Optoelectronics 光电子, 2020, 10(4), 140-147
Published Online December 2020 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/oe
https://doi.org/10.12677/oe.2020.104018

Hans汉斯

基于数字全息显微的生物细胞质量密度的测量

张仕文，曾雅楠*，张　轩

天津农学院，工程技术学院，天津
Email: *ynzeng@tju.edu.cn

收稿日期：2020年11月17日；录用日期：2020年12月2日；发布日期：2020年12月9日

摘　要

细胞内部物质成分及浓度的改变是细胞生命研究的重要关注对象，而质量密度是反映细胞内部浓度变化的重要参数。但由于细胞是活体，内部质量密度不能直接测量。但质量密度与细胞透射光相位直接相关。应用数字全息显微技术能够在不接触且不伤害细胞的条件下，定量重构细胞透射光的相位，因此，数字全息显微技术可动态观测细胞内部变化。本文利用透射式数字全息显微系统测量洋葱表皮细胞的光学相位，并进行质壁分离实验，通过观察洋葱表皮细胞相位的变化分析实验过程中细胞内部质量密度的变化趋势及其原因，为定量细胞研究提供一种技术手段。

关键词

细胞，质量密度，数字全息

Measurement of Mass Density of Cells Based on Digital Holographic Microscopy

Shiwen Zhang, Yanan Zeng*, Xuan Zhang

College of Engineering and Technology, Tianjin Agricultural College, Tianjin
Email: *ynzeng@tju.edu.cn

Received: Nov. 17th, 2020; accepted: Dec. 2nd, 2020; published: Dec. 9th, 2020

Abstract

The changes of cell internal material composition and concentration are important objects of concern in the study of cell life, and mass density is an important parameter to reflect the changes of cell internal concentration. Since the cells are alive, the internal mass density cannot be meas-

*通讯作者。

文章引用: 张仕文, 曾雅楠, 张轩. 基于数字全息显微的生物细胞质量密度的测量[J]. 光电子, 2020, 10(4): 140-147.
DOI: 10.12677/oe.2020.104018

ured directly. The mass density is directly related to the phase of transmitted beam. Digital holographic microscopy can be used to quantitatively reconstruct the phase of the transmitted light of the cell without touching or harming the cell. Therefore, digital holographic microscopy can dynamically observe the changes inside the cell. In this paper, the optical phase of onion epidermis was measured by the transmittance digital holographic microscopy system, and the plastic-wall separation experiment was carried out. By observing the phase change of onion epidermis, the variation trend of the mass density inside the cell during the experiment and its reasons were analyzed, which provided a technical means for quantitative cell research.

Keywords

Cell, Mass Density, Digital Holography

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

1. 引言

细胞动态研究是影响生命科学快速发展的一个重要因素[1] [2] [3]。细胞的动态是生命活动的体现，而形态的变化往往伴随着物质成分及浓度的改变。例如相分离[4]，在形成微球结构的同时，蛋白质浓度也发生改变[5]。再比如细胞核蛋白质浓度增大，既可能是细胞分裂的前兆亦可能是细胞癌化的表现[6]。因此细胞内部物质成分及浓度的改变是细胞生命研究的重要关注对象。

质量密度是反映细胞内部物质成分及浓度变化的重要参数，比如，在近年来生物研究的热点——“相分离”的研究中，质量密度可用于准确描述 FUS 蛋白滴或 P 颗粒在线虫细胞中的相分离过程，因此有助于解释与休眠相关的相分离现象[5]。然而细胞是活体，质量密度不能直接测量。但细胞是相位型样本，与细胞的光学定量相位(QP, quantitative phase)成正比的光学厚度是细胞内外形态尺寸与细胞透光折射率(RI, refractive index)耦合的结果，是反映细胞器密度、细胞质以及渗透刺激或生长过程引起的细胞内溶质浓度动态变化的重要生物物理参数[7]，与细胞质量密度直接相关。因此，可通过解析细胞光学厚度分析细胞内部质量密度的变化。

