差分相衬显微成像技术发展综述

范 瑶,陈 钱,孙佳嵩,张祖鑫,卢林芃,左 超

(南京理工大学 电子工程与光电技术学院,江苏 南京 210094)

摘 要: 差分相衬(Differential phase contrast,DPC)成像是一种基于部分相干照明调控的无标记非干涉相位成像方法,它为未染色透明样品提供了一种快速、有效且高分辨率的可视化手段。DPC 通过多次非对称照明调控或非对称孔径调制使不可见的样品相位信息转换为成像器件可直接探测的强度信号,从而为定性相衬成像甚至定量相位重建提供了可能。近年来,随着该领域研究的逐步深入,成像的相位传递函数得以明确推导,DPC 已经逐步从定性观察走向了定量研究。另一方面,得益于全孔径照明调控和高效相位反卷积算法,DPC 定量相位成像的空间分辨率可达到非相干衍射极限,并能够获得低噪声、高精度的定量相位重构结果。通过与三维光学传递函数理论交融借鉴,DPC 最近已被进一步拓展到了三维衍射层析领域,实现了厚样品三维折射率的定量成像。文中从 DPC 成像方法的基本原理、成像系统与算法优化等几个方面对其历史发展、研究现状和最新进展进行了详细综述,并讨论了该方法现存的一些关键问题以及今后可能的研究方向。

关键词: 定量相位成像; 差分相衬; 相位传递函数; 衍射层析

中图分类号: O438 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201948.0603014

Review of the development of differential phase contrast microscopy

Fan Yao, Chen Qian, Sun Jiasong, Zhang Zuxin, Lu Linpeng, Zuo Chao

(School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: Differential phase contrast (DPC) is a labeled-free and non-interferometric phase imaging method based on partial coherent illumination control, which provides a fast, effective and high-resolution visualization method for unstained transparent samples. It converts invisible sample phase information into detected intensity signals through multiple asymmetric illumination modulation or asymmetric aperture modulation, thereby providing possibilities for qualitative phase contrast imaging and even quantitative phase reconstruction samples. In recent years, with the gradual deepening of research in this field, the phase transfer function (PTF) of DPC imaging was definitely deduced, and DPC has gradually advanced towards qualitative observation to quantitative research. On the other hand, owning to the full-aperture

收稿日期: 2019-01-14; **修订日期:** 2019-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(61722506,11574152);江苏省杰出青年基金(BK20170034);江苏省重点研发计划项目(BE2017162);江苏省“333 工程”科研项目资助计划(BRA2016407);南京理工大学自主科研基金(30917011204)

作者简介: 范瑶(1993-),女,博士生,主要从事相位显微成像方面的研究。Email:fanyaoscilab@163.com

导师简介: 陈钱(1964-),男,教授,硕/博士生导师,主要从事相位显微及超分辨光学显微技术方面的研究。Email:chenqian@njust.edu.cn

通讯作者: 左超(1987-),男,教授,博士生导师,博士,主要从事计算光学显微成像与快速三维传感等方面的研究。Email:zuochao@njust.edu.cn

illumination control and high-efficiency phase deconvolution algorithm,DPC quantitative phase imaging can achieve the incoherent diffraction limit resolution, and obtain a low-noise, high-precision quantitative phase reconstruction result. Furthermore, drawing on the theory of three-dimensional (3D) optical transfer function, DPC has recently been extended to 3D diffraction tomography to achieve quantitative imaging of the 3D refractive index for thick samples. This paper reviews the historical development, research status and latest developments from the basic principles of DPC imaging methods, imaging systems and algorithm optimization, and discusses some key problems existing in this method and possible future research directions.

Key words: quantitative phase imaging; differential phase contrast; phase transfer function; diffraction tomography

0 引 言

光学显微镜为人类探索和认识微观世界提供了重要的工具[1],它为生物细胞学和材料学的研究提供了巨大的便利。然而,生物样品的细胞质和大部分细胞器的光学吸收系数很小,传统明场显微镜需要对观察样品进行染色或者荧光标记,由此产生的光污染或者光毒性往往对细胞活性产生不利的影响。Zernike 相差(Phase contrast,PC)显微镜和微分干涉(Differential interference contrast,DIC)显微镜[2]的出现为显微成像带来了技术革新,为活细胞研究提供了有效的手段[3-4]。它们利用光的衍射和干涉原理将样品的相位差转换为振幅差,不需对样品进行任何标记处理即可实现对未染色透明样品的观察。然而,由于采用衍射或者干涉成像,这两种成像方法的成像分辨率和成像对比度受到了限制。在此基础上,1984 年 Hamilton 和 Sheppard[5-6]将扫描显微成像系统与分离传感器相结合,提出差分相衬显微成像(Differential phase contrast,DPC)方法。该方法通过测量由样品相位产生的强度差异,同样成功实现了对样品的三维信息的定性观察。与相差显微镜和微分干涉显微镜相比,DPC 成像提供了更高的成像分辨率和鲁棒性,逐渐成为无标记成像的主要研究手段。随着光学显微技术的发展,定量成像逐渐成为显微成像领域的研究热点,一系列的定量相位成像(Quantitative phase imaging,QPI)不断被提出。不同于定性观察显微方法的直接成像,QPI 方法往往通过反卷积或者迭代等算法测量无标记样品的定量化相位,这使得它成为现代生物学、医药学、病理学研究的重要手段[7-8]。根据不同的成像原理,QPI 方法主要分为相干和非相干 QPI 两类。相干 QPI 方法[9-11]例如数字全息技术通过干涉条纹求解样品相位,具有较高的成像精度(纳米级分辨率)。然而,由于采用激光干涉的原理,这类方法往往对环境要求比较苛刻,易受到环境噪声等因素的影响。非相干的 QPI 方法很好地解决了这一问题,它们提供了更高的系统鲁棒性,同时实现了 2 倍相干成像的分辨率,例如光强传输方程 (Transport-of-intensity equation,TIE)[12-16]、差分相衬定量相位成 (DPC)[17-18]、傅里叶叠层成像(Fourier ptychographic,FPM)[19-23]等方法。

纵观显微成像方法的发展历程,DPC 成像的理论机制不断被研究,使 DPC 成像实现了从染色观察到无标记定性观察再到无标记定量检测。早期的 DPC 方法往往通过扫描光学显微镜和分裂式探测器来探测由样品相位引起的差异信号,最终获得伪浮雕的差分相衬观察结果[5]。随着电子行业与光学元件的发展,LED 阵列被引入显微镜系统灵活调控明场、暗场、差分相衬等显微成像方法。在此基础上,2015年 Tian 和 Waller[24]提出了基于 LED 阵列的 DPC 成像定量相位成像方法。相比迭代方法而言,DPC 定量相位算法复杂度低、成像效率高、系统鲁棒性高。随后为了进一步提升 DPC 定量相位成像方法的成像质量和成像速度,国内外学者针对 DPC 中的成像频率缺失、系统像差、像素混叠等问题,提出了一系列补偿改进方法[25-28],获得了更高质量的相位重构结果并将 DPC 的成像速度提升到单帧。

需要注意的是,DPC 定量相位成像算法通常采集单个聚焦面上的样品图像实现相位重构。然而对

于一些具有较厚结构的样品，受制于物镜景深的影响，DPC 单次照明的采集图像包含大量的离焦误差。DPC 三维层析成像方法[29]成功解决了这一问题。它通过倾斜照明下采集图像的离焦投影关系得到每一层的样品差分相衬图像，后通过求解系统的三维 PTF，实现了对厚样品的三维定量相位成像。

文中系统地回顾了差分相衬成像的相关研究成果与最新进展。其中，第一节介绍了差分相衬定性成像方法，对采用不同实验系统的 DPC 成像原理进行了介绍。第二节介绍了差分相衬定量相位成像方法的基本原理、重构过程。第三节综述了近年来为了提高 DPC 的相位重构质量、重构效率以及成像通量所提出的多种改进方法。第四节对三维差分相衬成像的原理和实验系统进行了介绍。第五节总结全文并对现存问题并对今后的研究方向提出建议。

1 差分相衬定性成像系统

在不同发展时期，DPC 成像方法基于不同的成像系统实现，成像原理也略有差异。从发展阶段来看，DPC 成像方法从早期的激光逐点扫描式成像成为了目前的全场直接测量。从系统的成像原理来看，DPC 可以通过照明调控成像和孔径调控来实现样品差分相衬图像的获取。本节将对不同的 DPC 成像系统以及成像原理进行介绍。

1.1 扫描式 DPC 成像系统

为了解决 Nomarski 微分干涉显微成像对比度低和分辨率无法同时兼顾的矛盾，1984 年 Hamilton 和 Sheppard[5]基于光学扫描显微镜搭建了扫描式差分相衬显微成像系统。该系统将扫描光学显微镜与分裂式探测器结合来探测由样品厚度差异引起的相位梯度变化。图 1 展示了扫描式 DPC 系统的光路示意图：从 HeNe 激光器(λ=632 nm)发射的激光经物镜汇聚在样品上，经样品相位的调制作用发生偏转最终被两个半圆形的分裂式探测器所接收。与 Nomarski 微分干涉不同，DPC 系统中相位梯度具有对称的响应，所以两个探测器得到的样品相位梯度是对称分布的。将这两个信号差分可以求得如图 1(b)所示伪浮雕效果的样品差分相衬观察结果。与 DIC方法不同，DPC 方法中图像强度与样品相位梯度成线性正例。图 1(c)给出了该方法在 1.3 NA(Numerical Aperture，NA) 油浸物镜和 0.92 NA 探测器孔径的口腔上皮细胞细胞核差分相衬观察结果。在这个系统的基础上，Hamilton 等[6]对探测器形状对成像性能的影响进行了进一步研究。理论分析和实验结果表明采用两个半环形的探测器来替代半圆形探测器，有效地提升了相位传递响应，改善了 DPC 的成像质量。如图 1(d)所示，采用环形探测器进行 DPC 成像，将提升样品的相位梯度结果。

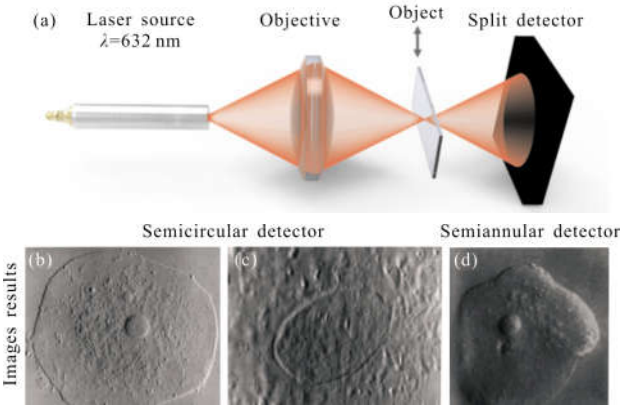

图 1 扫描式 DPC 成像系统示意图[5]。(a)系统光路图；(b)，(c)半圆形探测器的差分相衬结果；(d)半环形探测器的差分相衬结果

Fig.1 Schematic diagram of DPC imaging system based on scanning imaging[5]. (a) Schematic diagram of system light path; (b), (c) differential phase contrast results for semi-circular detector; (d) differential phase contrast results for semi-annular detector

由于扫描式 DPC 成像系统需要采用激光对样品进行逐点扫描，成像速度较慢且成像质量易受到激光干涉的影响。近年来，电子元件和光电元件的发展为显微成像系统提供了新的方式，扫描式的 DPC 成像系统逐渐被全场成像显微镜系统所取代。新的 DPC 成像系统将在 1.2 节进行介绍。

1.2 全场 DPC 成像系统

长期以来，非对称照明一直被用来提升透明的相位样品的对比度，实现类似 DIC 阴影投射的高分辨率定性成像。基于非对称照明，DPC 成像系统逐渐由逐点扫描式走向全场直接成像。2009 年，Mehta 和 Sheppard[18]第一次报道了全视场的 DPC 显微成像系统，图 2 显示了该系统的光路图。该系统采用不透明的半圆形纸对光源进行调制生成不对称的照明图案来照射样品，透过样品的光线经物镜汇聚在 CCD 上形成全视场样品图像，仅需两幅图像即可获得样品的相位梯

