照组相比明显增多，表明其功能可能与维持细胞正常运转有关（图5.6）。

### 5.3 光学衍射层析成像中细胞器相互作用的研究

活细胞中细胞器之间的相互作用是信息和物质的交换、实现细胞功能和行为的基础<sup>[142,143]</sup>。从进化角度看，线粒体来自真核内膜系统，与内质网一样古老<sup>[144]</sup>。然而由于长时间荧光成像中的光毒性<sup>[135]</sup>，在对细胞器相互作用的研究中，相比以内质网为中心枢纽，鲜见以线粒体或其它细胞器为中心枢纽的相关研究。

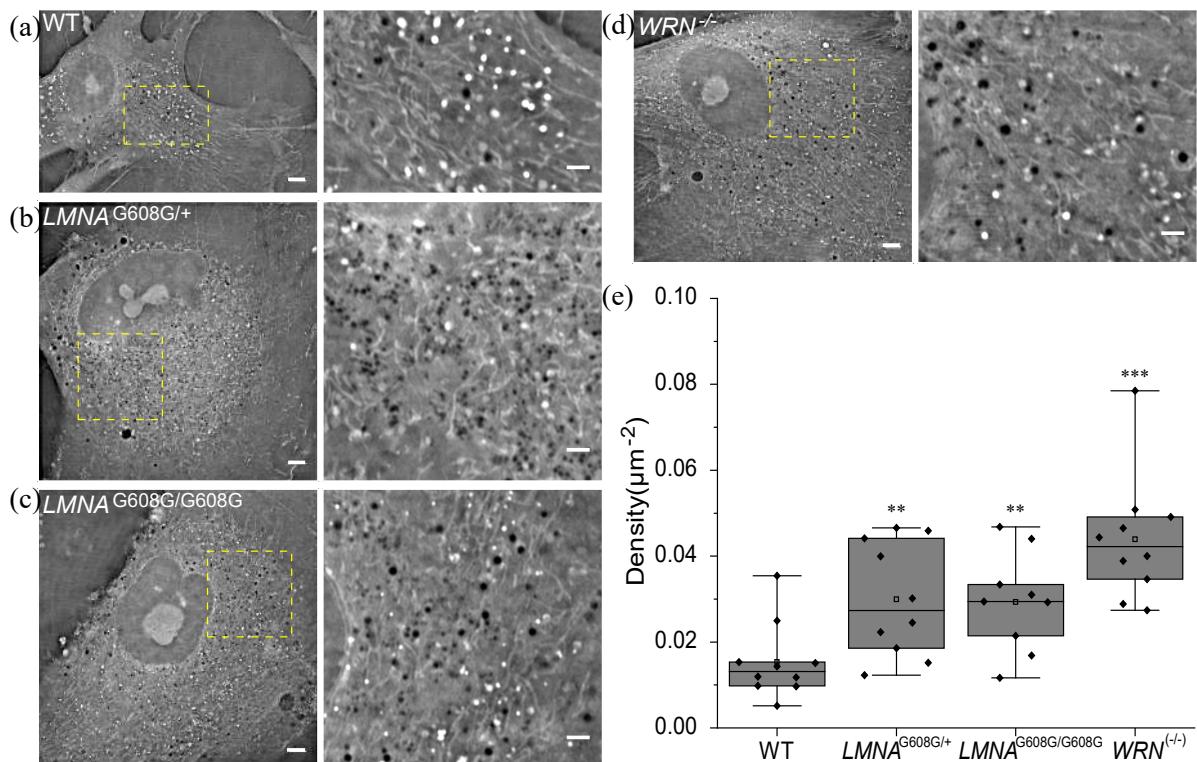


图 5.6 人类骨髓间质干细胞光学衍射层析图像及其中低折射率囊泡数目与其细胞衰老表型的相关性。其中 WT-hMSCs (野生型人类骨髓间质干细胞作为同基因对照组)、杂合子 (*LMNA*<sup>G608G/+</sup>) 及纯合子 (*LMNA*<sup>G608G/G608G</sup>) 的 HGPS-hMSCs 细胞组成 Hutchinson-Gilford 早衰综合症 (HGPS) 的对照模型，具有 *WRN* 缺陷 (*WRN*<sup>(-/-)</sup>) 的 WS-hMSCs 细胞作为 Werner 综合症 (WS) 的对照模型<sup>[140,141]</sup>。(a-d) 四种细胞的光学衍射层析图像。(e) 细胞中间层的低折射率囊泡分布密度统计。比例尺：左侧5 μm，右侧1 μm。Mann-Whitney 秩和检验：\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

通过在光学衍射层析模态对活细胞中线粒体动态的快速长时程成像，本文发现线粒体会在形状、位置、行为及功能上因与其他细胞器相互作用而发生改变。例如，相比胞浆中随机分布的线粒体，核膜附近的线粒体长度更长，形状更为均匀（图5.7 (a)）。图中，与细胞核相关的线粒体沿细胞核排布，且随核膜一起变化形状。这种局域的线粒体可能辅助了核内的一些重要过程如 mRNA 向核外的运输过程等<sup>[145,146]</sup>。

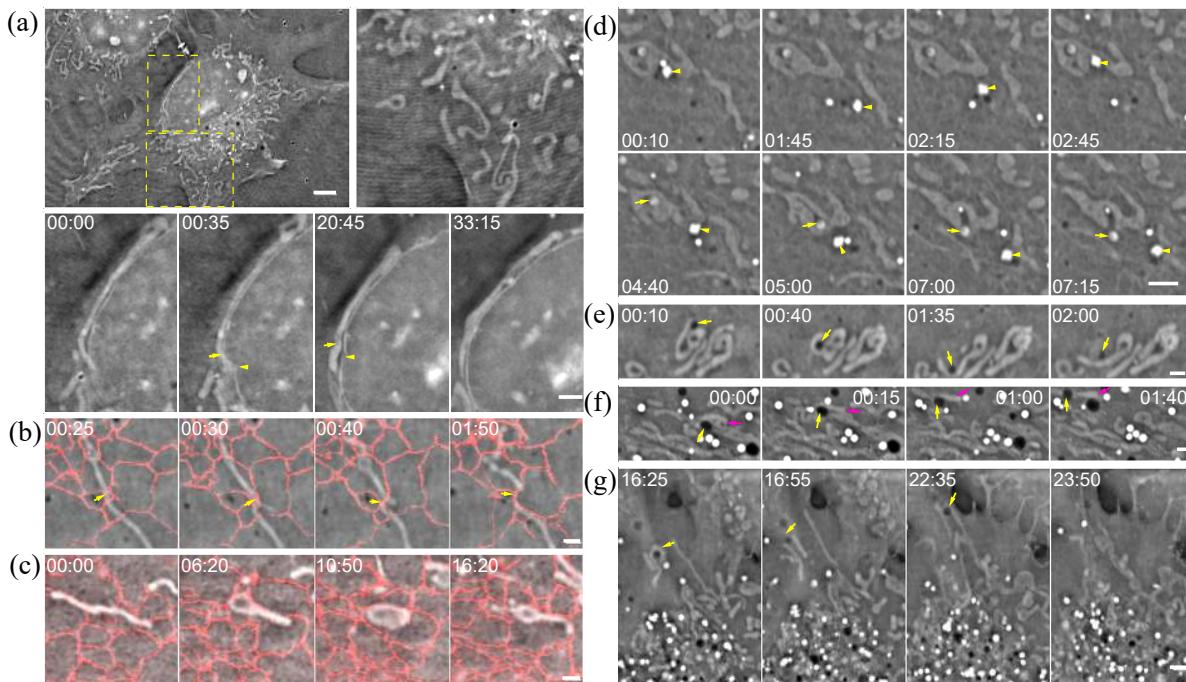


图 5.7 COS-7 细胞中线粒体与其他细胞器的相互作用。(a) 核膜与线粒体保持接触并在半小时的成像中关联互动；(b-c) 内质网与线粒体接触并导致线粒体断开(b) 或横向扩展(c)；(d) 线粒体与脂滴相互作用及由与溶酶体接触导致的线粒体分裂；(e-g) 不同模式的线粒体与低折射率囊泡间的相互作用，接触导致线粒体改变形状(e)、随低折射率囊泡移动(f) 或发生分裂(g)。比例尺：5 μm (a), 2 μm (a, zoom in), 1 μm (b,c,e,f), 2 μm (d,g)

