

文章编号: 1001-3806(2013)04-0487-06

流体中红细胞光散射信息的建模与仿真

郭永彩, 张小明

(重庆大学 光电技术及系统教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要: 为了获取流体中红细胞精确的光散射信息, 以反常衍射近似理论为基础, 采用扁椭球构建了流体中红细胞的数学散射模型。应用数值仿真模拟技术, 分别讨论了红细胞形体变化、体积变化、取向角和相对折射率变化对光散射幅值分布的影响, 建立了相应的图谱分布, 并通过实验对此模型进行了验证。结果表明, 在前向小角度内, 不同红细胞大小、不同相对折射率对光散射信息有着较大影响。这一结果对于病理红细胞的快速准确检测和流式细胞仪等细胞测量仪的精确测量是有帮助的。

关键词: 散射; 图谱分布; 反常衍射近似; 红细胞; 扁椭球模型; 数值分析; 实验验证

中图分类号: O436.2 **文献标识码:** A **doi:** 10.7510/jgjs.issn.1001-3806.2013.04.016

Modeling and simulation of light scattering information of blood cell in fluid flow

GUO Yong-cai, ZHANG Xiao-ming

(Key Laboratory of Opto-Electronic Technology and Systems of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: In order to obtain accurate light scattering information of red blood cell in the fluid flow, the scattering model of red blood cell in the fluid flow was constructed based on the anomalous diffraction approximation and the oblate ellipsoid. The effect of the variety of body, volume, relative refractive index and orientation angle on the scattering amplitude was studied. The simulation data indicate that the volume and relative refractive index of different red blood cell has the prominent effect on the scattering information at small orientation angles. The model was proved by experiments. This result is helpful for measuring red blood cell fast and accurately and the precise measurement of the cell measurement instrument such as flow cytometer.

Key words: scattering; spectrum distribution; anomalous diffraction approximation; red blood cell; oblate ellipsoid model; numerical analysis; experiment proving

引 言

细胞的光散射现象是指光线通过细胞而偏离其原来的传播方向并散开到所有方向的现象, 其中包含有细胞边缘的衍射、反射以及细胞内部的吸收等。细胞的光散射测量具有不干扰被测细胞、测量时间短、可实现实时测量等优点^[1]。因此近年来, 应用光散射技术对细胞测量^[2-10]已经越来越广泛, 通过光散射技

术得到的光散射图谱可以确定细胞大小、形态及细胞的内部成分, 对于正常细胞和病变细胞进行快速有效的区分。MULLANEY 和 van DILLA 等人^[11]于 1969 年提出了最简单的红细胞的不透光圆盘模型, KERKER 等人^[12]提出了镀膜球模型, 随后在瑞利-德拜-甘斯 (Rayleigh-Debye-Gans, RDG) 近似理论^[13-14]基础之上, SLOOT 等人^[15]通过改进的 RDG 形状因子提出了球壳模型的弹性光散射理论, SHIMIZU^[16]给出了微粒内电磁场传播常数的修正, 以求大体积实体的光散射, 在此基础上, 江苏大学的 WANG 等人^[3-7]对单个核式细胞的光散射特性进行了讨论。但是由于细胞形态多种多样且微小富有弹性, 当细胞处于流体中时, 在细胞流变学角度, 流体中一定的剪切力的作用都将使细胞旋转并且变形, 因此, 传统的基于

基金项目: 教育部博士点基金资助项目 (20090191110026)

作者简介: 郭永彩 (1963-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事光电技术及系统的研究。