度观察结果。相位梯度采用下列公式进行计算：

$$I_{ud}^{DPC}=2\frac{I_u-I_d}{I_u+I_d} \tag{1}$$

式中：I_u 和 I_d 分别表示上下半圆照明时对应的采集图像。为了研究该系统的成像特性，Mehta 基于缓变近似推导得到了 DPC 系统的相位梯度传递函数(Phase gradient transfer function，PGTF)。与 DIC 系统不同，DPC 系统获得了线性的相位梯度传递函数，这意味着该系统的差分相衬结果的强度值与样品的相位梯度是线性的。值得注意的是，这个相位梯度传递函数并不是一般意义上的传递函数，它反映的是强度与样品相位梯度对应的查找表。图 2 显示了该系统的成像系统示意图与对双折射样品的成像结果。如图 2(a)所示为该方法的成像结果，图 2(b)和(c)分别为两种情况下的 DIC 成像结果。可以发现 DPC 提供了高分辨率、高稳定性的样品相位梯度。

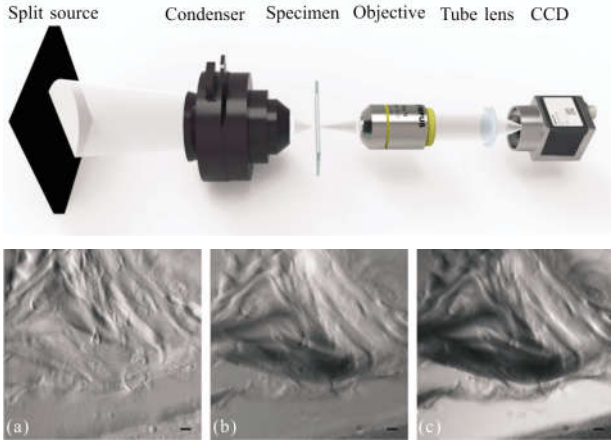

图 2 全视场 DPC 成像系统示意图[18]。(a)全场 DPC 成像结果；(b)4 帧 DIC 成像结果；(c)偏移 π/5 的 DIC 的成像结果

Fig.2 Schematic diagram of full field DPC imaging system[18]. (a) Imaging result of full field DPC; (b) imaging result of 4-frame DIC; (c) imaging result of DIC with bias π/5

图 2 给出了 DPC 成像方法的系统模型，现有的 DPC 成像系统通常是在其基础上进行改造的，分为照明调控和孔径调控两种。基于照明调控的 DPC 成像系统中，常采用空间光调制器件来实现不对称光源的调制。可编程 LED 阵列是一种低成本、简单的空间光调制器件，它被广泛地应用到显微镜领域实现照明调制。目前已有多项研究采用 LED 阵列实现了明场、暗场、差分相衬成像等成像功能[30-31]。在基于 LED 阵列的 DPC 成像系统中，仅需将现有商业显微镜中照明的汞灯替换为可编程 LED 阵列，采用计算机控制 LED 显示不同的图案，即可轻松实现多种照明图案。另一种常用的实现照明调制的方式是采用 TFT-LCD 阵列。由于其具有"光学开关"的作用，与传统显微镜光源结合实现了光源调制系统。与 LED 系统不同，LCD 通常被放置在显微镜光源与聚光镜之间，采用计算机控制 LCD 显示不同的图案对光源进行调制，实现同样的不对称照明[32]。

除了采用不对称照明，不对称傅里叶孔径调制也被用来实现 DPC 成像。Iglesias[33]将四棱锥波前传感器引入相位显微镜系统，将傅里叶平面分成四个子部分，从而在探测器上形成四个相位梯度图像。通过采集的四幅图像沿两个垂直方向重建样品的相位梯度，并进一步获得样品的定量相位。四棱锥波前传感器也可以用四叶形透镜、空间光调制器或液晶显示器(LCD)代替，实现同样的孔径调制效果[34-38]。如图 3 所示，展示了基于 LCD 孔径调制的 DPC 成像

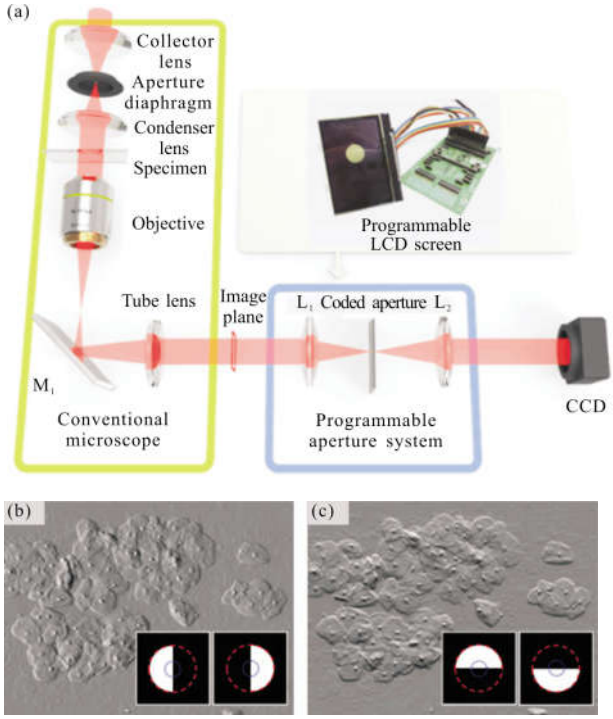

图 3 基于 LCD 的孔径调制 DPC 成像系统示意图[34]。(a)成像系统光路图；(b)孔径沿左右方向的 DPC 结果；(c)孔径沿上下方向的 DPC 结果

Fig.3 Schematic diagram of LCD-based aperture modulation DPC imaging system[34]. (a) schematic diagram of the optical path of imaging system; (b) DPC imaging result with left-right aperture; (c) DPC imaging result with up-down aperture

系统光路图[34],LCD 被放置在透镜 L_1 与 L_2 之间组成可编程孔径系统。控制 LCD 显示半圆形的图案对样品频谱进行滤波,即可得到样品的相位梯度图像。图 3(b)和(c)分别展示了不同方向上的 LCD 孔径图案的差分相衬结果,呈现出与照明调制 DPC 类似的伪浮雕效果。

值得注意的是,虽然这两种方式都可以实现相位梯度图像的获取,但是不同位置处的空间光调制器件将使 DPC 系统具有不同的成像特性。在照明调控 DPC 系统中,系统的相位传递函数 PTF 零频处的响应始终为 0,这将导致低频对比度偏低。只有当照明数值孔径 NA_{ill} 与物镜数值孔径 NA_{obj} 相等时,成像系统才具有好的传递特性。然而,在孔径调制的 DPC 成像系统中,照明 NA_{ill} 决定了相位梯度的动态范围,当 NA_{ill} 等于 $NA_{obj}/2$ 时才可以获得较好的成像特性。所以在不同的成像系统中,需要根据系统光路结构设计调制图案,使 DPC 实现更好的成像质量。

1.3 新型 DPC 成像系统

基于 DPC 成像理论,更多的新型 DPC 成像系统被设计研发,进一步扩展了 DPC 成像方法的应用。传统 DPC 成像通过透射显微系统进行成像,这使得它只能为体外的薄样品提供成像结果。然而在医学临床领域,对活体组织的观察是医疗诊断和手术过程中重要的检测步骤。面对这个问题,2013 年 Ford 等[39-40]设计搭建了基于反射式成像的 DPC 成像系统,并将其与内窥镜相结合,采用探针实现了对活体组织的差分相衬成像。如图 4 所示,显示了该系统的原理示意图与成像结果。与传统透射 DPC 成像系统不同,该系统的照明光源和检测光学元件位于样品的同一侧(即反射成像系统),使用两个径向相对的离轴源交替照明待测目标采集两幅图像,实现对任意厚度样品的 DPC 成像。图 4 右侧的黄色框内显示了该系统下的切除的小鼠活体组织的差分相衬结果。图 4(b)、(d)、(f)分别为 1 倍微物镜下肠上皮的强度图像,图 4(c)、(e)、(g)分别为对应的相位梯度图像。图 4(h)、(i)为采用 2.5×微物镜捕获的远端结肠(图 4(h))和小肠(图 4(i))上皮在更高倍率物镜下的

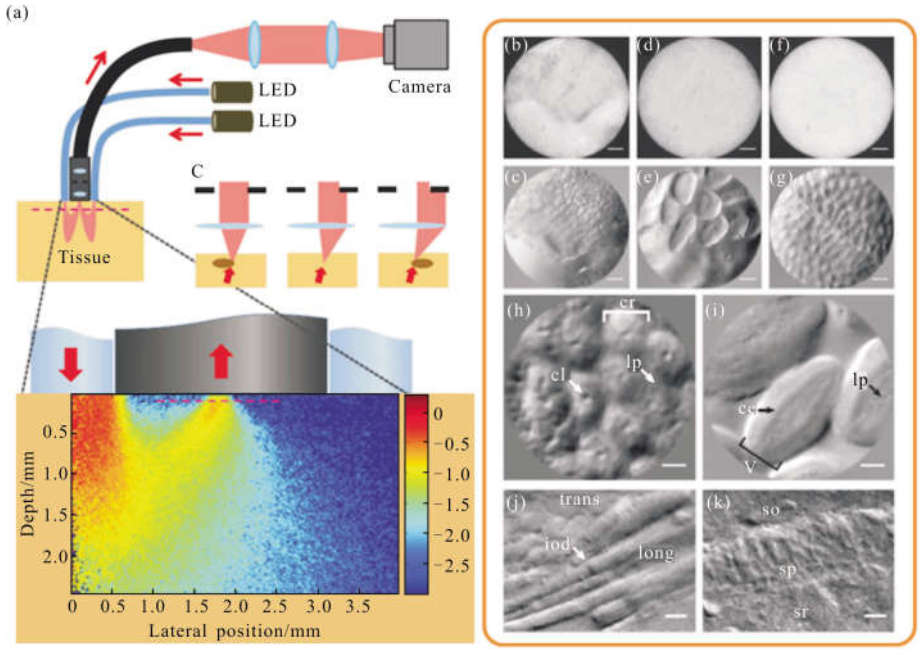

图 4 切除的小鼠组织的 DPC 成像结果[39]。(a)反射式 DPC 成像系统原理图;(b)~(g)1×微物镜下肠上皮强度图像(b),(d),(f)和相位梯度(c),(e),(g)图像;(h),(i)2.5×微物镜下远端结肠(h)和小肠(i)上皮在高倍率下的相位梯度图像;(j)小鼠心肌组织的横向(横)和纵向(长)形貌;(k)小鼠海马 CA1 区的锥体神经元

Fig.4 DPC imaging results of excised mouse tissue[39]. (a) Schematic diagram of a reflective DPC imaging system; (b)–(g) simultaneously acquired amplitude (b),(d),(f) and phase-gradient (c),(e),(g) images of intestinal epithelium taken with a 1× micro-objective; (h),(i) higher-magnification phase-gradient images of the epithelium in the distal colon (h) and small intestine (i), captured with a 2.5× micro-objective; (j) transverse (trans) and longitudinal (long) aspects of mouse cardiac muscle tissue; (k) pyramidal neurons in the CA1 region of mouse hippocampus

相位梯度图像。这里李氏腺(cr)、隐窝腔(cl)和固有层(lp)的隐窝用白色箭头表示表示;回肠绒毛(v)、柱状上皮(ce)和固有层(lp)用黑色箭头表示,这些细节都可以清楚地观察到。图 4(j)显示的是小鼠心肌组织的横向和纵向形貌,插入的心肌瓣(icd)很容易区分。图 4(k)为小鼠海马 CA1 区的锥体神经元,可以看到起层(so),锥体层(sp)和辐射层(sr)是显而易见的。

DPC 成像系统的另一个创新在于实现小型化便捷式显微成像系统。2017 年,Jung 等[41]基于智能手机的相机镜头,结合自主设计的附加组件模块,实现了基于智能手机的小型化便携 DPC 成像系统。如图 5(a)显示了该系统的结构示意图,自主设计的模块包括 LED 光源、载物台、微物镜等组件。成像时,LED 显示两个颜色不同的半圆形照明,光线透过样品成像,经物镜收集后被智能手机的传感器接收在手机屏幕上成像,得到图 5(b)所示的成像结果。该系统的搭建提供了一种方便化、低成本、兼容性高的新型 DPC 成像系统。