线粒体与内质网的相互作用机制明显不同，虽然内质网有着与核膜类似的膜结构。图5.7 (b) 内质网导致线粒体断开的现象，与文献报道相符<sup>[144,147,148]</sup>。另外，还可观察到内质网从两侧拉扯线粒体导致其横向扩展的新现象（图5.7 (c)）。

脂滴也与细胞内的能量传递过程有关，有一系列关于其与线粒体相互作用的报道<sup>[149,150]</sup>，然而我们未能在分裂间期的 COS-7 细胞内观察到脂滴和线粒体的长时接触。脂滴与线粒体接触后，很快被推离线粒体，同时两者形态上均无明显变化；与之相对，溶酶体与线粒体的接触则会导致线粒体发生分裂（图5.7 (d)）。这与最近对溶酶体作用于线粒体分裂的报道相符<sup>[151]</sup>。

低折射率囊泡也与多种细胞器相互作用。其与线粒体接触后可观察到线粒体的形状改变（图5.7 (e)）或分裂（图5.7 (g)）。在某些情况下，低折射率囊泡也存在拖拽线粒

体随之移动（图5.7 (f)）的行为。

虽然以上相互作用的具体过程与相应代谢功能还待研究，但这些相互作用足以表明线粒体在细胞新陈代谢过程中为各种不同细胞器提供能量的重要作用。相比荧光成像，光学衍射层析成像更适合对这些相互作用过程进行无标记的快速长时程观察，有助于更全面的研究细胞代谢过程。

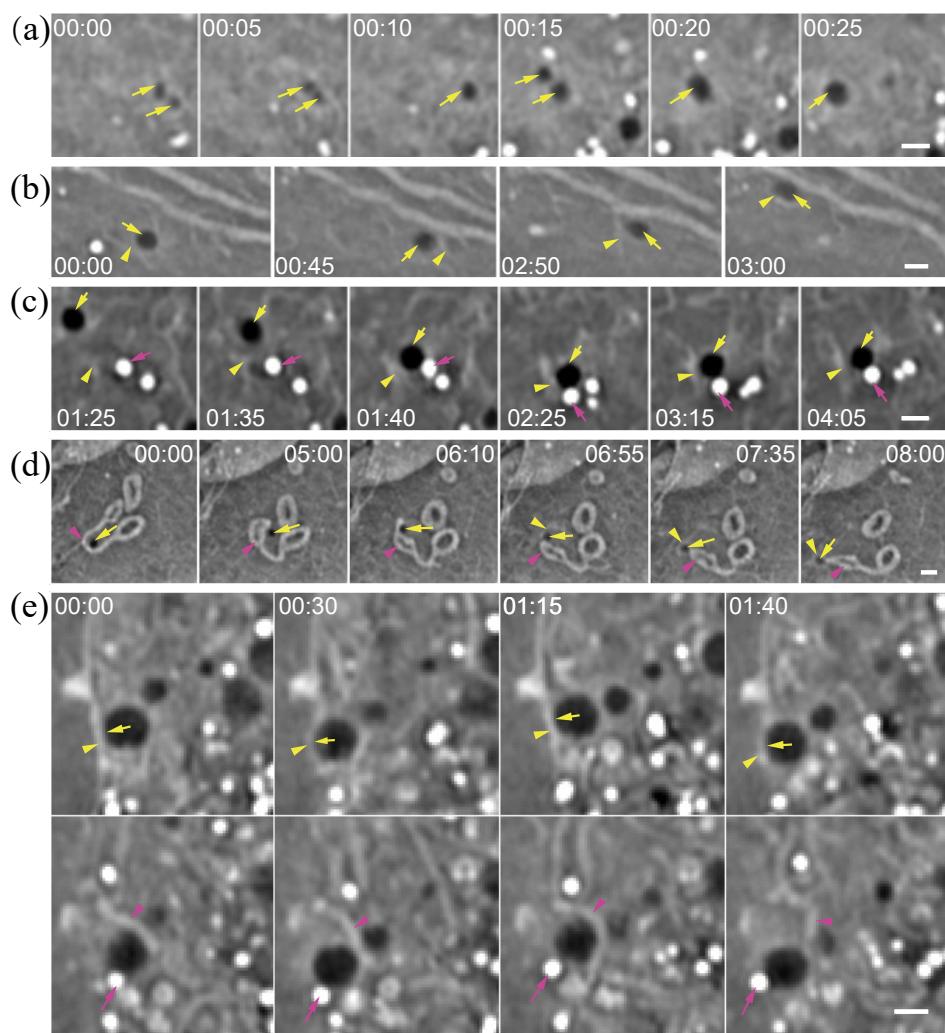


图 5.8 低折射率囊泡在 COS-7 细胞内组织细胞器间的相互作用。(a) 两低折射率囊破融合过程; (b) 内质网与低折射率囊泡相互接触; (c) 低折射率囊泡内质网、脂滴同时形成接触; (d) 低折射率囊泡、线粒体和内质网的同时接触; (e) 同一低折射率囊泡在某一深度与核膜相互作用（上侧图像），同时在另一深度（下侧图像）中与脂滴及线粒体相互作用。比例尺：1 μm

除了与线粒体，低折射率囊泡也会与其他细胞器发生相互作用。如两低折射率囊泡的融合（图5.8 (a)）、与内质网的相互作用（图5.8 (b)）。事实上，内质网通常是低折射率囊泡和其它细胞器间相互作用的桥梁。例如，低折射率囊泡和脂滴分别从两侧接触内质网，三者接触超过2 min（图5.8 (c)）；内质网携带低折射率囊泡与线粒体接触超

过1 min (图5.8 (d))。低折射率囊泡也可单独与其它多种细胞器相互作用：如图5.8 (e)中，低折射率囊泡在某一深度与核膜相互接触的同时，在另一个深度与脂滴和线粒体相互作用。以上现象都说明了低折射率囊泡及内质网在细胞内的枢纽性作用。双模态成像系统为观察以上新现象提供了有力支持。

## 5.4 本章小结

在双模态成像系统中，光学衍射层析成像具有优异的分辨能力，且无光毒性的限制，因而可以长时间、全面地记录细胞内各种细胞器间的三维相互作用动态；荧光成像模态可提供分子层面的化学特异性分辨能力，因此成为鉴别无标记成像模态成像结果的重要依据。利用光学衍射层析-结构光照明荧光双模态成像系统，本章开展了一系列的活细胞成像研究。