E-mail: 20100802021@cqu.edu.cn

收稿日期: 2012-08-21; 收到修改稿日期: 2012-10-15

RDG 理论的球形模型将存在一定的局限性^[8]。RDG 近似理论适用于形体较小的粒子,对于红细胞等大体积实体的光散射,RDG 近似理论存在一定的局限,反常衍射近似理论要求微粒尺寸远大于1,即对于大体积实体的光散射存在着一定的优越性,STREEKSTRA 等人^[17-18]对于反常衍射近似运用于红细胞进行了初步的研究。作者在此基础上将红细胞模型具体化,将反常衍射近似理论和扁椭球模型相结合的方法建立了流体中红细胞的光散射模型,系统地分析了红细胞光散射幅值随细胞形体、细胞大小、细胞的相对折射率以及取向角的变化,并进行了实验验证,为病理红细胞以及红细胞生长的不同阶段的快速检测和基于光散射理论的细胞分析仪的精密测量提供理论依据。

1 基于扁椭球模型的反常衍射近似

由于红细胞是直径大约在 $6\mu\text{m} \sim 9\mu\text{m}$ 之间、厚度大约在 $1.5\mu\text{m} \sim 2.5\mu\text{m}$ 之间的扁球形,因此,扁椭球模型将更有利于体现流体中红细胞形态特征。红细胞尺寸参量为 50,其相对折射率在 1.04 ~ 1.05 之间^[17],而反常衍射近似适用条件如下^[9,17-18]:微粒的尺寸参量 $\alpha \gg 1$;微粒与周围介质的相对折射率接近于 1。因此,红细胞的尺寸参量和相对折射率完全符合反常衍射近似的适用条件,使用反常衍射近似对于红细胞检测将更具优越性。

扁椭球红细胞在反常衍射近似下的光散射如图 1 所示,其中 θ 为散射角。细胞在空间任意一点 $P(x,y,z)$ 的散射光强为^[18]:

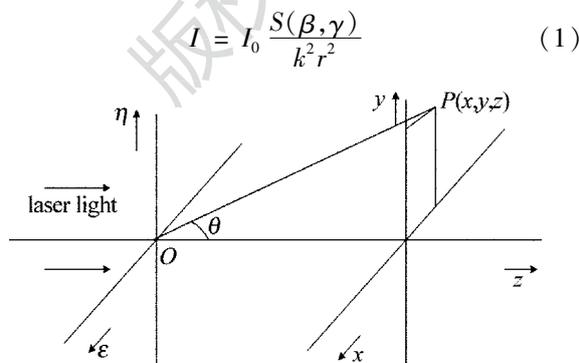


Fig. 1 Coordinate system used in the calculation of the light scattering of oblate ellipsoid red blood cell

散射光的振幅函数为:

$$S(\beta, \gamma) = \frac{k^2}{2\pi} \iint_{A_{sc}} \left\{ 1 - \exp[-i\phi(\varepsilon, \eta)] \right\} \times \exp[ik(\varepsilon\beta + \eta\gamma)] d\varepsilon d\eta, \quad (1)$$

$$r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}, \left(\beta = \frac{x}{r}, \gamma = \frac{y}{r} \right) \quad (2)$$

式中, I_0 为入射光强, k 为波数, A_{sc} 为细胞在 $\varepsilon-\eta$ 平面上的投影区域, $\phi(\varepsilon, \eta)$ 为光束在 $(\varepsilon, \eta, 0)$ 位置穿过细胞时的相位移动,而相位移动是红细胞相对折射率 m 和光线在细胞中穿过的距离 $l(\varepsilon, \eta)$ 的函数。

建立红细胞的扁椭球数学模型,其数学表达式为:

$$\frac{\varepsilon^2}{a^2} + \frac{\eta^2}{a^2} + \frac{z^2}{b^2} = 1, (a > b) \quad (3)$$

当红细胞处于 Couette 液流中时,在细胞流变学角度,流体中一定的剪切力的作用都将使细胞有一定的取向角。如图 2 所示,将红细胞等效为扁椭球模型,入射光沿 z 轴方向,液流流动方向平行于 ε 方向。最初,红细胞的扁椭球体模型的数学表达式为(3)式。