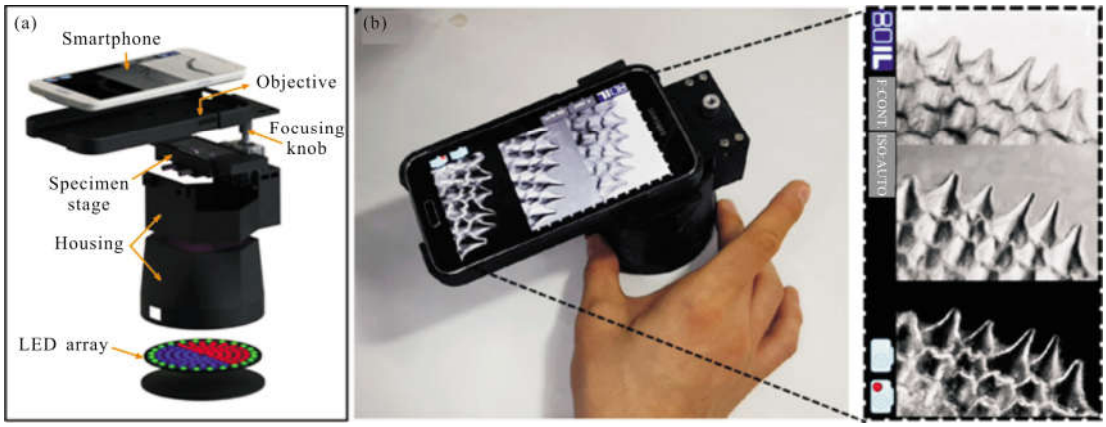

图 5 基于智能手机的小型化便携式 DPC 成像系统[41]。(a)系统结构示意图;(b)明场、暗场、差分相衬成像结果

Fig.5 Miniaturized portable DPC imaging system based on smartphone[41]. (a) System structure diagram; (b) imaging results of bright field, dark field, DPC imaging

2 基于差分相衬成像的二维定量相位恢复方法

典型的 DPC 定量相位成像通常采用非对称照明采集样品的差分相衬图像来恢复样品相位。在相位恢复算法中,缓变相位近似和弱相位近似被用来简化相位求解过程。其中,弱相位近似将相位求解过程线性化,大大简化了相位恢复算法,目前被广泛地应用于 DPC 相位求解算法中。然而,目前并没有文章对弱相位物体的标准进行定量化的研究,可以确定的是当样品相位较大时,DPC 的成像质量会严重下降[38]。

采用待测物的差分相衬图像来求解样品的定量相位有两种求解算法,分别为通过相位梯度传递函数(PGTF)[5-6]和相位传递函数(PTF)[24,27]。在基于相位梯度传递函数的 DPC 方法中,样品的定量相位梯度值可以由 DPC 成像系统的相位梯度传递函数查找得到,而对相位梯度数值积分即可以得到样品定量相位分布。Zuo 等[34]通过仿真和实验验证了这个相位重构算法可以成功地恢复样品的定量相位。

另一方面,基于相位传递函数的 DPC 方法通过差分相衬图像与系统的相位传递函数反卷积来求解样品的定量相位信息。2015 年 Tian 和 Waller[24]推导了系统的相位传递函数,并利用基于 LED 的 DPC 成像系统实现了定量相位成像。该方法采用不对称照明,将通过强度分布来恢复(估算)相位这一过程作为数学上的一个逆问题,通过一步反卷积恢复样品的定量相位。这里对该算法进行详细介绍。采用单个角度的倾斜照明照射复传播函数为 $t(r)=e^{-a(r)+i\phi(r)}$ 的薄的纯相位样品,单个角度的倾斜照明光表示为 $S(u_j)$,其中 $r=(x,y)$ 表示样品平面的坐标,$a(r)$,$\phi(r)$ 分别代表样品的强度和相位。为了分离样品相位和强度以便简化问题,对样品的复振幅分布采用弱相位近似,得到 $t(r)\approx 1-a(r)+i\phi(r)$[6,42]。那么,相机平面上的强度谱分布:

$$\begin{aligned} I_j(u)=&S(u_j)\delta(u)|P(u)|^2-S(u_j)A(u)\\ &[P^*(u_j)P(u+u_j)+P(u_j)P^*(u-u_j)]+iS(u_j)\Phi(u)\\ &[P^*(u_j)P(u+u_j)-P(u_j)P^*(u-u_j)] \end{aligned} \tag{2}$$

式中:u 表示频域的频率分量;u_j 代表单个角度照明光源在频域对应的相移量。$P(u)$表示物镜在傅里叶平面上的光瞳函数(假设 $P(u)$是截止频率为 NA_{obj}/λ 的理

想的低通滤波器，仅使物镜数值孔径以内的频率成分被通过，NA_{obj} 表示物镜的数值孔径)。计算复杂照明下频率域的强度分布，忽略计算过程的高阶卷积项，样品的强度谱分布可以被分为三项，分别表示为：

$$I(u)=B\delta(u)-A(u)\mathrm{ATF}(u)+i\Phi(u)\mathrm{PTF}(u) \tag{3}$$

式中：B 为背景项，表示为 $B=\iint S(u_j)|P(u_j)|^2\mathrm{d}^2u_j$；$A(u)$为样品的振幅谱分布；$\Phi(u)$为样品的相位谱分布；ATF($u$)表示振幅传递函数；PTF($u$)表示相位传递函数：

$$\mathrm{PTF}(u)=\iint S(u_j)[P^*(u_j)P(u+u_j)-P(u_j)P^*(u-u_j)]\mathrm{d}^2u_j \tag{4}$$

公式(4)是复杂照明下振幅传递函数和相位传递函数的通用表达式，适应于所有的照明模式和光瞳函数。

在典型的 DPC 成像系统中，照明图案往往被设计为沿水平和垂直轴方向上的不对称均匀半圆形照明。四个照明图样依此照亮样品采集四幅图像。通过一个简单的差分计算过程来得到样品的相位差异图像。基于这样的计算模型下，差分相衬成像的相位传递函数表达式表示为：

$$\mathrm{PTF}_{\mathrm{lr}}(u)=\frac{\iint S_{\mathrm{lr}}(u_j)[P^*(u_j)P(u+u_j)-P(u_j)P^*(u-u_j)]\mathrm{d}^2u_j}{\iint |S_{\mathrm{lr}}(u_j)||P(u_j)|^2\mathrm{d}^2u_j} \tag{5}$$

式中：$\mathrm{PTF}_{\mathrm{lr}}(u)$为左右轴方向上的相位传递函数；$S_{\mathrm{lr}}(u_j)$为左右方向上的照明光源强度分布。通过公式可以发现，PTF 由照明函数和光瞳函数共同决定，而光瞳函数由物镜和照明的波长决定，也就是说，在系统参数确定的情况下($P(u)$确定)，DPC 成像系统的 PTF 由照明函数决定[27]。

相位传递函数 PTF 建立了差分相衬图像与样品定量相位之间的联系，用来表征样品的定量相位如何转换为强度图像。根据这个原则，可以通过一步反卷积计算得到样品的定量相位。最常见的是采用 Tikhonov 准则对相差图像的频谱和相位传递函数进行反卷积计算，得到样品的定量相位结果[43]，计算过程如下：

$$\phi(r)=F^{-1}\left\{\frac{\sum_i[\mathrm{PTF}_i^{\mathrm{DPC}^*}(u)I_i^{\mathrm{DPC}}(u)]}{\sum_i|\mathrm{PTF}_i^{\mathrm{DPC}^*}(u)|^2+\alpha}\right\} \tag{6}$$

式中：$\mathrm{PTF}_i^{\mathrm{DPC}^*}(u)$表示不同轴上的 PTF 的共轭，在反卷积过程中，正则化参数 α 被用来抑制反演过程中相位传递函数中极小数值被过度放大带来的重构误差。通常根据照明模型和图像噪声的特性来选择合适的正则化参数 α。

图 6 展示了典型的差分相衬定量相位成像系统示意图[24]。如图 6(a)的系统光路图所示，采用可编程 LED 作为照明光源，控制其显示不对称的半圆形照

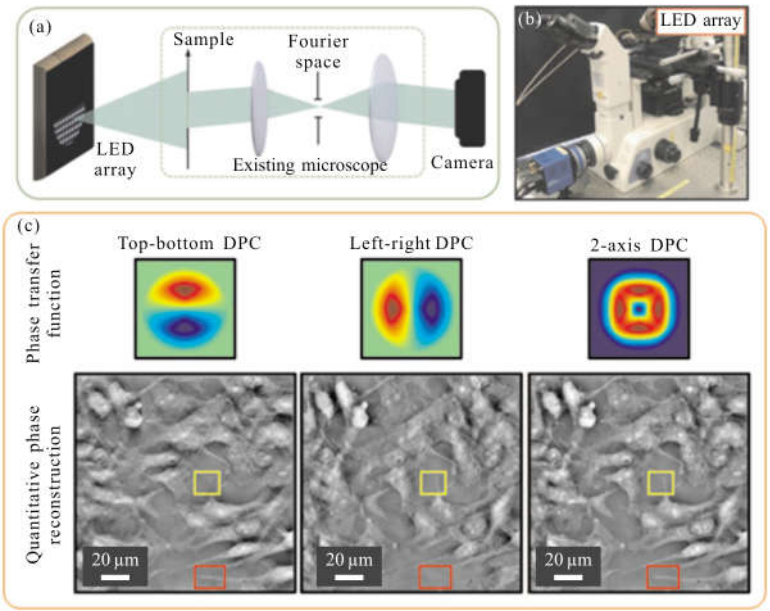

图 6 DPC 定量相位成像系统示意图[24]。(a)包含 DPC 定量相位成像光路示意图；(b)DPC 定量相位成像实验系统；(c)不同照明情况下的 DPC 系统 PTF 以及对应的相位重构结果

Fig.6 Schematic of DPC quantitative phase imaging system[24]. (a) Optical path diagram of DPC quantitative phase imaging; (b) DPC quantitative phase imaging experimental system; (c) PTFs and phase reconstruction results for DPC systems under different illumination conditions

明采集图像,通过公式(6)得到图中所示的样品定量相位。当采用沿不同轴方向的不对称照明时,系统的 PTF 具有方向性的差异,定量相位结果的不同频率处的相位细节成像质量不同。为了解决这个问题,通常情况下采用 2 轴正交照明弥补 PTF 响应的缺失。如图 6(c)所示,2 轴 DPC 改善了 PTF 响应,提升了重构相位质量。

3 差分相衬成像改进方法

3.1 DPC 相位重构精度提升方法

尽管与其他的相位恢复方法相比,DPC 方法仅需很少的图像即可获得高精度、高鲁棒性的结果,但其成像性能仍受到多方面因素的影响。针对这一问题,国内外学者们提出了多种补偿优化方法,从三个方面来提升 DPC 的相位成像性能。(1) DPC 照明函数优化;(2) 系统误差补偿校正;(3) 像素混叠去除。

3.1.1 DPC 照明函数优化

传统的 DPC 成像方法采用 2 轴的不对称半圆照明来采集图像,虽然在一定程度上弥补了 PTF 的传递响应分布,但是 PTF 仍有大量的频率缺失。在传统的 2 轴半圆形照明下,PTF 在同一频率的不同方向上具有不同的响应,这意味着同一分辨率的细节信息无法被完全的恢复。同时,PTF 的低频和接近非相干衍射极限的高频部分($2NA_{obj}/\lambda$)仅能得到非常弱的传递响应,在这种情况下,重构相位的低频对比度和高频细节将无法被正常恢复。从成像结果看,重构相位无法获得各向同性的成像分辨率和信噪比,同时低频对比度较差。为了改善 PTF 的传递响应,最简单的方法是采用更多的照明来获得近似各向同性的 PTF。在文献中,Tian 和 Waller[24]采用 12 轴的半圆形照明优化获得近似各向同性的 PTF,提升了 DPC 的相位重构质量。但是从本质来看,这样的多轴照明实现好的成像质量是以牺牲成像效率为前提的。相比传统的 2 轴照明,12 轴照明 DPC 的成像速度下降了大约 6 倍,这使得它难以被大多数的定量成像系统所接受,所以目前并没有研究利用 12 轴照明来实现 DPC 成像。