首先，首次进行了基于荧光共定位的高速细胞成像，对多种细胞器的光学衍射层析图像进行了鉴别。细胞内有七种主要细胞器被证明可被光学衍射层析成像模态解析。当荧光模态产生的光毒性影响细胞分裂过程时，光学衍射层析成像结果中未见明显异常。

其次，在光学衍射层析-荧光共定位成像的基础上对细胞中低折射率囊泡进行了一系列生化表征，明确了其在细胞内的角色与功能。多种荧光标记染料的共定位成像结果表明，低折射率囊泡可能参与晚期内体到高尔基体网络的输运过程，为一种未报道过的新型内体。人类骨髓间质干细胞的光学衍射层析成像结果表明，细胞内这种新型内体数量与细胞衰老过程显著相关。

最后，通过双模态成像系统观察了一系列的细胞器相互作用。相比传统在荧光模态中对细胞器相互作用过程的观察统计，光学衍射层析模态由于其三维成像能力而能更加全面的反映细胞代谢过程。而且其免于荧光标记物光毒性的限制，可快速、长时程的观察细胞代谢的过程。



# 第六章 结论及展望

## 6.1 全文结论

本文以发展无标记三维显微成像技术为背景，针对光学衍射层析显微成像技术及其应用进行了以下几个方面的研究：

1. 提出带复解卷积的光学衍射层析重构算法，并首次实现了一种适合高速光学衍射层析成像的快速衍射层析重构程序，数据处理速度可达约10 s/组。虽然距离三维数据的实时处理与显示仍有一定差距<sup>[86]</sup>，但此程序在实际成像中能有效解决成像系统波动及偶发异常引起的重构异常，有较高的容错性和鲁棒性。这一衍射层析重构程序保证了生物细胞成像中长时间、高通量的衍射层析数据的及时处理，为光学衍射层析在生物医学领域的进一步应用铺平了道路。
2. 搭建了高速线性光学衍射层析成像系统，在 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ 的视场范围内实现了0.82 Hz的三维成像。通过对生物细胞及微纳结构的成像结果验证了其三维成像能力、无标记成像能力以及快速长时程成像能力。相比前人使用的1000 fps相机<sup>[152]</sup>，本文使用的200 fps虽然在帧率上受限，但无数据传输和存储瓶颈的限制，可连续不间断成像；不间断成像速度也高于最近的相关工作<sup>[86]</sup>。同时，本文实现的线性光学衍射层析系统具有很高的成像质量，有效解析了在最近的相关工作中仍被认为无法被光学衍射层析成像的内质网结构<sup>[153]</sup>。
3. 搭建了光学衍射层析-结构光照明荧光双模态显微成像系统，可以0.5 Hz的速度对 $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$ 的视场范围同时进行无标记光学衍射层析三维成像和超分辨荧光二维成像。光学衍射层析模态横向分辨率达200 nm，纵向分辨率达560 nm，结构光荧光模态横向分辨率达100 nm。相比最近类似工作中仅对固定细胞成像<sup>[153]</sup>或荧光超分辨成像质量受限<sup>[154]</sup>，本文的双模态成像系统充分弥合了光学衍射层析成像和结构光照明荧光成像短板，可对活细胞进行全面、快速、长时程的细胞代谢研究。
4. 为实现具有化学特异性成像能力的无标记成像，提出了基于相干反斯托克斯拉曼散射的光学衍射层析方法。通过对相干反斯托克斯拉曼散射光学衍射层析理论的推导，指出了通过相位失配调控获得更高分辨率的方法。模拟了共线配置的相干反斯托克斯拉曼散射光学衍射层析，有效恢复了携带拉曼信息的三阶非线性系数的三维分布，实现了化学特异性三维成像。
5. 利用双模态成像系统进行了一系列的细胞生物学成像研究。首次全面鉴别了光

学衍射层析图像中的多种细胞器。首次发现了低折射率囊泡这种新型内体的存在，表征了其生化功能，研究了其与细胞衰老的关系。首次对细胞内各主要细胞器之间的相互作用进行三维无标记的观察，并报道了一些新的相互作用过程。

## 6.2 未来工作展望

本文利用光学衍射层析显微已成功实现了活细胞的无标记、快速、长时程成像。为进一步扩展光学衍射层析在生物学研究中的应用，可对未来工作作出以下展望：

1. 进一步提高成像速度。相比荧光成像中光子数目受限的情况，光学衍射层析由于直接测量激光散射场，有更大的光子通量。因此，可进一步利用高速相机实现更快的数据采集速度，以对一些快速的生物过程如花粉管生长（图3.16）、胚胎发育（图3.17）进行成像。同时，利用更加适合用于全息相位成像的高满阱高速CMOS相机，利用更多光子计数提高信噪比，降低衍射层析成像所需数据量。
2. 进一步提高数据处理速度。目前光学衍射层析数据重构虽已达高速，但仍非实时处理，使用图形处理器（GPU）可进一步加速。另外，还可进一步将数据处理流程固化为专用集成电路（ASIC）以实现实时数据采集、处理、压缩及存储的完整流程。
3. 发展反射式光学衍射层析显微技术。相比目前的透射式架构，反射式成像时可免去复杂的物镜对准步骤，并有利于实现在体（*in vivo*）的生物成像，具有更高的应用价值。同时利用反射情形下偏振变化更为显著的特性，可实现对散射结构取向信息的三维成像。通过利用涡旋波片调控照明光场偏振，同时利用正交方向离轴全息实现正交偏振方向散射场的测量，可实现快速的反射式衍射层析成像。
4. 发展具有化学特异性的光学衍射层析成像技术。
  - (a) 受限于实验条件，基于相干反斯托克斯拉曼散射的光学衍射层析较难在皮秒光源上实现。若使用峰值功率更高的飞秒光源，通过等量啁啾泵浦光和斯托克斯光，可实现窄线宽的拉曼激发，有望解决信号强度受限的问题。
  - (b) 通常，分子振转能级的红外共振吸收截面（约  $10^{-22} \text{ cm}^2 \text{sr}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ）要比其拉曼散射截面（约  $10^{-31} \text{ cm}^2 \text{sr}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ）高出约 9 个数量级。因此使用红外共振吸收引起的光热效应也可实现化学特异性成像。同时，通过可见波段的探测光可突破红外波长的衍射极限，实现具有化学选择性的高分辨率成像<sup>[155,156]</sup>。光热效应引起的化学特异性折射率变化还可利用宽场相位成像进行探测<sup>[157]</sup>。因此发展基于光热效应的衍射层析也是实现