数字全息显微技术能够利用一幅干涉全息图即可对被测样品的物波波前进行完整再现，可同时获取被测样品定量相位信息及光学厚度[8] [9] [10]。应用数字全息显微技术测量生物细胞透射光学厚度，具有无接触、高灵敏度的测量特点。本文利用透射式数字全息显微系统测量洋葱表皮细胞的光学厚度，并进行质壁分离实验，通过观察洋葱表皮细胞光学厚度的变化分析实验过程中细胞内部质量密度的变化趋势及其原因，为定量细胞研究提供一种技术手段。

2. 测量原理

本文采用数字像面全息显微方法测量细胞透射光光学厚度，从而分析细胞质量密度的变化。数字像面全息显微方法与传统数字全息显微方法相比，记录距离为 0，即在细胞聚焦成像面记录数字全息图。因此，不需要进行 Rayleigh-Sommerfeld 衍射计算，直接提取全息图的相位信息即可。利用像面全息重构方法，可以避免衍射重构引入的噪声，提高计算效率。

像面全息图强度为

$$I_H(x,y)=|R|^2+|O|^2+R^*O+O^*R \tag{1}$$

其中 $|R|^2$ 和 $|O|^2$ 为零衍射项，O 为物光虚像 O^* 为物光实像，R 为参考光。因为参考光的入射角度不一样，零级衍射项出现在频谱的中心位置。物光的实像和虚像在频谱中互不重叠。

再现像只需直接提取信息。得到分离出来的后两项的频谱后，使用逆傅里叶变换，模拟参考光并且引入误差，求得含有被测生物样本相位信息的物光虚像。

物波波前函数为

$$U_r(x,y)=\Gamma_{RCH}^{H}F^{-1}\left\{F\left[I_H(x,y)\right]W(f_x,f_y)S(f_x,f_y)\right\} \tag{2}$$

$F[\,]$ 和 $F^{-1}[\,]$ 为傅里叶和逆傅里叶变换函数，$W(f_x,f_y)$ 为窗函数，将 U_iR^* 从全息图的频谱图中滤出。$S(f_x,f_y)$ 是平移函数，用于矫正一次相位畸变。Γ_{RCH}^{H} 为参考面法矫正因子，用于矫正多次相位畸变。

$U_r(x,y)$ 为经过相位矫正后的重构波前函数，用于相位及强度信息提取。

因此，样本相位为

$$\phi(x,y)=\arctan\left\{\frac{\mathrm{Im}\left[U_r(x,y)\right]}{\mathrm{Re}\left[U_r(x,y)\right]}\right\} \tag{3}$$

样本光学厚度 $OPL(x,y)$ 为

$$OPL(x,y)=\lambda\phi(x,y)/2\pi=nd \tag{4}$$

公式(4)中，λ 为光源波长，n 为与质量密度成正比的折射率，d 为几何厚度。

3. 系统与实验

3.1. 透射式数字全息系统

如图 1 所示，激光光源发出波长为 670 nm 的光束通过 NF (中灰镜)调到适宜光强后，被 BS1 (分棱镜)分成物光和参考光。物光通过 M1 (反射镜)反射照射被测物体，后被 MO1 (显微物镜)放大。参考光被 MO2 (显微物镜)放大，MO1 和 MO2 采用相同的显微物镜(Mitutoyo, NA = 0.42，放大倍数为 50 倍)。使用 BS2 (分棱镜)将两束光汇合在 CCD 上，发生干涉，记录数字全息显微图。