根据第 2 节的分析,DPC 系统的 PTF 由照明函数决定。由公式(5)可以看出,当系统参数确定的情况下,系统的相位传递函数 PTF 完全由照明函数 $A(u)$ 决定。所以优化照明函数是提升 DPC 相位恢复算法的最直接途径。2018 年,Lin 等[44]提出了 3 轴径向分布的照明方案,通过采用径向分布的半圆形不对称照明,在 3 轴的情况下获得了各向同性的相位传递函数,避免了传统 2 轴照明频率缺失带来的相位误差。遗憾的是,该照明并没有对其能够实现各向同性进行理论推导和证明。在此基础上,Chen 等[45]进一步提出了 2 轴梯度(振幅)掩码照明,并通过理论推导证明了其有效地实现了各向同性相位成像。图 7 显示了 2 轴振幅掩码照明 DPC 的系统示意图,其中

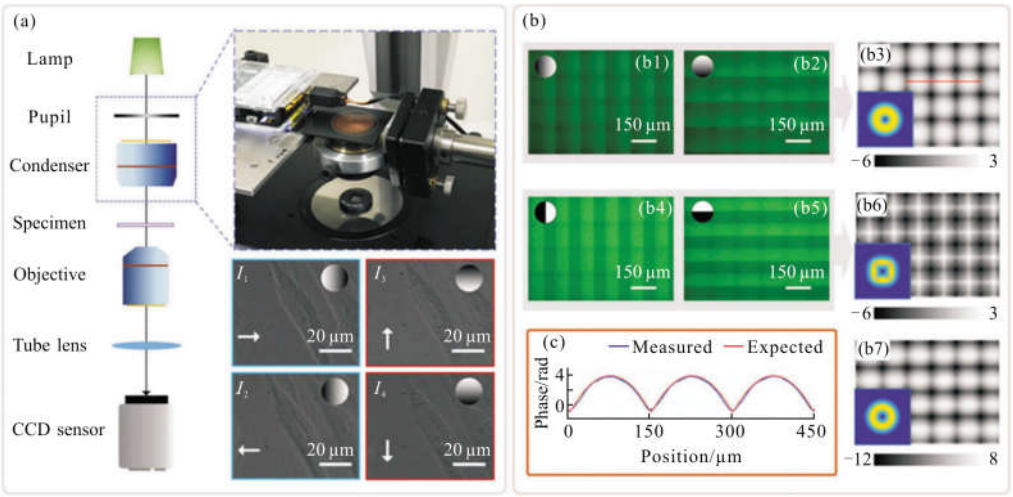

图 7 2 轴振幅梯度掩码照明 DPC 成像系统[45]。(a)系统光路示意图;(b)振幅掩码照明 DPC 和传统的 2 轴 DPC 的对比;(c)振幅梯度掩码照明下相位重构结果和理想真值相位红色直线上的相位剖线

Fig.7 Schematic of DPC microscopic setup with 2-axis amplitude gradient mask illumination[45]. (a) System light path diagram; (b) comparison of amplitude mask illumination DPC and traditional 2-axis DPC; (c) phase profile of the phase reconstruction result under the amplitude gradient mask illumination and the ideal true phase along the red line

图 7(a)为系统的光路图。这里 TFT 被放置于聚光镜前焦面对光源进行调制,样品被置于聚光镜后焦面,实现科勒照明系统。图 7(b)给出了传统均匀半圆形照明和振幅梯度照明在两轴的情况下的采集图像和相位重构结果。对比(b3)和(b6)可以看到,振幅梯度照明获得了各向同性的 PTF,样品相位被完整的重构。12 轴半圆形照明的 DPC 显示在(b7)中,可以看到,振幅梯度照明获得了更加正确的重构相位。图 7(c)对振幅梯度照明的重构结果与理想真值相位进行了定量化的比较,结果表明振幅梯度照明获得了与理想相位一致的重构结果。

2019 年,Fan 等[46]通过严格的理论推导,首次得到了各向同性 DPC 的广义照明函数,该照明在 2 轴照明下获得了完美的各向同性 PTF,实现了各向同性的相位重构分辨率和信噪比。根据该广义照明函数,可以设计得到任意的各向同性照明方案。不仅如此,他们同时探究了广义照明函数中不同参数对 PTF 的影响,得到了 DPC 成像的最优照明方案,即采用照明数值孔径 NA_{ill} 与物镜数值孔径 NA_{obj} 相等的环上正弦分布的半环形照明[47-48]。一方面,最优照明获得了理想对称的 PTF,实现各向同性的相位重构。另一方面,改善了现有照明下 PTF 中心低频和高频响应弱的情况,提供了最强的传递函数响应,大大提高了 DPC 成像的相位对比度和鲁棒性。图 8 给出了最优照明与其他三种照明的对比。图 8(a1)~(a4)显示了四种照明对应的 PTF,进一步叠加求解 2 轴照明

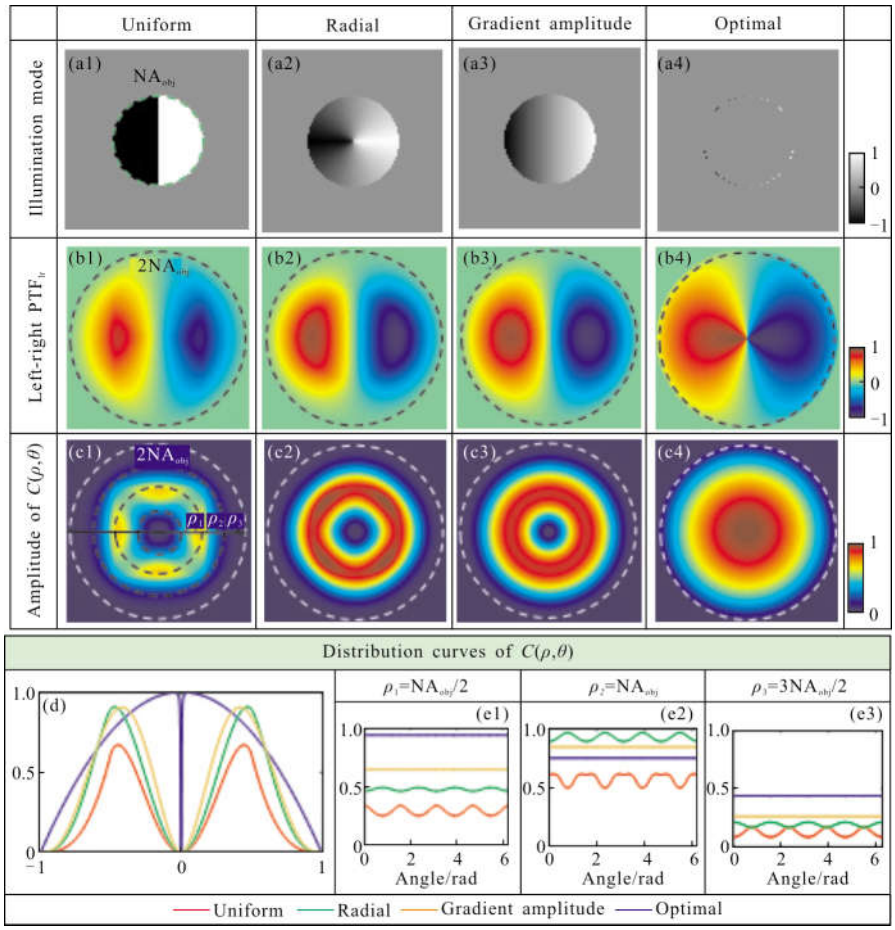

图 8 不同照明方法的成像性能仿真对比[46]。(a1)~(a4)均匀半圆形、径向、振幅梯度、最优照明图案;(b1)~(b4)不同照明对应的沿左右方向的 PTF;(c1)~(c4)不同照明对应的 2 轴照明的 PTF 强度分布 $C(\rho,\theta)$;(d)不同照明下的 $C(\rho,\theta)$的黑色直线的响应曲线;(e1)~(e3)不同照明下的 $C(\rho,\theta)$不同半径上的响应分布曲线

Fig.8 Simulation of imaging performance of different illumination methods[46]. (a1)–(a4) Uniform, radial, amplitude gradient, optimal illumination pattern; (b1)–(b4) PTF in the left–right axis under different illuminations; (c1)–(c4) $C(\rho,\theta)$ of different 2–axis illuminations; (d) response curve of black line of $C(\rho,\theta)$ under different illuminations; (e1)–(e3) response distribution curves at different radii of $C(\rho,\theta)$ under different illuminations

下的 PTF 的强度进行对比，如图 8(b1)~(b4)，振幅梯度掩码和最优照明获得了各向同性的 PTF。然而，振幅梯度掩码照明下的 PTF 中心低频和 2NA 高频的响应仍然非常弱。而最优照明下，PTF 的频率响应在整个非相干成像理论带宽内得到了显著增强，尤其在中心低频和 $2NA_{obj}$ 高频处，这不仅提升了 DPC 成像的低频对比度，同时将提高成像的相位分辨率。标准分辨率板和细胞实验证明，该方法实现了各向同性的成像分辨率，可以用于动态细胞成像。

近年来，深度学习也被用于 DPC 照明孔径的优化，提升相位成像质量。2015 年，Kellman 等[49]将系统先验知识和机器学习相结合，提出一种新的数据驱动方法来优化 LED 阵列显微镜的编码照明模式，只需使用少量的训练样例来进行学习训练。该方法的学习网络展开如图 9 所示，最终得到的优化照明有效地提升了 DPC 的成像质量。

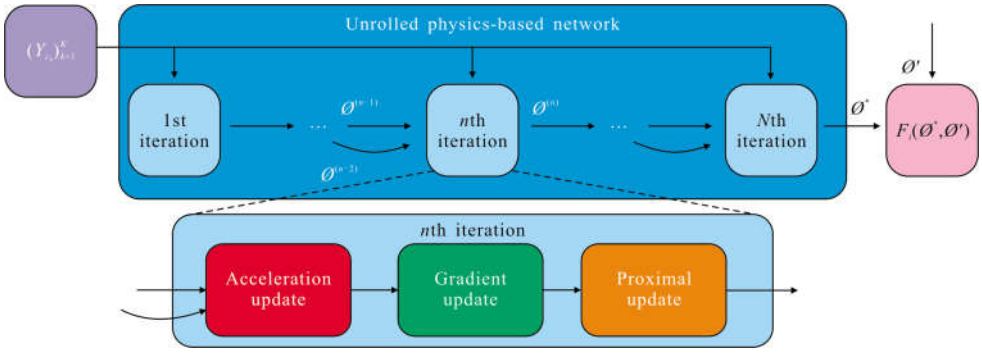

图 9 物理学习展开网络[49]

Fig.9 Unrolled physics-based network[49]

3.1.2 系统像差补偿校正

在真实的显微成像系统中，像差往往不可忽视。由于像差的存在，计算成像算法可能会存在畸变和误差，因此校正或补偿像差也是提升定量相位成像质量的一个有效方法。针对这一问题，Chen 等[50]提出了自校正像差的 DPC 定量相位成像方法。该方法通过采集三幅不对称照明图像和一幅单个 LED 照明的相干图像，通过梯度下降优化方法估计不同空间区域的像差并进行自动像差补偿校正，有效地减少了像差带来的重构相位误差。如图 10 所示，展示

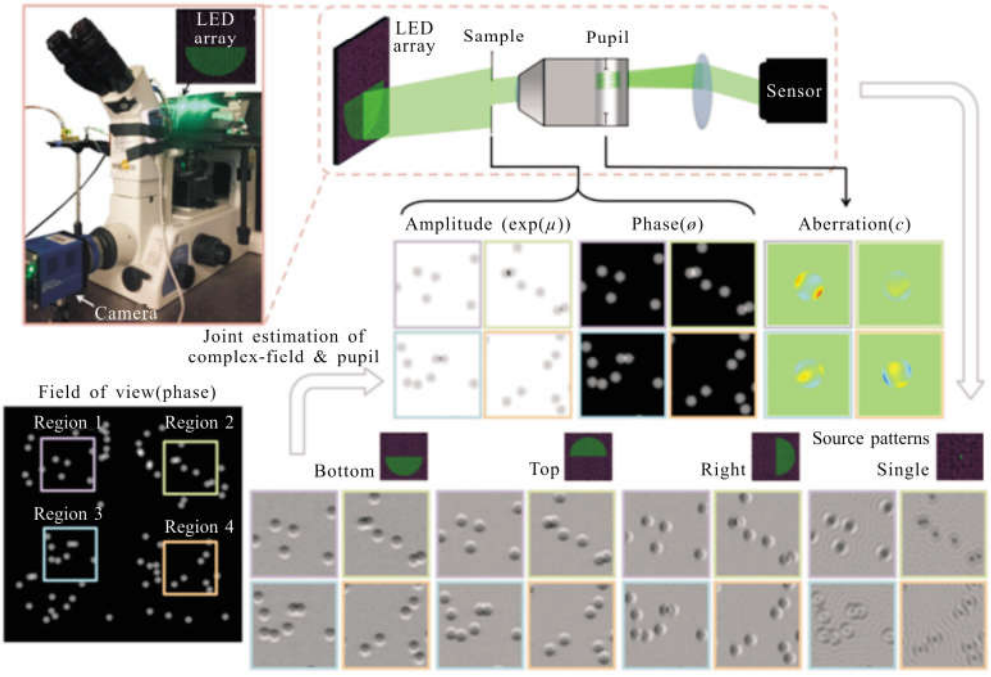

图 10 DPC 自动像差校正方法示意图[50]