化学特异性三维成像的一种新方法。



## 参考文献

- [1] D Evanko, A Heinrichs and CK Rosenthal. “*Milestones in Optical Microscopy*” [J/OL]. *Nat. Cell Biol.*, **2009**, 11: S6–S22. [^1, 4]
- [2] Stefan W Hell. “*Far-field optical nanoscopy*” [J/OL]. *science*, **2017**, 316(5828): 1153–1158. [^1]
- [3] Simon Henry Gage. “*Modern dark-field microscopy and the history of its development*” [J/OL]. *Transactions of the American Microscopical Society*, **1920**, 39(2): 95–141. [^2]
- [4] M Wolman and FH Kasten. “*Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin*” [J/OL]. *Histochemistry*, **1986**, 85(1): 41–49. [^3]
- [5] Frits Zernike. “*Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II*” [J/OL]. *Physica*, **1942**, 9(10): 974–986. [^3]
- [6] RD Allen and GB David. “*The Zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy*” [J/OL]. *Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, **1969**, 69(4): 193–221. [^3]
- [7] Daniel Axelrod. “*Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence.*” [J/OL]. *The Journal of cell biology*, **1981**, 89(1): 141–145. [^3]
- [8] Winfried Denk, James H Strickler and Watt W Webb. “*Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*” [J/OL]. *Science*, **1990**, 248(4951): 73–76. [^3]
- [9] Martin Chalfie, Yuan Tu, Ghia Euskirchen *et al.* “*Green fluorescent protein as a marker for gene expression*” [J/OL]. *Science*, **1994**, 263(5148): 802–805. [^3]
- [10] Nathan C Shaner, Robert E Campbell, Paul A Steinbach *et al.* “*Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*” [J/OL]. *Nature biotechnology*, **2004**, 22(12): 1567. [^3]
- [11] Eric Betzig and Robert J Chichester. “*Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy*” [J/OL]. *Science*, **1993**, 262(5138): 1422–1425. [^3]
- [12] H Peter Lu, Luying Xun and X Sunney Xie. “*Single-molecule enzymatic dynamics*” [J/OL]. *Science*, **1998**, 282(5395): 1877–1882. [^3]
- [13] Robert M Dickson, Andrew B Cubitt, Roger Y Tsien *et al.* “*On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein*” [J/OL]. *Nature*, **1997**, 388(6640): 355. [^3]
- [14] Thomas A Klar, Stefan Jakobs, Marcus Dyba *et al.* “*Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*” [J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**, 97(15): 8206–8210. [^3]
- [15] Ulrike Böhm, Stefan W Hell and Roman Schmidt. “*4Pi-RESOLFT nanoscopy*” [J/OL]. *Nature communications*, **2016**, 7: 10504. [^3]
- [16] Eric Betzig, George H Patterson, Rachid Sougrat *et al.* “*Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*” [J/OL]. *Science*, **2006**, 313(5793): 1642–1645. [^4]

- [17] Samuel T Hess, Thanu PK Girirajan and Michael D Mason. “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy” [J/OL]. *Biophysical journal*, **2006**, 91(11): 4258–4272. [^4]
- [18] Michael J Rust, Mark Bates and Xiaowei Zhuang. “Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution” [J/OL]. *Nature methods*, **2006**, 3(10): 793. [^4]
- [19] Xiyi Chen, Oleg Nadiarynkha, Sergey Plotnikov et al. “Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure” [J/OL]. *Nature protocols*, **2012**, 7(4): 654. [^4]
- [20] Jeff A Squier, Michiel Müller, GJ Brakenhoff et al. “Third harmonic generation microscopy” [J/OL]. *Optics express*, **1998**, 3(9): 315–324. [^4]
- [21] Conor L Evans and X Sunney Xie. “Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine” [J/OL]. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1: 883–909. [^4]
- [22] Christian W Freudiger, Wei Min, Brian G Saar et al. “Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy” [J/OL]. *Science*, **2008**, 322(5909): 1857–1861. [^4]
- [23] Arne H Voie, DH Burns and FA Spelman. “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens” [J/OL]. *Journal of microscopy*, **1993**, 170(3): 229–236. [^4]
- [24] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene et al. “Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy” [J/OL]. *Science*, **2004**, 305(5686): 1007–1009. [^5]
- [25] JG White, WB Amos and M Fordham. “An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy.” [J/OL]. *The Journal of cell biology*, **1987**, 105(1): 41–48. [^5]
- [26] CJR Sheppard and T Wilson. “The theory of the direct-view confocal microscope” [J/OL]. *Journal of microscopy*, **1981**, 124(2): 107–117. [^5]
- [27] Lord Rayleigh. “XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope” [J/OL]. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **1896**, 42(255): 167–195. [^5]
- [28] Nicholas G Horton, Ke Wang, Demirhan Kobat et al. “In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain” [J/OL]. *Nature photonics*, **2013**, 7(3): 205. [^6]
- [29] Na Ji, Daniel E Milkie and Eric Betzig. “Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues” [J/OL]. *Nature methods*, **2009**, 7(2): 141. [^6]
- [30] Tsung-li Liu, Srigokul Upadhyayula, Daniel E Milkie et al. “Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms” [J/OL]. *Science*, **2018**, 360(6386): eaaq1392. [^6]
- [31] Vasilis Ntziachristos, Jorge Ripoll, Lihong V Wang et al. “Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging” [J/OL]. *Nature biotechnology*, **2005**, 23(3): 313. [^6]
- [32] Junjie Yao, Lidai Wang, Joon-Mo Yang et al. “High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action” [J/OL]. *Nature methods*, **2015**, 12(5): 407. [^6]

- 
- [33] Xiao Xu, Honglin Liu and Lihong V Wang. “Time-reversed ultrasonically encoded optical focusing into scattering media” [J/OL]. *Nature photonics*, **2011**, 5(3): 154. [^ 6]
  - [34] Jacopo Bertolotti, Elbert G Van Putten, Christian Blum *et al.* “Non-invasive imaging through opaque scattering layers” [J/OL]. *Nature*, **2012**, 491(7423): 232. [^ 6]
  - [35] Nicolas C Pégard, Hsiou-Yuan Liu, Nick Antipa *et al.* “Compressive light-field microscopy for 3D neural activity recording” [J/OL]. *Optica*, **2016**, 3(5): 517–524. [^ 6]
  - [36] MA Fiddy. “Inversion of optical scattered field data” [J/OL]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **1986**, 19(3): 301. [^ 7]
  - [37] Herbert A Hauptman. “The phase problem of x-ray crystallography” [J/OL]. *Reports on Progress in Physics*, **1991**, 54(11): 1427. [^ 7]
  - [38] James R Fienup. “Reconstruction of a complex-valued object from the modulus of its Fourier transform using a support constraint”. *JOSA A*, **1987**, 4(1): 118–123. [^ 7]
  - [39] Ralph W Gerchberg. “A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures” [J/OL]. *Optik*, **1972**, 35: 237–246. [^ 7]
  - [40] Norbert Streibl. “Phase imaging by the transport equation of intensity” [J/OL]. *Optics communications*, **1984**, 49(1): 6–10. [^ 7]
  - [41] Dennis Gabor. *A new microscopic principle* [J/OL]. Nature Publishing Group, **1948**. [^ 7]
  - [42] Emmett N Leith and Juris Upatnieks. “Reconstructed wavefronts and communication theory” [J/OL]. *JOSA*, **1962**, 52(10): 1123–1130. [^ 7]
  - [43] Yuri N Denisyuk. “On the reflection of optical properties of an object in a wave field of light scattered by it” [J/OL]. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **1962**, 144(6): 1275–1278. [^ 7]
  - [44] Ulf Schnars and Werner PO Jüptner. “Digital recording and reconstruction of holograms in hologram interferometry and shearography” [J/OL]. *Applied optics*, **1994**, 33(20): 4373–4377. [^ 7]
  - [45] Ulf Schnars and Werner Jüptner. “Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction” [J/OL]. *Applied optics*, **1994**, 33(2): 179–181. [^ 7]
  - [46] James C Wyant. “Interferometric optical metrology: basic principles and new systems” [J/OL]. *Laser Focus*, **1982**, 18(5): 65–71. [^ 11]
  - [47] P Carré. “Installation et utilisation du comparateur photoélectrique et interférentiel du Bureau International des Poids et Mesures” [J/OL]. *Metrologia*, **1966**, 2(1): 13. [^ 11]
  - [48] David Huang, Eric A Swanson, Charles P Lin *et al.* “Optical coherence tomography” [J/OL]. *science*, **1991**, 254(5035): 1178–1181. [^ 12]
  - [49] Joseph A Izatt, Manish D Kulkarni, Siavash Yazdanfar *et al.* “In vivo bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography” [J/OL]. *Optics letters*, **1997**, 22(18): 1439–1441. [^ 12]
  - [50] David Paganin and Keith A Nugent. “Noninterferometric phase imaging with partially coherent light” [J/OL]. *Physical review letters*, **1998**, 80(12): 2586. [^ 12]
  - [51] Etienne Cuche, Frederic Bevilacqua and Christian Depeursinge. “Digital holography for quantitative phase-contrast imaging” [J/OL]. *Optics letters*, **1999**, 24(5): 291–293. [^ 12]