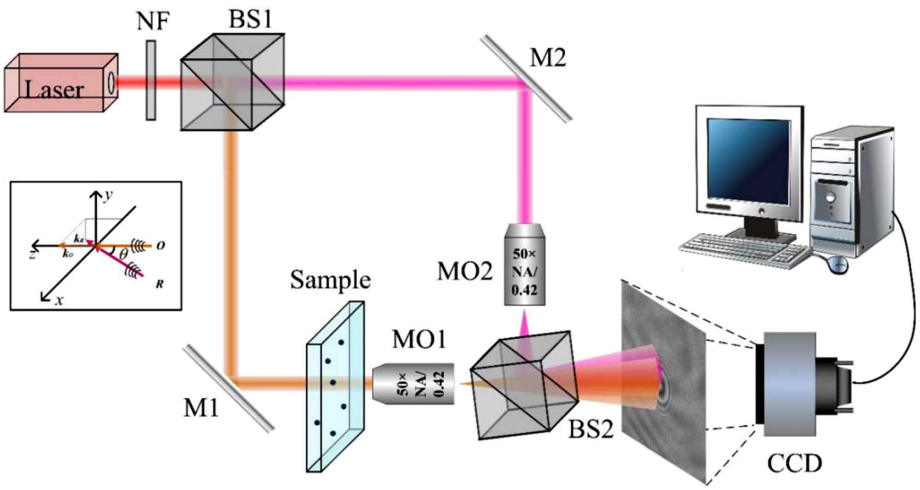


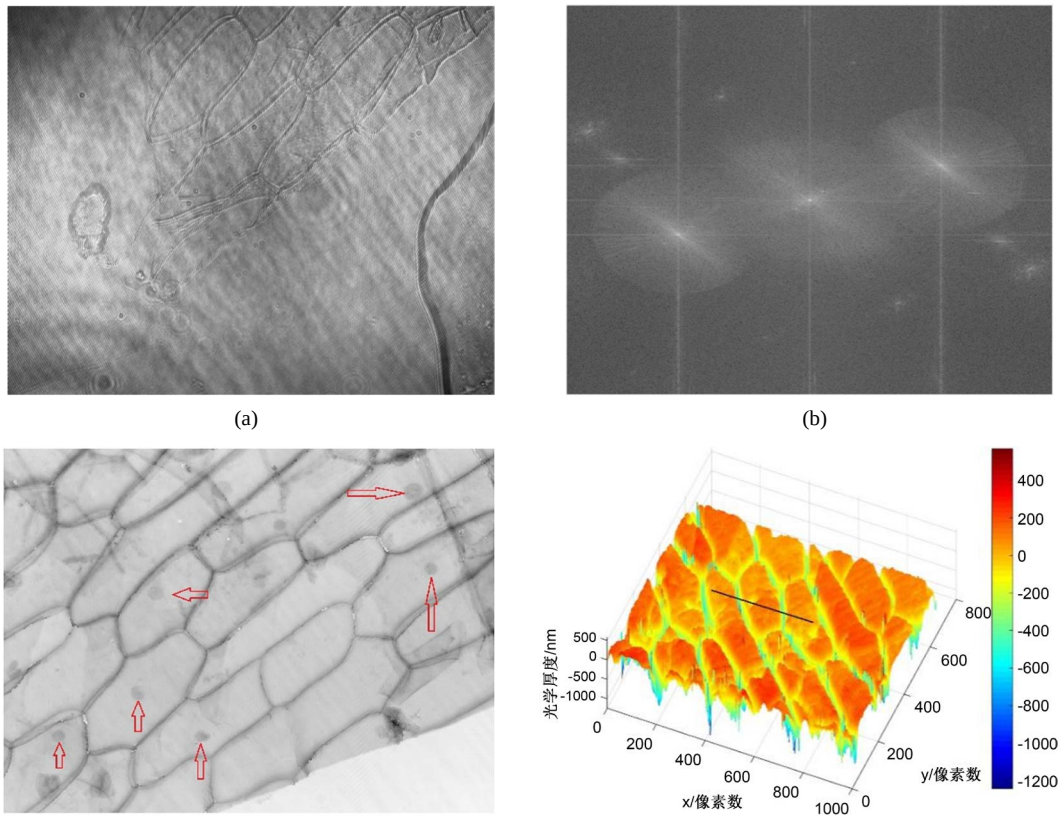
Figure 1. Setup of transmitting digital holographic microscope
图 1. 透射式数字全息显微系统光路图