Fig.10 DPC automatic aberration correction method diagram[50]

了该方法的系统示意图和算法结果。从图中可以看出,系统像差被准确地恢复出来并得到了补偿校正,最终获得了准确清晰的样品重构振幅与相位。

3.1.3 像素混叠去除

在任何显微成像系统中,像素混叠是一个无法回避的问题,DPC 成像系统也不例外。这个问题可以用信号采样与恢复的 Nyquist-Shannon 定律来描述。根据 Nyquist-Shannon 采样定律,在进行模拟/数字信号的转换过程中,当采样频率大于信号中最高频率的 2 倍时,采样之后的数字信号完整地保留了原始信号中的信息,信号频率才能被正常的恢复。DPC 成像采用非相干成像的原理,系统的空间截止频率为物镜数值孔径的 2 倍,即 $f_{obj}=2NA_{obj}/\lambda$(信号频率),它同时决定了系统的最大成像分辨率。而显微镜系统的最大成像分辨率还受到相机采样频率的影响。相机的截止频率由像素尺寸的大小决定,$f_{cam}=mag/2\Delta x_{cam}$(采样频率的 2 倍),这里的 mag 表示显微镜系统的放大率,Δx_{cam} 为相机的像素尺寸大小。要满足 Nyquist-Shannon 采样定律,显微镜系统通常要求 $f_{cam}>f_{obj}$。在一般的 DPC 成像系统中,通常难以满足这个要求,也就是说,采集的图像存在像素混叠。此时,系统的分辨率被相机的像素尺寸所限制,无法获得系统真正的成像分辨率。

在像素混叠的成像系统中,通常采用上采样方法缓解其细节无法正确恢复的问题。例如,在 FPM 方法中,Sun 等[51]基于像素合并模型,配合上采样插值算法,提高了 FPM 像素混叠系统的成像分辨率。类似的方法同样可以被引入到 DPC 成像中,对采集的图像数据上采样后进行相位恢复,提高相位结果的分辨率。然而在 DPC 方法中,对原始图像简单地进行上采样处理并不能精确恢复出频谱中混叠的高频信息。针对这个问题,一种基于离散复用照明离散照明和复用迭代的 DPC 相位恢复方法 (AADPC)被提出[27]。该方法采用离散的半环形照明替代传统的半圆形照明,一方面增强了 DPC 成像系统的 PTF 响应,显著提升了 DPC 成像的低频成像特性。另一方面,大大减少了照明的个数,为复用迭代恢复相位提供了理论基础。图 11 显示了 AADPC 的算法流程图:首先对采集的像素混叠图像进行上采样求解样品相位,并采用该相位初始化高分辨率频谱。接下来,采用频谱复用的思想解调每个照明对应的子孔径频谱并进行迭代更新。每个角度对应的相位信息被合成到高分辨率频谱中,多次迭代逐渐收敛到一个稳定的结果。仿真和实验结果表明,该方法克服了系统像素混叠效应的影响,采用混叠的低分辨率 DPC 图像获得部分相干衍射的极限分辨率。

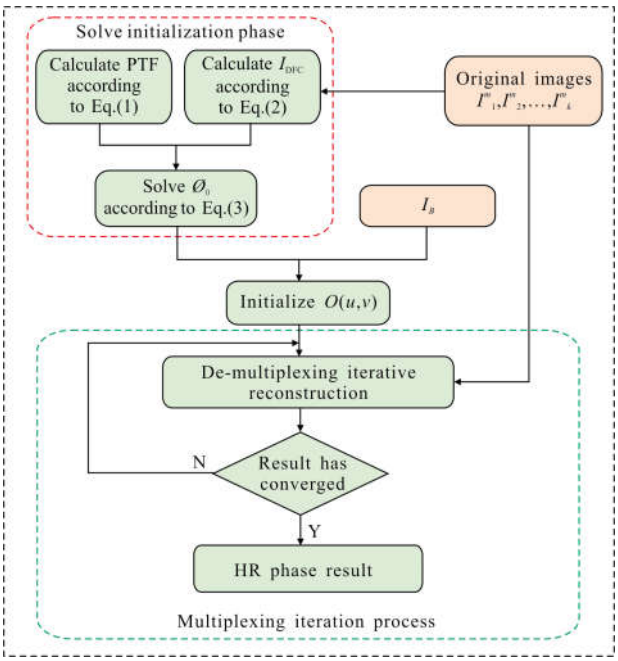

图 11 AADPC 的算法流程图[27]

Fig.11 Algorithm flowchart of AADPC[27]

3.2 DPC 相位重构效率提升方法

除了提升 DPC 的成像质量,针对 DPC 成像的另一个改进在于提升其成像效率。理论来说,DPC 成像最少可以通过单个方向的轴照明实现。

但是由于单轴照明沿不对称轴方向上相位传递函数几乎全部为 0,只能恢复得到固定频率的相位信息(如图 4 所示),所以并没有研究采用这个方案实现 DPC 相位重构。传统 DPC 成像在成像质量和成像效率中进行了权衡,往往采用两轴照明(4 幅图像),在保证成像速度的同时获得了较好的成像结果。虽然该方案成像效率远高于 FPM 等多幅图像迭代重构方法,但对于快速运动的生物样品,采集的 4 幅图像会存在运动位移,成像结果仍然存在严重的运动伪影。针对这一问题,国内外学者们通过两种方式来解决 DPC 成像的运动伪影:(1) 通过补偿算法消除运动伪影;(2) 减少 DPC 所需的采集图像数量,实现 2 帧甚至单帧测量。

2018 年,Kellman 等[52]提出了一种基于彩色复用照明的运动伪影补偿算法,方法原理图显示在图 12 中。该方法在传统 DPC 的 2 轴照明图案中引入另一个颜色通道作为参考通道,该通道图像被用来估计四幅采集图像间样品的动态变化,从而补偿 DPC 的运动伪影。图 12(a)显示了该方法的图像采集过程,其中红色通道照明对应的采集图像作为参考图像,2 轴的不对称绿色照明采集四幅 DPC 图像。由于红色照明始终不变,采集图像中样品的运动可以被定量化地估计。在 DPC 求解样品相位时,采用估计的样品运动量校正采集的四幅 DPC 图像,得到了图 12(c)所示的相位结果。对比可以发现,当未消除运动伪影时,由于四幅采集图像直接的运动误差,重构相位存在严重的相位伪影。而经该方法补偿校正后,由样品运动而产生的重构相位误差被有效地消除,得到接近真值的可靠的相位结果。通过对快速运动的线虫进行动态定量相位成像证明了该方法的有效性。实验结果表明:该方法可以有效去除快速运动样品的

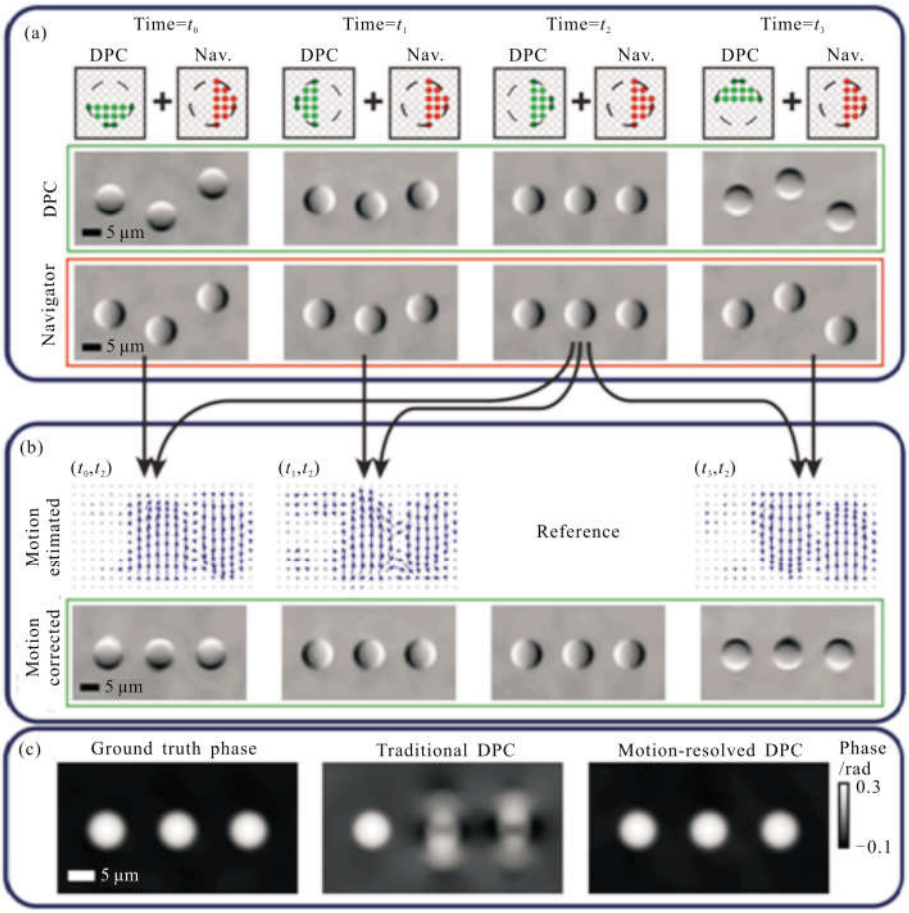

图 12 运动伪影补偿 DPC 成像方法[52]。(a)仿真的 DPC 图像(绿色框)和导航图像(红色框),样本由三个聚苯乙烯珠组成:一个位置固定,一个向上移动,一个向下移动;(b)在每个时间点和参考时间点之间的运动估计(T=t_2);(c)重构相位结果

Fig.12 Motion artifact compensation DPC imaging method[52]. (a) Simulations of the captured DPC images (green box) and the navigator images(red box) with a sample comprised of three polystyrene beads: one stationary, one moving up, and one moving down; (b) motion is estimated between each time point and the reference time point (T=t_2); (c) reconstructed phase result

运动伪影,使 DPC 成像获得清晰可靠的动态观察结果。

另一种提升 DPC 成像效率更加直接的方法是通过彩色复用照明来减少 DPC 采集图像的数量。2015 年,Lee 等[25]在同一照明轴方向上利用颜色不同的两个半圆形同时照射样品采集一幅图像,通过分离图像通道并计算该轴上的差分相衬图像用于相位重构。通过彩色复用照明,2 轴 DPC 的重构图像数量由四幅减少到两幅。随后,DPC 定量相位方法的采

集图像数量进一步被减少到单帧。2017 年,Phillip 等[53]采用自主设计的成本低廉的彩色滤光片实现了单帧的 DPC 定量相位成像。如图 13 所示,显示该系统的原理和实验图。图 13(a)为系统的原理光路图,打印的彩色滤光片(图 13(d))被放置在聚光镜的前焦面对光源进行调制。透过样品的光线经物镜在彩色相机形成一幅彩色图像。对该彩色图像进行三通道分解得到如图 13(c)所示的三幅强度图像。这三幅强度图像被用于相位重构获得样品的定量相位结果,如图13(c)所示。对比微透镜阵列的相位结果,该单帧 DPC 方法获得了与相位真值一致的重构相位。利用 LED 阵列同样可以实现单帧 DPC 定量相位成像。Lee 等[28]通