- [52] Graham A Dunn and Daniel Zicha. “*Dynamics of fibroblast spreading*” [J/OL]. *Journal of Cell Science*, **1995**, 108(3): 1239–1249. [^ 12]
- [53] Ichiro Yamaguchi and Tong Zhang. “*Phase-shifting digital holography*” [J/OL]. *Optics letters*, **1997**, 22(16): 1268–1270. [^ 12]
- [54] Christopher Fang-Yen, Seungeun Oh, Yongkeun Park *et al.* “*Imaging voltage-dependent cell motions with heterodyne Mach-Zehnder phase microscopy*” [J/OL]. *Optics letters*, **2007**, 32(11): 1572–1574. [^ 12]
- [55] Alon Greenbaum, Yibo Zhang, Alborz Feizi *et al.* “*Wide-field computational imaging of pathology slides using lens-free on-chip microscopy*” [J/OL]. *Science translational medicine*, **2014**, 6(267): 267ra175–267ra175. [^ 12]
- [56] Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Catherine Best *et al.* “*Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy*” [J/OL]. *Journal of biomedical optics*, **2005**, 10(6): 060503. [^ 12]
- [57] Gabriel Popescu, Kamran Badizadegan, Ramachandra R Dasari *et al.* “*Observation of dynamic subdomains in red blood cells*” [J/OL]. *Journal of Biomedical Optics*, **2006**, 11(4): 040503. [^ 12]
- [58] Niyom Lue, Joerg Bewersdorf, Mark D Lessard *et al.* “*Tissue refractometry using Hilbert phase microscopy*” [J/OL]. *Optics letters*, **2007**, 32(24): 3522–3524. [^ 12]
- [59] Emil Wolf. “*Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data*” [J/OL]. *Optics Communications*, **1969**, 1(4): 153–156. [^ 12, 28]
- [60] S Kawata, O Nakamura and S Minami. “*Optical microscope tomography. I. Support constraint*” [J/OL]. *JOSA A*, **1987**, 4(1): 292–297. [^ 13]
- [61] James Sharpe, Ulf Ahlgren, Paul Perry *et al.* “*Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies*” [J/OL]. *Science*, **2002**, 296(5567): 541–545. [^ 13]
- [62] Vincent Lauer. “*New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope*” [J/OL]. *Journal of Microscopy*, **2002**, 205(2): 165–176. [^ 13, 14, 17, 18]
- [63] Florian Charrière, Anca Marian, Frédéric Montfort *et al.* “*Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy*” [J/OL]. *Optics letters*, **2006**, 31(2): 178–180. [^ 13, 17]
- [64] Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan *et al.* “*Tomographic phase microscopy*” [J/OL]. *Nature methods*, **2007**, 4(9): 717. [^ 13, 14]
- [65] Matthieu Debailleul, Vincent Georges, Bertrand Simon *et al.* “*High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples*” [J/OL]. *Optics letters*, **2009**, 34(1): 79–81. [^ 13, 18]
- [66] Yongjin Sung, Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen *et al.* “*Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging*” [J/OL]. *Optics express*, **2009**, 17(1): 266–277. [^ 13, 14, 17, 18, 27, 32]
- [67] Yongjin Sung, Wonshik Choi, Niyom Lue *et al.* “*Stain-free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy*” [J/OL]. *PloS one*, **2012**, 7(11): e49502. [^ 14]

- [68] Kyoohyun Kim, HyeOk Yoon, Monica Diez-Silva *et al.* “High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *in situ* hemozoin crystals using optical diffraction tomography” [J/OL]. *Journal of biomedical optics*, **2013**, 19(1): 011005. [^ 14, 18]
- [69] Kyoohyun Kim, Kyung Sang Kim, HyunJoo Park *et al.* “Real-time visualization of 3-D dynamic microscopic objects using optical diffraction tomography” [J/OL]. *Optics express*, **2013**, 21(26): 32269–32278. [^ 14]
- [70] Ulugbek S Kamilov, Ioannis N Papadopoulos, Morteza H Shoreh *et al.* “Learning approach to optical tomography” [J/OL]. *Optica*, **2015**, 2(6): 517–522. [^ 14, 18]
- [71] Yann Cotte, Fatih Toy, Pascal Jourdain *et al.* “Marker-free phase nanoscopy” [J/OL]. *Nature Photonics*, **2013**, 7(2): 113. [^ 14, 15, 43, 71]
- [72] Zhuo Wang, Larry Millet, Mustafa Mir *et al.* “Spatial light interference microscopy (SLIM)”. *Optics express*, **2011**, 19(2): 1016–1026. [^ 14, 17]
- [73] Taewoo Kim, Renjie Zhou, Mustafa Mir *et al.* “White-light diffraction tomography of unlabelled live cells” [J/OL]. *Nature Photonics*, **2014**, 8(3): 256. [^ 14, 15, 17, 71]
- [74] Fabien Momey, Anthony Berdeu, T Bordy *et al.* “Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures” [J/OL]. *Biomedical optics express*, **2016**, 7(3): 949–962. [^ 16]
- [75] A Descloux, KS Grußmayer, E Bostan *et al.* “Combined multi-plane phase retrieval and super-resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy” [J/OL]. *Nature Photonics*, **2018**, 12(3): 165. [^ 16]
- [76] Arkadiusz Kuś, Wojciech Krauze and Małgorzata Kujawińska. “Active limited-angle tomographic phase microscope” [J/OL]. *Journal of biomedical optics*, **2015**, 20(11): 111216. [^ 16]
- [77] Shwetadwip Chowdhury, Will J Eldridge, Adam Wax *et al.* “Refractive index tomography with structured illumination” [J/OL]. *Optica*, **2017**, 4(5): 537–545. [^ 16]
- [78] KyeoReh Lee, Kyoohyun Kim, Geon Kim *et al.* “Time-multiplexed structured illumination using a DMD for optical diffraction tomography” [J/OL]. *Optics letters*, **2017**, 42(5): 999–1002. [^ 17]
- [79] Mor Habaza, Michael Kirschbaum, Christian Guernth-Marschner *et al.* “Rapid 3D refractive-index imaging of live cells in suspension without labeling using dielectrophoretic cell rotation” [J/OL]. *Advanced Science*, **2017**, 4(2): 1600205. [^ 17]
- [80] Yu-chih Lin, Hui-Chi Chen, Han-Yen Tu *et al.* “Optically driven full-angle sample rotation for tomographic imaging in digital holographic microscopy” [J/OL]. *Optics letters*, **2017**, 42(7): 1321–1324. [^ 17]
- [81] Bertrand Simon, Matthieu Debailleul, Mounir Houkal *et al.* “Tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution” [J/OL]. *Optica*, **2017**, 4(4): 460–463. [^ 17]
- [82] Youngchan Kim, Hyoeun Shim, Kyoohyun Kim *et al.* “Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells” [J/OL]. *Optics express*, **2014**, 22(9): 10398–10407. [^ 17]
- [83] Wei-Chen Hsu, Jing-Wei Su, Te-Yu Tseng *et al.* “Tomographic diffractive microscopy of living cells based on a common-path configuration” [J/OL]. *Optics letters*, **2014**, 39(7): 2210–2213. [^ 17]