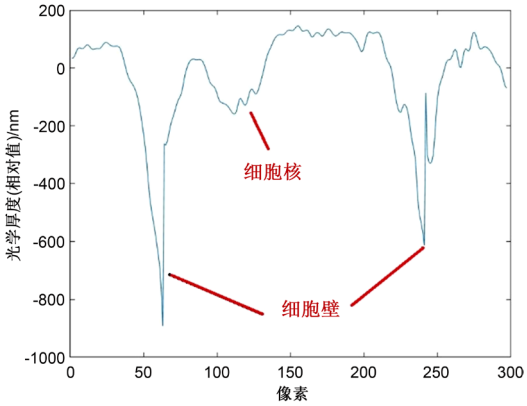
3.2. 洋葱表皮细胞成像实验

洋葱表皮细胞装片制备方法：用移液器将 100 μl 去离子水移至载玻片中央，用镊子撕取一片洋葱表皮放至水滴中央，用盖玻片盖上，装片制作完毕。将装片置于普通显微镜下镜检(凤凰牌，物镜 40×，目镜 16×)，如图 2 所示。

Figure 2. Microscopic image of onion epidermis cells
图 2. 洋葱表皮细胞二维显微镜检图像

可见洋葱细胞二维形貌成狭长状。利用 3.1 节的数字全息显微系统对洋葱表皮细胞进行成像。成像结果如图 3 所示。





(e)

Figure 3. Experimental results of onion epidermis cells (a) Digital hologram (b) Frequency spectrum (c) Reconstructed phase (d) Optical depth of onion epidermis cells (e) Profile line of Figure. 3d

图 3. 洋葱表皮细胞数字全息显微系统成像图(a)数字全息显微图，(b)频谱图(c)重构相位图(d)洋葱细胞光学厚度三维图(e)三维图轮廓线的光学厚度图

如图 3 所示，洋葱表皮细胞的数字全息显微系统成像图中，重构的相位图可看出狭长的洋葱细胞形状，还可见细胞壁、细胞核等结构，如图 3(c)中红色箭头所示为细胞核。计算洋葱细胞的光学厚度图，此光学厚度值，即(样本折射率 − 水折射率) * 样本厚度，如图 3(d)所示。洋葱细胞由细胞质、细胞器等液体和固体物质充满，因此饱满新鲜的洋葱细胞三维结构成鼓胀状，细胞内部的光学厚度高于细胞壁；而细胞核的光学厚度低于周围胞质部分，可得出结论：细胞核内质量密度低于细胞质。此结论与 Schürmann M.发表在国际著名生物期刊 *Journal of biophotonics* 上的论文《Cell nuclei have lower refractive index and mass density than cytoplasm》中细胞核质量密度低于细胞质的结论是一致的。

根据以上对洋葱细胞的静态观测实验中，证明光学厚度是可作为质量密度的对比参数的。

3.3. 洋葱表皮细胞质壁分离实验

将洋葱表皮置于浓度为 25%的糖溶液中，洋葱表皮细胞在普通显微镜下进行镜检。如图 4 所示。可见洋葱表皮细胞发生细胞质与细胞壁的分离现象。

Figure 4. Microscopic image of onion epidermal cells in a sugar solution of 25% concentration