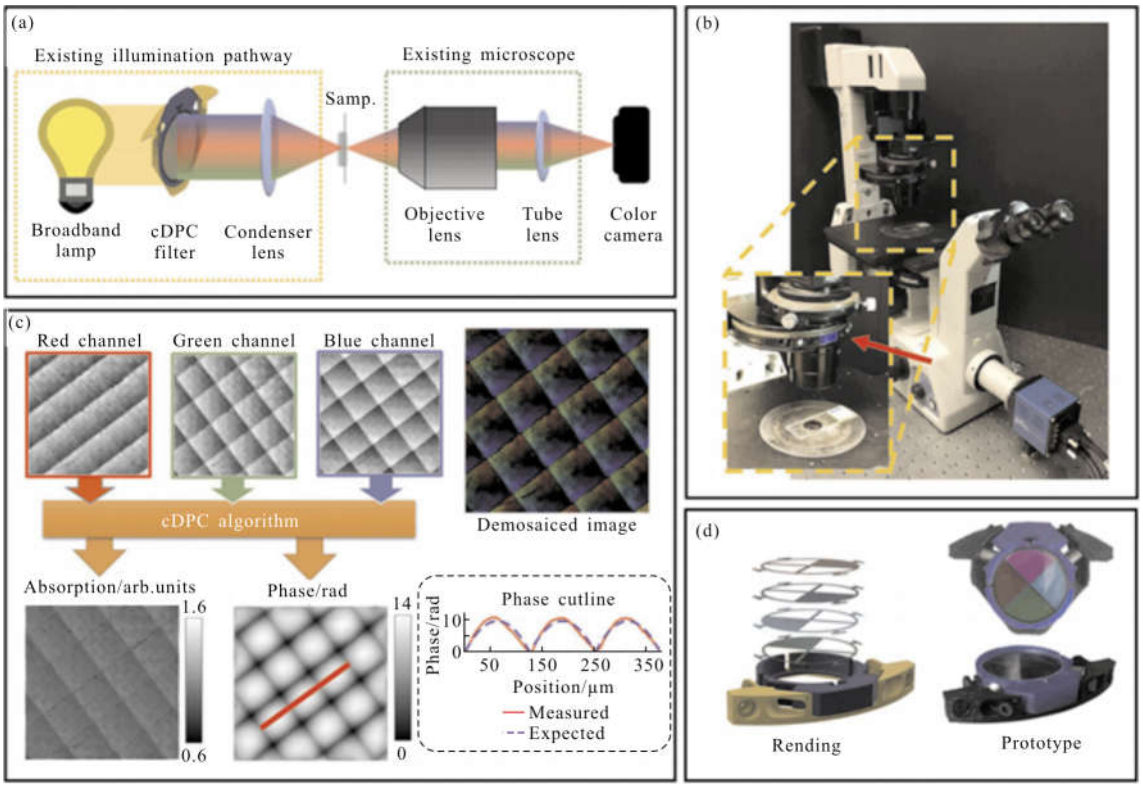

图 13 单镜头彩色 DPC 显微镜[53]。(a)系统光路示意图;(b)实验系统图;(c)重构的定量相位结果;(d)彩色滤光片

Fig.13 Single-shot color differential phase contrast microscopy[53]. (a) Schematic of system light path; (b) experimental system diagram; (c) reconstruction quantitative phase results; (d) color filter

过调控 LED 阵列使其同时显示三个均匀分布的 R,G,B 扇形照明,采集一幅彩色图像,经通道分离后同样实现了单帧 DPC 定量相位重构。

3.3 DPC 成像通量提升方法

在显微成像领域,高通量显微成像也是显微成像方法的研究热点,它可以在不同的领域对大量细胞中的多样化特性进行高质量的定量分析,例如药物发现个性化基因组学,癌症诊断和药物开发等。为了实现高通量成像,2012 年 Zheng 等[19]提出了基于合成孔径和相位复原的傅里叶叠层成像算法(FPM)。该方法利用可编程 LED 阵列实现多个角度照明,在每个照明角度下采集一幅低分辨率的图像。当照明角度 NA_{ill} 小于物镜 NA_{obj} 时,采集图像为明场图像。当照明角度 NA_{ill} 大于物镜 NA_{obj} 时,采集图像为暗场图像。不同的照明角度对应样品频谱在频域中的位移,利用照明角度与样品频率的对应关系,采用非线性优化方法进行迭代重构样品的高分辨率频谱,得到高通量的成像结果。该方法的成像分辨率由合成的数值孔径决定 $NA=NA_{obj}+NA_{ill}$,突破了物镜的光学衍射极限。然而,该方法的迭代过程需要对多幅采集图像进行多次迭代更新,成像速度较慢。这使它的应用受到了限制。

从算法原理来看,DPC 和 FPM 两种方法都是基于倾斜照明的相位恢复算法，并且具有完全相同的系统结构，都是基于传统明场显微镜改造的，采用 LED 阵列来替代传统显微镜的汞灯光源。DPC 通过不对称的多个 LED 同时照明样品采集图像，而 FPM 方法采集每个 LED 照明角度下的低分辨率图像。从本质上来看,FPM 的采集图像可以根据照明图案叠加得到 DPC 对应的差分相衬图像。因此,FPM 方法经常被引入到 DPC 成像方法中扩展 DPC 的成像通量。

2015 年,Tian 等[54]将 FPM 成像方法引入 DPC技术中,采用合成孔径方法在 DPC 中合成更多的暗场细节信息,大大提升了 DPC 的相位重构精度,实现了活细胞高分辨率成像。该方法在明场下采集不对称照明下的四幅 DPC 图像。在暗场中,采用照明复用的思想采集图像来减少暗场图像的数量。整个图像采集过程在 0.8 s 内完成。相位恢复算法流程为:首先,采用传统 DPC 的反卷积线性求解得到明场下的重构相位并采用该相位结果初始化高分辨率频谱。接下来,对暗场图像采用基于 FPM 复用迭代方法迭代更新对应的子孔径频谱，获得扩展的高分辨率频谱,实现超过部分相干衍射分辨率极限 $2NA_{obj}$ 的成像分辨率。经实验对比验证,该方法获得了更高的成像分辨率,同时实现了快速活细胞成像。图 14 给出了该方法的示意图,图 14(a)是实验系统图,图 14(b)显示了该方法的图像采集过程。

在此基础上,Sun 等[55]分析了成像系统在倾斜照明下的相位传递函数，进一步提出基于彩色复用照明的单帧定量相位成像方法。采用倾斜照明时,照明 NA_{ill} 与物镜 NA_{obj} 相等的环上的 LED 单元提供了最强的相位传递响应。基于这个结论,他们采用三个均匀分布的 LED 单元使其显示 R,G,B 三种颜色的照明光同时照明样品采集一幅彩色图像。对该彩色图像进行通道分离得到三幅强度图像来实现相位重构。首先,采用 DPC 的反卷积相位重构算法得到初始化高分辨率频谱。接下来,采用三个颜色对应的强度图像进行迭代更新,得到高分辨率频谱。最后,采用傅里叶逆变换得到样品的高分辨率相位分布。通过仿真和实验证明，该方法实现了相机帧率的相位重构速度并获得了高质量的相位结果。除此之外，3.1.3 小节中介绍的 AADPC 方法同样采用 FPM 扩展了 DPC 的成像通量[27]。

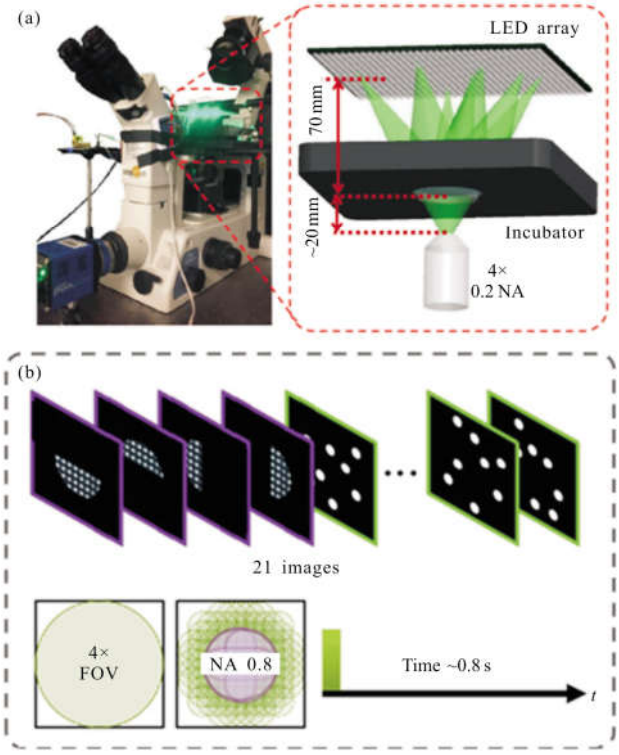

图 14 高通量定量相位成像方法[54]。(a)实验系统与光路示意图;(b)图像采集流程

Fig.14 High-throughput quantitative phase imaging method[54]. (a) Experimental system and optical path diagram; (b) image acquisition process

3.3 二维 DPC 相位恢复方法的典型应用

由于生物细胞的弱吸收性，它在传统显微镜下表现出很低的对比度。现代生物学、医疗诊断等领域往往通过染色或者荧光标记的方法使其在显微镜下可见。但是标记带来的光毒性和光污染对细胞活性产生了不利的影响。定量相位成像技术的出现提供了有力的无标记定量研究手段。但是比较来看,不同的定量相位成像方法具有不同的成像特性，使得它们适用于不同的实验条件和实验样品。在众多的定量相位成像方法中,DPC 可以说是最有前景的方法之一,原因主要体现在两点:其一,DPC 仅需采集很少的图像甚至单帧图像实现相位重构，成像速度非常快,这使得它非常适用于快速运动的样品;其二,DPC 采用部分相干成像的原理,相位恢复算法简单,成像分辨率高且具有高的鲁棒性。接下来介绍 DPC 定量相位成像的典型应用。

根据世界卫生组织(WHO)的报告,癌症是世界上导致疾病和死亡的主要原因之一,2012 年全球有

820 万人死于癌症。而面对癌症,仍以早期确诊治疗为主，如何及时发现提早治疗是目前癌症治疗研究的关键。对于癌症的检测诊断来说,组织中的结构信息具有巨大的诊断潜力，如细胞和组织中各种结构之间的折射率差异。涉及单个活细胞的研究同样非常重要，因为在恶性转化期间细胞发生的变化可以通过研究形态学、膜动力学以及细胞折射指数来量化。DPC 定量相位成像为癌症组织和细胞的研究提供了一种可靠的检测手段。一方面,通过测量与组织折射率相关的相位，可以检测组织结构中纳米级的变化,同时提供结构信息[56]。另一方面,DPC 定量相位成像可以测量纳米级灵敏度的细胞膜动力学,获取细胞中的物理性质。如图 15 显示了 DPC 方法观察宫颈癌细胞(HeLa)的实验结果[46]。图 15(a)显示了全视场的定量相位图像,图 15(b)和 15(c)显示了两个感兴趣子区域的细节放大图,通过观察这两个图像可以清楚地观察到宫颈癌细胞的形态变化和亚细胞结构。随后,采集 1 h 内宫颈癌细胞的 DPC 图像实现动态定量相位成像，不同时间段的重构相位显示在图 15(d)中。如图所示,宫颈癌细胞在分裂过程中的所有形态学变化都被完整地记录,根据癌症细胞的变化特征可以判断其是否恶化,为医生诊断提供依据。

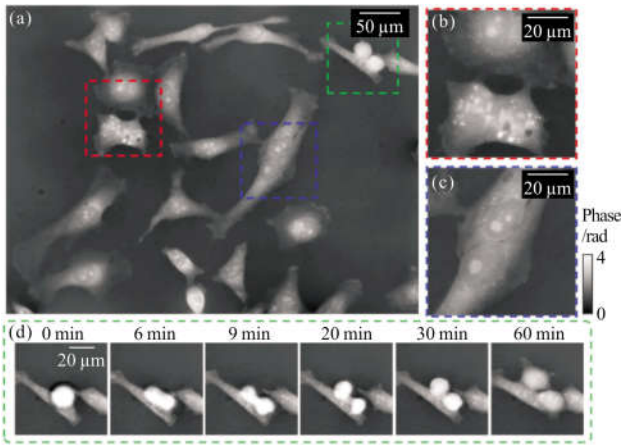

图 15 最优照明 DPC 对 Hela 细胞的实验结果[46]。(a)全视场重构相位结果;(b)、(c)红色和蓝色感兴趣区域的细节放大图;(d)1 h 内细胞分裂的重构相位结果