- [84] Kyoohyun Kim, Zahid Yaqoob, KyeoReh Lee *et al.* “*Diffraction optical tomography using a quantitative phase imaging unit*” [J/OL]. *Optics letters*, **2014**, 39(24): 6935–6938. [^ 17]
- [85] Tan H Nguyen, Mikhail E Kandel, Marcello Rubessa *et al.* “*Gradient light interference microscopy for 3D imaging of unlabeled specimens*” [J/OL]. *Nature communications*, **2017**, 8(1): 210. [^ 18, 71]
- [86] Jonathan Bailleul, Bertrand Simon, Matthieu Debailleul *et al.* “*Tomographic diffractive microscopy: Towards high-resolution 3-D real-time data acquisition, image reconstruction and display of unlabeled samples*” [J/OL]. *Optics Communications*, **2018**, 422: 28–37. [^ 18, 81]
- [87] Stanislas Vertu, Jens Flügge, Jean-Jacques Delaunay *et al.* “*Improved and isotropic resolution in tomographic diffractive microscopy combining sample and illumination rotation*” [J/OL]. *Open Physics*, **2011**, 9(4): 969–974. [^ 18]
- [88] Ulugbek S Kamilov, Ioannis N Papadopoulos, Morteza H Shoreh *et al.* “*Optical tomographic image reconstruction based on beam propagation and sparse regularization*” [J/OL]. *IEEE Transactions on Computational Imaging*, **2016**, 2(1): 59–70. [^ 18]
- [89] Patrick C Chaumet and Kamal Belkebir. “*Three-dimensional reconstruction from real data using a conjugate gradient-coupled dipole method*” [J/OL]. *Inverse Problems*, **2009**, 25(2): 024003. [^ 18]
- [90] Ulugbek S Kamilov, Dehong Liu, Hassan Mansour *et al.* “*A recursive Born approach to nonlinear inverse scattering*” [J/OL]. *IEEE Signal Processing Letters*, **2016**, 23(8): 1052–1056. [^ 18]
- [91] Bingquan Chen and Jakob J Stamnes. “*Validity of diffraction tomography based on the first Born and the first Rytov approximations*” [J/OL]. *Applied optics*, **1998**, 37(14): 2996–3006. [^ 26]
- [92] Malcolm Slaney, Avinash C Kak and Lawrence E Larsen. “*Limitations of imaging with first-order diffraction tomography*” [J/OL]. *IEEE transactions on microwave theory and techniques*, **1984**, 32(8): 860–874. [^ 27]
- [93] Alfredo Baños. *Dipole radiation in the presence of a conducting halfspace* [M/OL]. Pergamon, **1966**. [^ 27]
- [94] Anthony J Devaney. “*Inverse-scattering theory within the Rytov approximation*” [J/OL]. *Optics letters*, **1981**, 6(8): 374–376. [^ 30]
- [95] Anthony J Devaney. “*A filtered backpropagation algorithm for diffraction tomography*” [J/OL]. *Ultrasonic imaging*, **1982**, 4(4): 336–350. [^ 30]
- [96] Thomas Kailath, Ali H Sayed and Babak Hassibi. *Linear estimation* [M/OL]. Prentice Hall, **2000**. [^ 31]
- [97] Arkadiusz Kuś. “*Illumination-related errors in limited-angle optical diffraction tomography*” [J/OL]. *Applied optics*, **2017**, 56(33): 9247–9256. [^ 34, 43]
- [98] Mark D Pritt and Jerome S Shipman. “*Least-squares two-dimensional phase unwrapping using FFT’s*” [J/OL]. *IEEE Transactions on geoscience and remote sensing*, **1994**, 32(3): 706–708. [^ 35]
- [99] Dennis C Ghiglia and Louis A Romero. “*Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods*” [J/OL]. *JOSA A*, **1994**, 11(1): 107–117. [^ 35]

- [100] Arthur D Edelstein, Mark A Tsuchida, Nenad Amodaj *et al.* “Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software” [J/OL]. *Journal of biological methods*, **2014**, 1(2). [^ 36]
- [101] Arthur Edelstein, Nenad Amodaj, Karl Hoover *et al.* “Computer control of microscopes using  $\mu$ Manager” [J/OL]. *Current protocols in molecular biology*, **2010**, 92(1): 14–20. [^ 36]
- [102] Arthur D Edelstein, Mark A Tsuchida, Nenad Amodaj *et al.* “Micro-Manager Open Source Microscopy Software” [CP/OL]. **2010**. <https://micro-manager.org/>, accessed on 2019-03-18. [^ 36]
- [103] Sam Leffler. “LibTIFF - TIFF Library and Utilities” [CP/OL]. **2005**. <http://www.simplesystems.org/libtiff/>, accessed on 2017-03-01. [^ 36]
- [104] Matteo Frigo and Steven G. Johnson. “The Design and Implementation of FFTW3” [J/OL]. *Proceedings of the IEEE*, **2005**, 93(2), Special issue on “Program Generation, Optimization, and Platform Adaptation”: 216–231. [^ 36]
- [105] Matteo Frigo and Steven G Johnson. “FFTW library” [CP/OL]. **2005**. <http://www.fftw.org/>, accessed on 2017-03-01. [^ 36]
- [106] Florian Charrière, Tristan Colomb, Frédéric Montfort *et al.* “Shot-noise influence on the reconstructed phase image signal-to-noise ratio in digital holographic microscopy” [J/OL]. *Applied optics*, **2006**, 45(29): 7667–7673. [^ 48]
- [107] Poorya Hosseini, Renjie Zhou, Yang-Hyo Kim *et al.* “Pushing phase and amplitude sensitivity limits in interferometric microscopy” [J/OL]. *Optics letters*, **2016**, 41(7): 1656–1659. [^ 48]
- [108] Mats GL Gustafsson. “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy” [J/OL]. *Journal of microscopy*, **2000**, 198(2): 82–87. [^ 52]
- [109] Mats GL Gustafsson. “Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution” [J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2005**, 102(37): 13081–13086. [^ 52]
- [110] Mats GL Gustafsson, Lin Shao, Peter M Carlton *et al.* “Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination” [J/OL]. *Biophysical journal*, **2008**, 94(12): 4957–4970. [^ 52]
- [111] Bi-Chang Chen, Wesley R Legant, Kai Wang *et al.* “Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution” [J/OL]. *Science*, **2014**, 346(6208): 1257998. [^ 52]
- [112] Xiaoshuai Huang, Junchao Fan, Liuju Li *et al.* “Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy” [J/OL]. *Nature biotechnology*, **2018**, 36(5): 451. [^ 54, 59]
- [113] Alan C Eckbreth. “BOXCARS: Crossed-beam phase-matched CARS generation in gases” [J/OL]. *Applied Physics Letters*, **1978**, 32(7): 421–423. [^ 62]
- [114] Yehiam Prior. “Three-dimensional phase matching in four-wave mixing” [J/OL]. *Applied optics*, **1980**, 19(11): 1741\_1–1743. [^ 62]
- [115] John A Shirley, Robert J Hall and Alan C Eckbreth. “Folded BOXCARS for rotational Raman studies” [J/OL]. *Optics letters*, **1980**, 5(9): 380–382. [^ 62]