图 4. 浓度为 25%的糖溶液中的洋葱表皮细胞图像

利用数字全息显微系统观察质壁分离的洋葱表皮细胞。如图 5 所示。

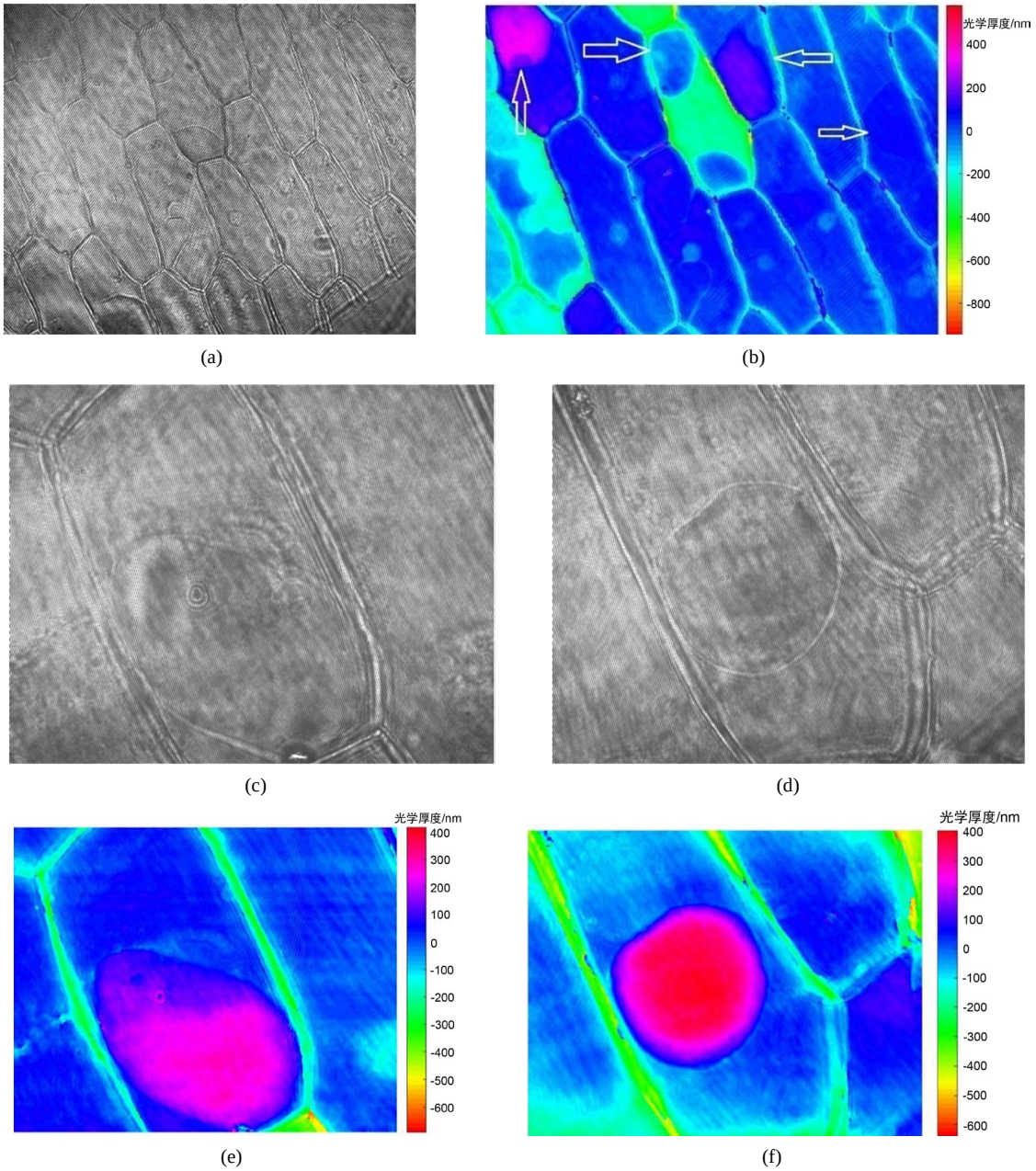


Figure 5. Experimental results of onion epidermal cells with parenchymal separation in a 25% sugar solution (a) digital hologram (10×) (b) optical depth of Figure 4a ((c), (d)) digital holograms (50×) ((e), (f))optical depth of Figure 4((c), (d))

图 5. 25%浓度糖溶液中发生质壁分离的洋葱表皮细胞成像图(a)为 10×显微物镜下洋葱表皮细胞的数字全息显微图(b)图(a)的重构光学厚度图((c), (d))为 50×显微物镜下细胞数字全息显微图((e), (f))图((c), (d))的重构光学厚度图

如图 5(b)，图 5(e)，图 5(f)所示，光学厚度图能够清晰观察到质壁分离现象，图 5(b)中白色箭头标示了 10×物镜视场中发生质壁分离的细胞。

根据生物原理，质壁分离并未破坏细胞膜结构，在体积缩小的前提下，细胞质浓度变大，质量密度增大。通过对比光学厚度发现质壁分离后的液泡相对于未发生质壁分离的液泡，光学厚度数值较大，数值对比质壁分离前亦有增大，证明光学厚度变化趋势与质量密度变化趋势一致，这一结论是符合光学和生物原理的。