Fig.15 Experimental results of the optimal illumination DPC on Hela cells[46]. (a) Full field reconstruction phase; (b), (c) magnified view of the details of the red and blue regions of interest; (d) reconstruction phase results within 1 hour

20 世纪 60 年代，分子遗传学的奠基人之一 Sydney Brenner[57]首次以秀丽隐杆线虫为研究对象揭示了个体及神经发育的遗传调控机制。随着人们对其的研究日益深入，秀丽隐杆线虫以其独特的优势逐渐成为当代生命科学研究中的一个重要的模式生物。它是一种生命周期短的多细胞生物,这种生物个体小,容易培养,可如同微生物一样进行大批量操作的条件,同时构成身体的细胞数量相对较少,可以对细胞的形态和谱系进行穷尽性研究。近年来,基于秀丽隐杆线虫与人类在多种生命活动调控机制上的相似性，采用秀丽线虫为动物模型进行药物筛选逐渐成为药物研究的热点。通过向秀丽隐杆线虫提供病原微生物，使线虫摄入并观察其生命活动来观测药物反应。然而,秀丽隐杆线虫具有非常快的运动速度，如何对其进行实时动态的亚细胞结构研究一直是国内外学者非常关心的问题。DPC 成像的高分辨率和快速成像的能力为线虫的研究提供了有力的手段[52]。图 16 展示了采用 DPC 定量相位成像方法对快速运动的线虫进行动态成像的结果。如图 16(a)所示为线虫的振幅和相位成像结果。选择其中的局部区域进行放大来比较细节信息。如图 16(b)和图 16(c)所示,即使线虫快速运动,DPC 成像也能获得没有伪影的定量相位结果,局部细节清晰可见。

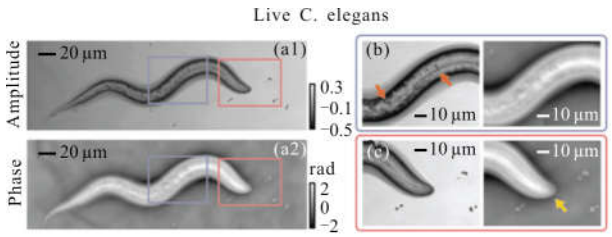

图 16 快速移动的秀丽隐杆线虫的 DPC 成像实验结果[52]。(a1)、(a2)线虫的振幅和相位结果;(b)、(c)成像结果的放大图

Fig.16 Experimental results for DPC with fast-moving live C. elegans[52]. (a1),(a2) Amplitude and phase results of the live C. elegans; (b),(c) zoom-ins images of imaging results

4 三维差分相衬成像方法

在上面的章节介绍的 DPC 方法中,往往以采集图像作为聚焦图像进行计算,离焦的影响被忽略。但对一些较厚的样品进行成像时，受制于物镜景深的

影响，单个聚焦面的采集图像通常难以得到样品的厚度信息。为了解决这个问题，一些三维差分相衬成像方法被提出，采用 DPC 成功实现了对厚样品三维定量信息的测量。

4.1 三维差分相衬相位梯度成像

为了实现样品三维相位梯度信息的获取，光场重聚焦的方法被引入 DPC 方法中[30]。该方法通过依次扫描 LED 阵列采集多幅样品图像，照度角(θ_x,θ_y)与 LED 的位置(x_i,y_i)相关，表示为 $\tan\theta_x=x_i/f$，$\tan\theta_y=y_i/f$ (f 为聚光镜的焦距)。使用光场重聚焦的原理对这些收集的图像数据进行处理，如图 17 所示，即通过照明角度与离焦距离的投影关系得到不同焦面的样品图像，其对应于两个空间和两个角度变量的 4D 数据矩阵，类似于光场相机的 4D 数据矩阵。采用一个简单的位移和叠加对该数据集进行处理来消除球形强度扩散的几何离焦效应，其中距实际焦平面距离 Δz 的深度上的图像 (对应于每个 LED) 位移量由 $\Delta x=\Delta z\tan\theta_x$，$\Delta y=\Delta z\tan\theta_y$ 确定。通过简单地叠加相应的移

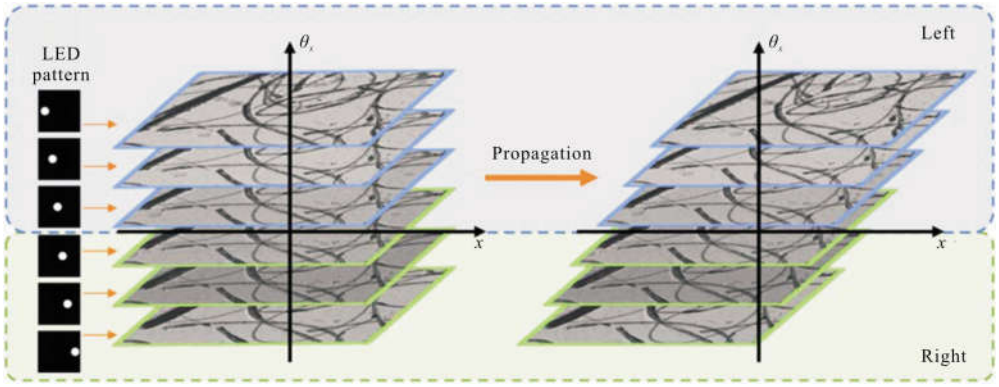

图 17 3D 定性 DPC 原理示意图[30]

Fig.17 Schematic diagram of 3D qualitative DPC[30]

位图像(对应的 DPC 照明图案的 LED)来合成仅具有不对称照明的离焦强度图像。计算每个 z 平面上样品的相位梯度图像得到样品的三维相位梯度信息。

4.2 差分相衬三维衍射层析成像方法

厚样品的三维定量研究也是显微成像领域的研究热点。共聚焦显微镜[58]和双光子显微镜[59]常被用来实现对厚样品的三维定量测量。但是这两种方法却都存在一些缺陷。共聚焦显微镜采用激光对样品进行逐点扫描成像，成像速度较慢。而双光子显微镜的信号随深度呈指数递减。衍射层析技术 (Diffraction tomography) 通过测量细胞和组织的三维折射率分布，逐渐成为目前常用的测量厚样品的显微成像方法。经典的三维衍射层析成像通常需要两个步骤：首先，计算每个角度相干照明的二维相位积累，第二，将这些数据输入层析成像算法实现断层扫描三维重建，最终获得样品的三维层析图像。目前，针对这一研究方向，国内外学者提出了多种衍射层析成像算法。2015 年，Tian 等[60]采用 LED 阵列采集多幅样品的光场强度图像，通过多层传播和迭代的方法成功恢复出样品的三维层析结果。随后，基于 FPM 的断层成像方法也被提出[61-62]。该方法同样采集多个角度的图像恢复样品的三维频谱，得到了样品的层析结果。然而，这些方法都需要采集多幅图像，成像速度较慢，同时迭代恢复过程较为复杂。

Chen 等[29]将 DPC 方法扩展到衍射层析断层扫描成像领域，大大减少了所需的采集图像数量。该方法采用传统 DPC 的 2 轴不对称照明照射样品，采集样品在不同聚焦面上的四幅图像。根据 Born 近似，强度数据通过照明的传递函数与 3D 折射率分布相关。通过求解成像系统在不同焦面上每一个 z 平面的三维吸收和相位传递函数，后利用反卷积算法即可以恢复样品在不同 z 面上的定量相位分布。该方法的横向分辨率为相干衍射极限分辨率的 2 倍，即 $\lambda/2\mathrm{NA}_{\mathrm{obj}}$，轴向分辨率由物镜 $\mathrm{NA}_{\mathrm{obj}}$ 决定 $\lambda/(1-\sqrt{1-\mathrm{NA}_{\mathrm{obj}}^2})$。图 18 显示了该方法的实验系统图。可以看到，照明光源被 LED 阵列替代，同时采用轴向位移台来对样品进行轴向扫描采集不同 z 的样品图像。与传统基于 LED

阵列的二维 DPC 方法一样,LED 阵列显示四个照明图案(顶部、底部、右侧和左侧半圆)捕获通过焦点的强度堆栈。根据 Born 近似或者 Rytov 近似[63],样品强度数据通过传递函数与 3D 折射率分布相关,则采用反卷积算法即可得到图 18(c)所示样品的三维傅里叶频谱,从而恢复样品的三维折射率分布(图 18(d))。

为了对比二维相位恢复方法与三维层析成像方法的成像结果,采用 TIE、DPC 和 3D DPC 对人乳腺上皮细胞进行成像,对比图像显示在图 18(a)和图 18(b)中。由于对厚样品进行成像,二维相位恢复方法的结果细节信息较少, 而 3D DPC 可以清晰地获得不同焦深上样品的细节,提供了更加丰富的样品信息。

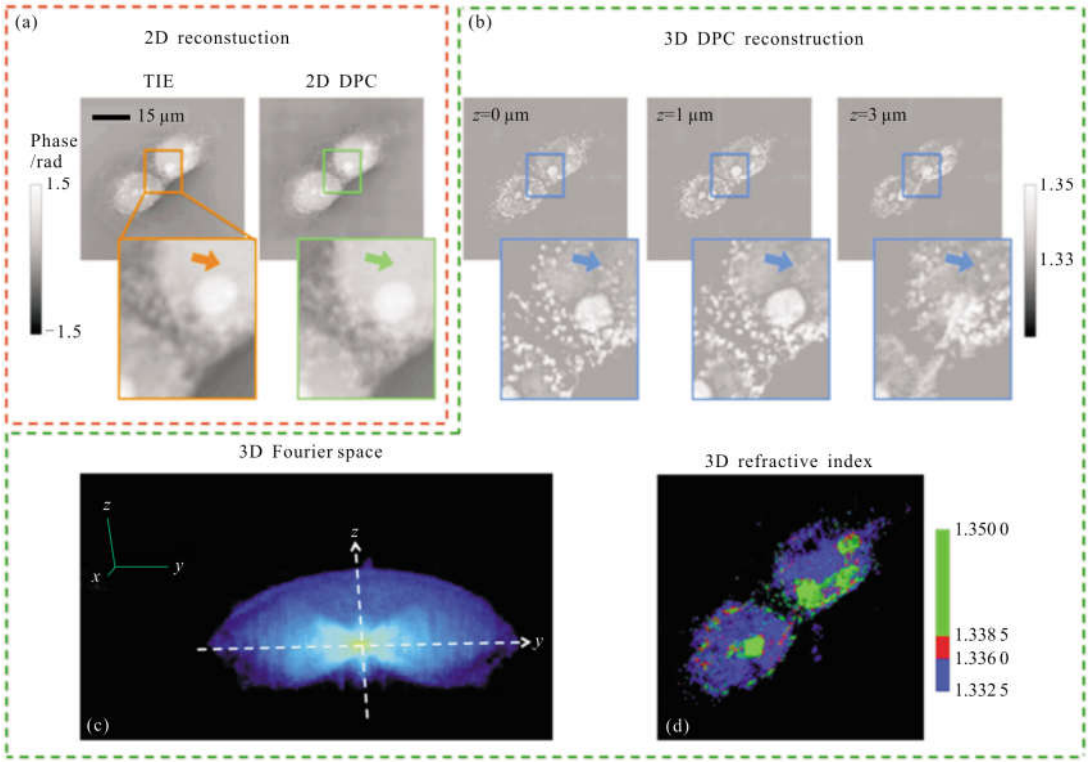

图 18 3D DPC 对人乳腺上皮细胞的实验结果[29]

Fig.18 Experimental results of a human mammary epithelial MCF10A cell by 3D DPC[29]

5 结 论

纵观显微镜发展历程,DPC 方法的理论被不断被研究, 使其从最早的定性观察到定量研究再到现在的三维层析成像。文中系统地综述了差分相衬成像方法的发展历程、研究现状,重点介绍了 DPC 方法在各个发展阶段的研究成果。这些研究工作不仅完善了 DPC 成像的理论体系,还为光学显微领域的研究人员提供了一种新的影像学手段。与其他显微成像方法相比,DPC 具有以下的优势。