- [116] Michael D Duncan, J Reintjes and TJ Manuccia. “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope” [J/OL]. *Optics letters*, **1982**, 7(8): 350–352. [^ 63]
- [117] Andreas Zumbusch, Gary R Holtom and X Sunney Xie. “Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering” [J/OL]. *Physical review letters*, **1999**, 82(20): 4142. [^ 63]
- [118] Ji-xin Cheng, Andreas Volkmer, Lewis D Book *et al.* “An epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity” [J/OL]. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2001**, 105(7): 1277–1280. [^ 63]
- [119] Andreas Volkmer, Ji-Xin Cheng and X Sunney Xie. “Vibrational imaging with high sensitivity via epideTECTED coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy” [J/OL]. *Physical Review Letters*, **2001**, 87(2): 023901. [^ 63]
- [120] Michiel Müller and Juleon M Schins. “Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy” [J/OL]. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2002**, 106(14): 3715–3723. [^ 63]
- [121] Ji-Xin Cheng, Lewis D Book and X Sunney Xie. “Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy” [J/OL]. *Optics letters*, **2001**, 26(17): 1341–1343. [^ 63]
- [122] Andreas Volkmer, Lewis D Book and X Sunney Xie. “Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay” [J/OL]. *Applied Physics Letters*, **2002**, 80(9): 1505–1507. [^ 63]
- [123] Conor L Evans, Eric O Potma and X Sunney Xie. “Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility  $\chi$  (3) for vibrational microscopy” [J/OL]. *Optics letters*, **2004**, 29(24): 2923–2925. [^ 63]
- [124] Nirit Dudovich, Dan Oron and Yaron Silberberg. “Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy” [J/OL]. *Nature*, **2002**, 418(6897): 512. [^ 63]
- [125] M Jurna, Jeroen P Korterik, Cornelis Otto *et al.* “Vibrational phase contrast microscopy by use of coherent anti-Stokes Raman scattering” [J/OL]. *Physical review letters*, **2009**, 103(4): 043905. [^ 63]
- [126] Christoph Heinrich, Stefan Bernet and Monika Ritsch-Marte. “Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy” [J/OL]. *Applied physics letters*, **2004**, 84(5): 816–818. [^ 63]
- [127] I Toytman, K Cohn, T Smith *et al.* “Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with non-phase-matching illumination” [J/OL]. *Optics letters*, **2007**, 32(13): 1941–1943. [^ 63]
- [128] Kebin Shi, Haifeng Li, Qian Xu *et al.* “Coherent anti-Stokes Raman holography for chemically selective single-shot nonscanning 3D imaging” [J/OL]. *Physical review letters*, **2010**, 104(9): 093902. [^ 63]
- [129] Qian Xu, Kebin Shi, Haifeng Li *et al.* “Inline holographic coherent anti-Stokes Raman microscopy” [J/OL]. *Optics express*, **2010**, 18(8): 8213–8219. [^ 63]
- [130] Pascal Berto, David Gachet, Pierre Bon *et al.* “Wide-field vibrational phase imaging” [J/OL]. *Physical review letters*, **2012**, 109(9): 093902. [^ 63]

- [131] Lv Yong-Gang, Ji Zi-Heng, Dong Da-Shan *et al.* “Wide-Field Vibrational Phase Contrast Imaging Based on Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Holography” [J/OL]. *Chinese Physics Letters*, **2015**, 32(7): 074209. [^ 63]
- [132] Yonggang Lv, Ziheng Ji, Hong Yang *et al.* “Background-free 3D chemical imaging based on polarization coherent Raman holography” [J/OL]. *Optics letters*, **2015**, 40(9): 2095–2098. [^ 63]
- [133] Lv Yong-Gang, Ji Zi-Heng, Yu Wen-Tao *et al.* “Beam propagation method for wide-field nonlinear wave mixing microscope” [J/OL]. *Chinese Physics B*, **2015**, 24(9): 094211. [^ 66]
- [134] Harvey Lodish, James E Darnell, Arnold Berk *et al.* *Molecular cell biology* [M/OL]. Macmillan, **2008**. [^ 71]
- [135] Tetsuhiro Minamikawa, David A Williams, David N Bowser *et al.* “Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells” [J/OL]. *Experimental cell research*, **1999**, 246(1): 26–37. [^ 71, 75]
- [136] Tomoo Shimada, Junpei Takagi, Takuji Ichino *et al.* “Plant vacuoles” [J/OL]. *Annual review of plant biology*, **2018**, 69: 123–145. [^ 75]
- [137] Sheena Claire Li and Patricia M Kane. “The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads” [J/OL]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **2009**, 1793(4): 650–663. [^ 75]
- [138] Yoh Wada. “Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis” [J/OL]. *Bioarchitecture*, **2013**, 3(1): 13–19. [^ 75]
- [139] Cinzia Progida and Oddmund Bakke. “Bidirectional traffic between the Golgi and the endosomes–machineries and regulation” [J/OL]. *J Cell Sci*, **2016**, 129(21): 3971–3982. [^ 75]
- [140] Zeming Wu, Weiqi Zhang, Moshi Song *et al.* “Differential stem cell aging kinetics in Hutchinson-Gilford progeria syndrome and Werner syndrome” [J/OL]. *Protein & cell*, **2018**: 1–18. [^ 76]
- [141] Weiqi Zhang, Jingyi Li, Keiichiro Suzuki *et al.* “A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging” [J/OL]. *Science*, **2015**, 348(6239): 1160–1163. [^ 76]
- [142] Maria Bohnert and Maya Schuldiner. “Stepping outside the comfort zone of membrane contact site research” [J/OL]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **2018**, 19: 483–484. [^ 75]
- [143] Sarah Cohen, Alex M Valm and Jennifer Lippincott-Schwartz. “Interacting organelles” [J/OL]. *Current opinion in cell biology*, **2018**, 53: 84–91. [^ 75]
- [144] Andrew Murley and Jodi Nunnari. “The emerging network of mitochondria-organelle contacts” [J/OL]. *Molecular cell*, **2016**, 61(5): 648–653. [^ 75, 77]
- [145] Petras P Dzeja, Ryan Bortolon, Carmen Perez-Terzic *et al.* “Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer” [J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**, 99(15): 10156–10161. [^ 77]
- [146] J Prachar. “Intimate contacts of mitochondria with nuclear envelope as a potential energy gateway for nucleo-cytoplasmic mRNA transport” [J/OL]. *General physiology and biophysics*, **2003**, 22(4): 525–534. [^ 77]