将新鲜洋葱表皮置于 50%的糖溶液中，如图 6 所示，洋葱表皮细胞发生质壁分离现象。图 6(b)中白色箭头标示了发生质壁分离的细胞。与 25%图浓度糖溶液中质壁分离的洋葱表皮细胞成像图 4(b)对比可知，同一大小的视场中，由于糖溶液浓度越高，渗透压越大，发生质壁分离的程度越高，液泡质量密度也越高，50%糖溶液相对于 25%糖溶液，发生质壁分离现象的洋葱表皮细胞个数更多，液泡缩小的面积更大，相对光学厚度也更厚。在时间间隔 2 分钟前后记录两幅洋葱表皮细胞的数字全息图，并进行全息重构，重构光学厚度图 6(e)，图 6(f)所示，随着时间的推移，质壁分离现象更加严重，2 分钟后，液泡缩得更小，质量密度变大，此时光学厚度数值更大，证明光学厚度变化趋势恰好能反映质量密度的变化趋势。

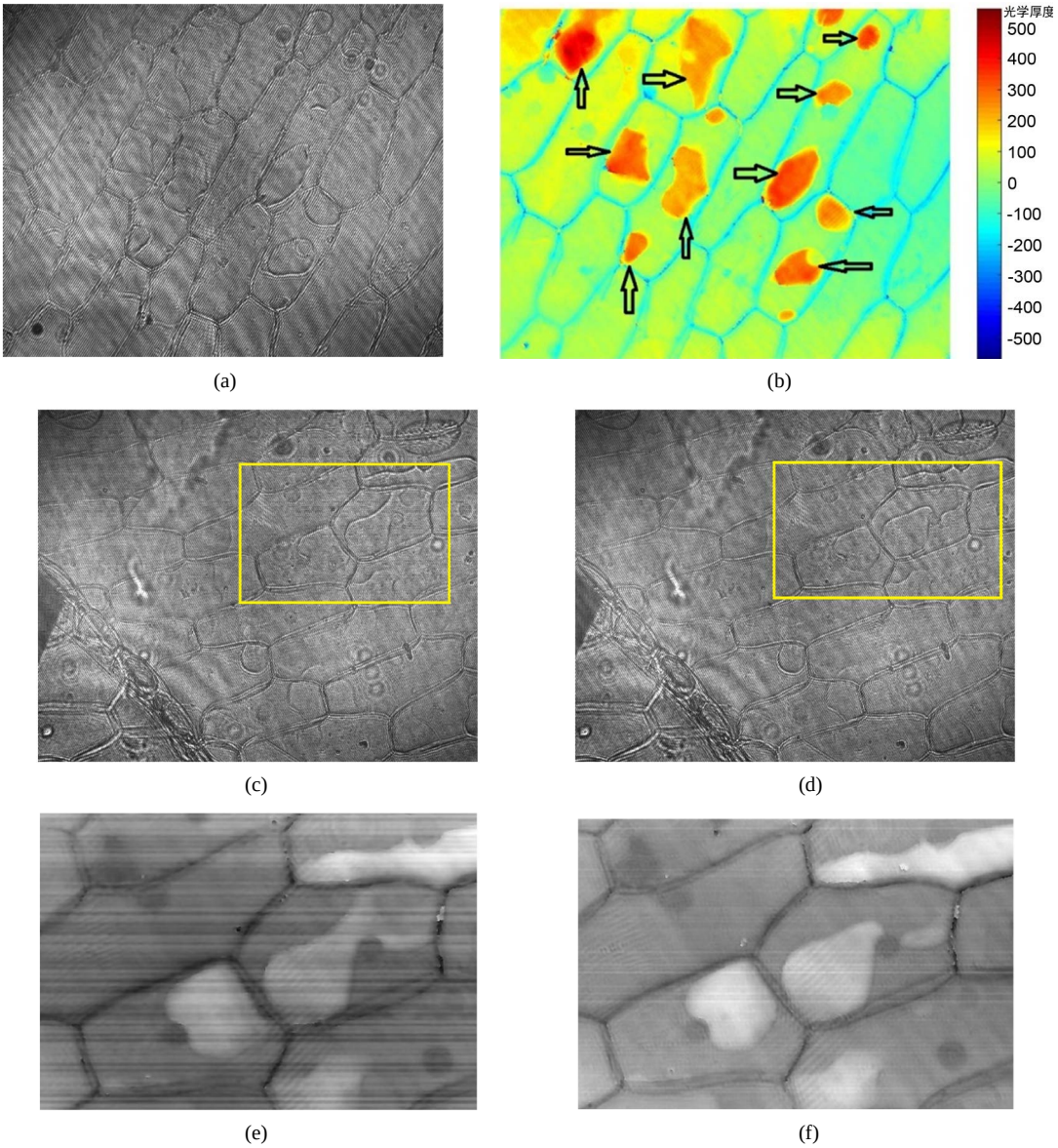


Figure 6. Experimental results of onion epidermal cells with parenchymal separation in a 50% sugar solution (a) digital hologram (10× microscope) (b) optical depth of Figure 5a ((c), (d)) two digital holograms recorded at a time interval of 2 minutes ((e), (f)) optical depth of Figure 5((c), (d))

图 6. 10×显微物镜下，50%浓度糖溶液中质壁分离的洋葱表皮细胞成像(a)发生质壁分离的数字全息显微图(b)重构光学厚度图(c，d)为时间间隔 2 分钟记录的数字全息显微图((e), (f))图((c), (d))的重构光学厚度图

4. 结论

本文利用数字全息显微技术不接触不伤害细胞的特点，重构细胞光学厚度，依据光学厚度与细胞质量密度变化趋势一致的论点，解析不能直接测量的细胞内部质量密度的变化趋势。通过对洋葱细胞静态观测和洋葱细胞质壁分离动态观测实验，分析结果，根据生物和光学的原理，并对比国际著名生物期刊文献的结论，均证明论点的正确性。因此，应用数字全息显微技术能够在不接触且不伤害细胞的条件下，定量分析细胞内部质量密度的变化趋势及其原因，为定量细胞研究提供一种有效的技术手段。

基金项目

本文由大学生创新创业训练项目(202010061111)，天津市自然科学基金项目(19JCQNJC01100)，国家自然科学基金项目(51775381)，天津市高等学校基本科研业务费资助重点项目(2017KJ182)资助。

参考文献

[1] Eils, R. and Athale, C. (2003) Computational Imaging in Cell Biology. *The Journal of Cell Biology*, **161**, 477-481. https://doi.org/10.1083/jcb.200302097

[2] Simon, Alberti, Amy, *et al*. (2019) Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, **176**, 419-434. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035