(1) 系统结构简单,易于搭建改造。DPC 系统依赖于现有商业显微镜搭建而成, 只需将原有的光源替换为可编程 LED 阵列,系统成本低。

(2) 采用部分相干成像,成像分辨率高,可达到相干衍射分辨率极限的两倍,且系统鲁棒性高,能够获得稳定可靠高分辨率的成像结果。

(3) 仅需 2 轴或者 1 轴照明采集图像并采用一步反卷积直接重构样品相位, 与其他定量相位方法相比,成像效率高,能够实现快速甚至实时成像。

DPC 成像已在光学显微、生物医学、生命科学等领域展现了巨大的潜力,取得了显著的成果。总结来看 DPC 是一种非常简单有效的显微成像方法,为细胞生物学、医药研发、病理诊断等领域提供强大的工具。但是,其仍存在一些问题待解决。

在 DPC 成像中, 只有照明 NA_{ill} 与物镜 NA_{obj} 相等的环上的照明角度才能产生好的低频传递响

应。然而在真实的实验系统中,这些照明下的采集图像存在严重的渐晕效应,导致严重的图像背景不均匀。目前并没有研究针对这个实际问题进行研究。

采用 DPC 成像技术进行定量相位成像时有一个必要的前提条件,那就是假设待测样品是弱相位样品。那么待测样品的相位到底在多大的范围内才能使用弱物体近似来确保 DPC 定量相位成像结果的准确性,目前并没有文献对此进行定量的研究。更进一步,弱相位近似和缓变相位近似对 DPC 定量相位测量精度的影响也并不明了。

除了解决上述关键问题以外,针对 DPC 成像技术,单帧各向同性 DPC 定量相位成像是目前值得研究的重要方法。采用单次曝光采图实现各向同性分辨率和信噪比的相位重构结果,将 DPC 定量相位成像的成像效率和成像性能提升至最优,这将为生物细胞动态成像提供强大的检测方法。

参考文献:

[1] Mertz J. Introduction to Optical Microscopy [M]. Colorado: Roberts, 2010: 138.

[2] Arnison M R, Larkin K G, Sheppard C J R, et al. Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy[J]. ***Journal of Microscopy***, 2004, 214(1): 7.

[3] Zernike F. How I discovered phase contrast [J]. ***Science***, 1955, 121(3141): 345-349.

[4] Burch C, Stock J. Phase-contrast microscopy [J]. ***Journal of Scientific Instruments***, 1942, 19(5): 71.

[5] Hamilton D, Sheppard C. Differential phase contrast in scanning optical microscopy [J]. ***Journal of Microscopy***, 1984, 133(1): 27.

[6] Hamilton D K, Sheppard C J R, Wilson T. Improved imaging of phase gradients in scanning optical microscopy [J]. ***Journal of Microscopy***, 1984, 135(3): 275.

[7] Kim Y, Shim H, Kim K, et al. Profiling individual human red blood cells using common-path diffraction optical tomography[J]. ***Scientific Reports***, 2014, 4: 6659.

[8] Popescu G. Quantitative phase imaging of nanoscale cell structure and dynamics [J]. ***Methods in Cell Biology***, 2008, 90: 87-115.

[9] Mann C J, Yu L, Lo C M, et al. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography [J]. ***Optics Express***, 2005, 13(22): 8693.

[10] Marquet P, Rappaz B, Magistretti P J, et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy [J]. ***Optics Letters***, 2005, 30(5): 468.

[11] Kemper B, von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection [J]. ***Applied Optics***, 2008, 47(4): A52.

[12] Kou S S, Waller L, Barbastathis G, et al. Transport-of-intensity approach to differential interference contrast (TI-DIC) microscopy for quantitative phase imaging [J]. ***Optics Letters***, 2010, 35(3): 447-449.

[13] Petruccelli J C, Tian L, Barbastathis G. The transport of intensity equation for optical path length recovery using partially coherent illumination [J]. ***Optics Express***, 2013, 21 (12): 14430-14441.

[14] Zuo C, Chen Q, Qu W, et al. High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens [J]. ***Optics Express***, 2013, 21(20): 24060-24075.

[15] Zuo C, Chen Q, Qu W, et al. Noninterferometric single-shot quantitative phase microscopy [J]. ***Optics Letters***, 2013, 38 (18): 3538-3541.

[16] Zuo C, Chen Q, Yu Y, et al. Transport-of-intensity phase imaging using Savitzky-Golay differentiation filter-theory and applications[J]. ***Optics Express***, 2013, 21(5): 5346-5362.

[17] Pfeiffer F, Weitkamp T, Bunk O, et al. Phase retrieval and differential phase-contrast imaging with low-brilliance X-ray sources[J]. ***Nature Physics***, 2006, 2(4): 258.

[18] Mehta S B, Sheppard C J R. Quantitative phase-gradient imaging at high resolution with asymmetric illumination-based differential phase contrast [J]. ***Optics Letters***, 2009, 34 (13): 1924.

[19] Zheng G, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Nature Photonics***, 2013, 7(9): 739.

[20] Ou X, Horstmeyer R, Yang C, et al. Quantitative phase imaging via Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(22): 4845-4848.

[21] Tian L, Li X, Ramchandran K, et al. Multiplexed coded illumination for Fourier Ptychography with an LED array microscope [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2014, 5 (7): 2376-2389.

[22] Zuo C, Sun J, Chen Q. Adaptive step-size strategy for noise-

robust Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2016, 24(18): 20724-20744.

[23] Sun J, Zuo C, Zhang L, et al. Resolution-enhanced Fourier ptychographic microscopy based on high-numerical-aperture illuminations[J]. ***Scientific Reports***, 2017, 7(1): 1187.

[24] Tian L, Waller L. Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(9): 11394.

[25] Lee D, Ryu S, Kim U, et al. Color-coded LED microscopy for multi-contrast and quantitative phase-gradient imaging[J]. ***Biomedical Optics Express***, 2015, 6(12): 4912.

[26] Lee W, Choi J H, Ryu S, et al. Color-coded LED microscopy for quantitative phase imaging: Implementation and application to sperm motility analysis [J]. ***Methods***, 2018, 136: 66-74.

[27] Fan Y, Sun J, Chen Q, et al. Wide-field anti-aliased quantitative differential phase contrast microscopy [J]. ***Optics Express***, 2018, 26(19): 25129.

[28] Lee W, Jung D, Ryu S, et al. Single-exposure quantitative phase imaging in color-coded LED microscopy [J]. ***Optics Express***, 2017, 25(7): 8398.

[29] Chen M, Tian L, Waller L. 3D differential phase contrast microscopy[C]//SPIE, 2016, 9718: 971826.

[30] Tian L, Wang J, Waller L. 3D differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an LED array[J]. ***Optics Letters***, 2014, 39(5): 1326.

[31] Zheng G, Kolner C, Yang C. Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array [J]. ***Optics Letters***, 2011, 36(20): 3987.

[32] Zuo C, Sun J, Feng S, et al. Programmable Colored Illumination Microscopy (PCIM): A practical and flexible optical staining approach for microscopic contrast enhancement [J]. ***Optics and Lasers in Engineering***, 2016, 78: 35-47.

[33] Iglesias I. Pyramid phase microscopy [J]. ***Optics Letters***, 2011, 36(18): 3636.

[34] Zuo C, Sun J, Feng S, et al. Programmable aperture microscopy: A computational method for multi-modal phase contrast and light field imaging [J]. ***Optics and Lasers in Engineering***, 2016, 80: 24-31.

[35] Parthasarathy A B, Chu K K, Ford T N, et al. Quantitative phase imaging using a partitioned detection aperture [J]. ***Optics Letters***, 2012, 37(19): 4062.

[36] Barankov R, Mertz J. Single-exposure surface profilometry using partitioned aperture wavefront imaging [J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(19): 3961.

[37] Iglesias I, Vargas-Martin F. Quantitative phase microscopy of transparent samples using a liquid crystal display[J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2013, 18(2): 026015.

[38] Lu H, Chung J, Ou X, et al. Quantitative phase imaging and complex field reconstruction by pupil modulation differential phase contrast[J]. ***Optics Express***, 2016, 24(22): 25345.

[39] Ford T N, Chu K K, Mertz J. Phase-gradient microscopy in thick tissue with oblique back-illumination [J]. ***Nature Methods***, 2012, 9(12): 1195-1197.

[40] Ford T N, Mertz J. Video-rate imaging of microcirculation with single-exposure oblique back-illumination microscopy [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2013, 18(6): 066007.

[41] Jung D, Choi J H, Kim S, et al. Smartphone-based multi-contrast microscope using color-multiplexed illumination [J]. ***Scientific Reports***, 2017, 7(1).

[42] Rose H. Nonstandard imaging methods in electron microscopy [J]. ***Ultramicroscopy***, 1976, 2: 251.

[43] Bertero M, Boccacci P. Introduction to Inverse Problems in Imaging[M]. Florida: CRC Press, 1998.

[44] Lin Y Z, Huang K Y, Luo Y. Quantitative differential phase contrast imaging at high resolution with radially asymmetric illumination[J]. ***Optics Letters***, 2018, 43(12): 2973-2976.

[45] Chen H H, Lin Y Z, Luo Y. Isotropic differential phase contrast microscopy for quantitative phase bio-imaging [J]. ***Journal of Biophotonics***, 2018, 11(8): e201700364.

[46] Fan Y, Sun J, Chen Q, et al. Optimal illumination scheme for isotropic quantitative differential phase contrast microscopy[J]. arXiv preprint arXiv, 2019: 1903.10718.

[47] Li J, Chen Q, Sun J, et al. Optimal illumination pattern for transport-of-intensity quantitative phase microscopy[J]. ***Optics Express***, 2018, 26(21): 27599-27614.

[48] Zuo C, Sun J, Li J, et al. High-resolution transport-of-intensity quantitative phase microscopy with annular illumination[J]. ***Scientific Reports***, 2017, 7(1): 7654.

[49] Kellman M, Bostan E, Repina N, et al. Physics-based learned design: optimized coded-Illumination for quantitative phase imaging [J]. ***IEEE Transactions on Computational Imaging***, 2019: 1.

[50] Chen M, Phillips Z F, Waller L. Quantitative differential phase contrast (DPC) microscopy with computational aberration correction[J]. ***Optics Express***, 2018, 26(25): 32888.

[51] Sun J, Chen Q, Zhang Y, et al. Sampling criteria for Fourier

ptychographic microscopy in object space and frequency space[J]. ***Optics Express***, 2016, 24(14): 15765.

[52] Kellman M, Chen M, Phillips Z F, et al. Motion-resolved quantitative phase imaging [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2018, 9(11): 5456.

[53] Phillips Z F, Chen M, Waller L. Single-shot quantitative phase microscopy with color-multiplexed differential phase contrast (cDPC)[J]. ***PLOS ONE***, 2017, 12(2): e0171228.

[54] Tian L, Liu Z, Yeh L H, et al. Computational illumination for high-speed in vitro Fourier ptychographic microscopy[J]. ***Optica***, 2015, 2(10): 904.

[55] Sun J, Chen Q, Zhang J, et al. Single-shot quantitative phase microscopy based on color-multiplexed Fourier ptychography [J]. ***Optics Letters***, 2018, 43(14): 3365.

[56] Majeed H, Sridharan S, Mir M, et al. Quantitative phase imaging for medical diagnosis [J]. ***Journal of Biophotonics***, 2017, 10(2): 177–205.

[57] Brenner S. The genetics of Caenorhabditis elegans [J]. ***Genetics***, 1974, 77(1): 71–94.

[58] Sheppard C, Shotton D, Sheppard C. Confocal Laser Scanning Microscopy[M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1997.

[59] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. ***Nature Biotechnology***, 2003, 21(11): 1369.

[60] Tian L, Waller L. 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope [J]. ***Optica***, 2015, 2(2): 104.

[61] Zuo C, Sun J, Li J, et al. Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography [J]. arXiv preprint arXiv, 2019: 1904.09386.

[62] Horstmeyer R, Chung J, Ou X, et al. Diffraction tomography with Fourier ptychography[J]. ***Optica***, 2016, 3(8): 827.

[63] Sung Y, Choi W, Fang-Yen C, et al. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging [J]. ***Optics Express***, 2009, 17(1): 266.