- [147] Jonathan R Friedman, Laura L Lackner, Matthew West *et al.* “ER tubules mark sites of mitochondrial division” [J/OL]. *Science*, **2011**, 334(6054): 358–362. [^77]
- [148] Samantha C Lewis, Lauren F Uchiyama and Jodi Nunnari. “ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells” [J/OL]. *Science*, **2016**, 353(6296): aaf5549. [^77]
- [149] Qiang Gao and Joel M Goodman. “The lipid droplet—a well-connected organelle” [J/OL]. *Frontiers in cell and developmental biology*, **2015**, 3: 49. [^77]
- [150] Alex M Valm, Sarah Cohen, Wesley R Legant *et al.* “Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome” [J/OL]. *Nature*, **2017**, 546(7656): 162. [^77]
- [151] Yvette C Wong, Daniel Ysselstein and Dimitri Krainc. “Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis” [J/OL]. *Nature*, **2018**, 554(7692): 382. [^77]
- [152] Jonghee Yoon, YoungJu Jo, Min-hyeok Kim *et al.* “Identification of non-activated lymphocytes using three-dimensional refractive index tomography and machine learning” [J/OL]. *Scientific reports*, **2017**, 7(1): 6654. [^81]
- [153] Patrick A Sandoz, Christopher Tremblay, Sebastien Equis *et al.* “Label free 3D analysis of organelles in living cells by refractive index shows pre-mitotic organelle spinning in mammalian stem cells” [J/OL]. *BioRxiv*, **2018**: 407239. [^81]
- [154] Seungwoo Shin, Doyeon Kim, Kyoohyun Kim *et al.* “Super-resolution three-dimensional fluorescence and optical diffraction tomography of live cells using structured illumination generated by a digital micromirror device” [J/OL]. *Scientific reports*, **2018**, 8. [^81]
- [155] Delong Zhang, Chen Li, Chi Zhang *et al.* “Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution” [J/OL]. *Science advances*, **2016**, 2(9): e1600521. [^82]
- [156] Yeran Bai, Delong Zhang, Lu Lan *et al.* “Ultrafast Chemical Imaging by Widefield Photothermal Sensing of Infrared Absorption” [J/OL]. *arXiv preprint arXiv:1811.07405*, **2018**. [^82]
- [157] Delong Zhang, Lu Lan, Yeran Bai *et al.* “Bond-Selective Transient Phase Microscopy” [J/OL]. *arXiv preprint arXiv:1811.11140*, **2018**. [^82]

## 攻读博士学位期间论文发表情况

### 博士期间已发表和待发表的期刊文章：

1. **Dashan Dong**, Xiaoshuai Huang, Liuju Li, Heng Mao, Yanquan Mo, Guangyi Zhang, Zhe Zhang, Jiayu Shen, Wei Liu, Zeming Wu, Guanghui Liu, Yanmei Liu, Hong Yang, Qihuang Gong, Kebin Shi, and Liangyi Chen. “*Super-resolution fluorescence assisted diffraction computational tomography reveals the three-dimensional landscape of cellular organelle interactome*” [J]. *Cell*, Under Review.
2. Shuanglong Liu, Bowen Sheng, Xinqiang Wang, **Dashan Dong**, Ping Wang, Zhaoying Cheng, Tao Wang, Xin Rong, Duo Li, Liyun Yang, Shangfeng Liu, Mo Li, Jian Zhang, Weikun Ge, Kebin Shi, Yuzhen Tong, and Bo Shen. “*Molecular beam epitaxy of single-crystalline aluminum film for low threshold ultraviolet plasmonic nanolasers*” [J]. *Applied Physics Letters*, **2018**, 112(23): 231904.
3. Wentao Yu, Ziheng Ji, **Dashan Dong**, Xusan Yang, Yunfeng Xiao, Qihuang Gong, Peng Xi, and Kebin Shi. “*Super-resolution deep imaging with hollow Bessel beam STED microscopy*” [J]. *Laser & Photonics Reviews*, **2016**, 10(1): 147-152.
4. Yonggang Lv, Ziheng Ji, **Dashan Dong**, Kebin Shi, and Qihuang Gong. “*Wide-Field Vibrational Phase Contrast Imaging Based on Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Holography*” [J]. *Chinese Physics Letters*, **2015**, 32(7): 074209.

### 博士期间已发表的会议论文：

1. **Dashan Dong**, Yanhui Cai, Ziheng Ji, Hong Yang, Qihuang Gong, and Kebin Shi. “*Tomographic Diffractive Microscopy for Better 3D Imaging*” [C]. In *International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, Optical Society of America*, **2017**: W3A-43.



## 致谢

回首五年来在燕园的经历，感慨良多。虽然初入燕园时定下的目标没有尽然实现，但回首仍然发现自己已成长很多。五年走来，褪去了不少天真稚气的期待，磨掉了不少对人生和科研的自信和热情。好在一路坚持，心中仍留一丝坚定，无忘初心。

首先感谢我的导师施可彬老师的悉心培养和对本论文研究中的精细指导。施老师学术视野开阔，知识渊博，为人亲切平和，是我为人做事的榜样。在科研和生活上，施老师都给予了我莫大的鼓励和支持。非常幸运能够成为施老师的学生，真诚的感谢他为我们创造的轻松、自由的科研氛围。

此外还要感谢分子医学所陈良怡老师的指导。陈老师学识渊博，学术思维敏锐，耐心细致，为我们论文的写作发表投入了巨大时间和精力。在此谨向陈老师致以诚挚的谢意。

感谢光学所各位老师对我科研和生活上的指导和支持。感谢龚旗煌院士的督促指导，感谢光学所李焱、杨宏、肖云峰、王树峰、陈建军、褚赛赛等各位老师在使用仪器及实验操作上的支持和指导。感谢本论文的相关合作老师：数学学院毛珩老师、北京林业大学高宏波老师、清华大学柴咏平博士、斯威本科技大学贾宝华老师和林瀚博士在样品和实验上的帮助。

感谢我的合作者黄小帅博士和李柳菊同学。几年来的合作中一直钦佩他们的倾心投入。感谢他们在整个项目从无到有过程中付出的努力和心血。

感谢范俊超同学和安捷同学在算法上的指导和帮助。

感谢吕永刚师兄在光路搭建和实验操作上的指导。感谢李玖师兄、纪子衡师兄、于文韬师兄、陆星师兄、吕志强师兄在科研和生活上的帮助。因为你们在吃喝玩乐上的陪伴，我才能挺过科研和生活中的各种不顺。希望你们工作顺利，生活幸福。

感谢组内孙畅师姐、邵陈荻师妹、吴嘉瑞师弟、刘伟师弟、蔡艳辉师妹、李润丰师弟、穆书奇师弟以及颜及堃、全鑫等同学在实验和生活中的帮助。祝你们身体健康，科研顺利。

感谢国家自然科学基金和科技部的支持，感谢各位审稿老师百忙之中抽出时间审稿。

最后特别感谢我的父母和妹妹，感谢你们对我的支持和关心，你们是我不断前进的动力。

董大山 2019 年 4 月于波士顿



## 北京大学学位论文原创性声明和使用授权说明

### 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：董大山 日期： 年 月 日

### 学位论文使用授权说明

(必须装订在提交学校图书馆的印刷本)

本人完全了解北京大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：

- 按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本；
- 学校有权保存学位论文的印刷本和电子版，并提供目录检索与阅览服务，在校园网上提供服务；
- 学校可以采用影印、缩印、数字化或其它复制手段保存论文；
- 因某种特殊原因须要延迟发布学位论文电子版，授权学校在  一年 /  两年 /  三年以后在校园网上全文发布。

(保密论文在解密后遵守此规定)

论文作者签名：董大山 导师签名： 日期： 年 月 日