[3] Nott, T., Petsalaki, E., Farber, P., *et al*. (2015) Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles. *Molecular Cell*, **57**, 936-947. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.013

[4] Cell 发布“相分离”研究指南[EB/OL]. http://www.360doc.com/content/19/0218/11/52645714_815729204.shtml, 2019-02-18.

[5] Wang, X., Zhao, Q., Wang, L., *et al.* (2018) Effect of Cell Inner Pressure on Deposition Volume in Microinjection. *Langmuir the ACS Journal of Surfaces & Colloids*, **34**, 10287-10292.

[6] Bento, D., Rodrigues, R.O., Faustino, V., *et al*. (2018) Deformation of Red Blood Cells, Air Bubbles, and Droplets in Microfluidic Devices: Flow Visualizations and Measurements. *Micromachines*, **9**, 151. https://doi.org/10.3390/mi9040151

[7] Morshed, A., Karawdeniya, B.I., Bandara, Y.M.N.D.Y., *et al.* (2020) Mechanical Characterization of Vesicles and Cells: A Review. *Electrophoresis*, **41**, 449-470. https://doi.org/10.1002/elps.201900362

[8] Zeng, Y., Lu, J., Chang, X., *et al*. (2018) A Method to Improve the Imaging Quality in Dual-Wavelength Digital Holographic Microscopy. *Scanning*, **2018**, Article ID 4582590. https://doi.org/10.1155/2018/4582590

[9] Zeng, Y., Lu, J., Hu, X., *et al*. (2020) Axial Displacement Measurement with High Resolution of Particle Movement Based on Compound Digital Holographic Microscopy. *Optics Communications*, **475**, Article ID 126300. https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.126300

[10] 苏康艳, 曾雅楠, 刘源, 等. 基于数字全息显微技术的生物细胞动态定量测量[J]. 光电子, 2019(2): 77-82.