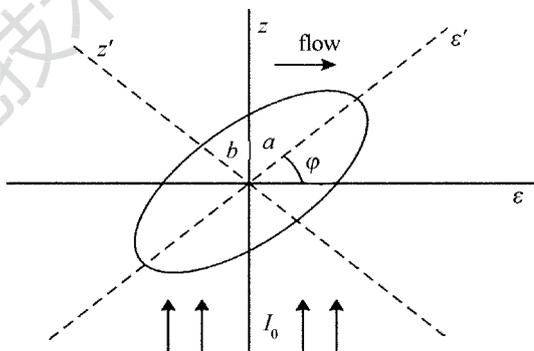


Fig. 2 Oblate ellipsoid red blood cell with semiaxes a and b illuminated by the incident light intensity I_0

由于流体剪切力的作用,扁椭球体细胞将相对于流体方向在 $\varepsilon-z$ 平面取向 φ 角度,此时,细胞的扁椭球体模型的数学表达式为:

$$\frac{\varepsilon'^2}{a^2} + \frac{\eta^2}{a^2} + \frac{z'^2}{b^2} = 1, (a > b) \quad (4)$$

此时,扁椭球体模型的红细胞在 $\varepsilon-\eta$ 平面上投影为一椭圆形区域^[17],其数学表达式为:

$$\frac{\varepsilon^2}{(fa)^2} + \frac{\eta^2}{a^2} = 1 \quad (5)$$

式中, $f = \left[\cos^2 \varphi + \left(\frac{b}{a} \right)^2 \sin^2 \varphi \right]^{1/2}$ 。在反常衍射理论中,在投影区域内的任何一点 $(\varepsilon, \eta, 0)$,相位移动函数为^[18]:

$$\phi(\varepsilon, \eta) = k |m - 1| l(\varepsilon, \eta) \quad (6)$$

对有一定取向角 φ 的红细胞的投影区域, $l(\varepsilon, \eta)$ 将表示为:

$$l(\varepsilon, \eta) = 2b' \left[1 - \left(\frac{\varepsilon}{a'} \right)^2 - \left(\frac{\eta}{a} \right)^2 \right] \quad (7)$$

式中, $b' = \frac{b}{f}$ 。

则将上述表达式带入散射幅值函数中, 得到红细胞的散射幅值函数为:

$$S(\beta, \gamma) = \frac{k^2}{2\pi} \int_{-a'}^{a'} d\varepsilon \int_{-t}^t \left\{ 1 - \exp \left[-ik |m - 1| \times \right. \right. \\ \left. \left. 2b / \sqrt{\cos^2 \varphi + \left(\frac{b}{a}\right)^2 \sin^2 \varphi} \times \right. \right. \\ \left. \left. \left[1 - \left(\varepsilon / \sqrt{\cos^2 \varphi + \left(\frac{b}{a}\right)^2 \sin^2 \varphi} \right)^2 - \right. \right. \right. \\ \left. \left. \left. \left(\eta / a \right)^2 \right] \right] \right\} \exp [ik (\varepsilon \beta + \eta \gamma)] d\eta \quad (8)$$

式中, m 为红细胞相对折射率, t 为内积分限, 其表达式为: $t = \frac{\sqrt{(fa)^2 - \varepsilon^2}}{f}$ 。

2 光散射特性的数值仿真模拟

(8)式无解析解, 但可以进行数值模拟。假设入射光波长为 $6328\mu\text{m}$, 红细胞的相对折射率为 $1.04 \sim 1.05$, 运用 MATLAB 数值仿真模拟技术对红细胞的光散射幅值特性进行仿真模拟。当椭球体的三轴取向分别在 ε, η, z 方向 ($\varphi = 0$) 时, 选取 $a = 4\mu\text{m}, b = 1\mu\text{m}$, 红细胞相对折射率 $m = 1.05$, 图 3 中给出了前向散射光幅值在 $x-z$ 平面和 $y-z$ 平面内随散射角的分布。

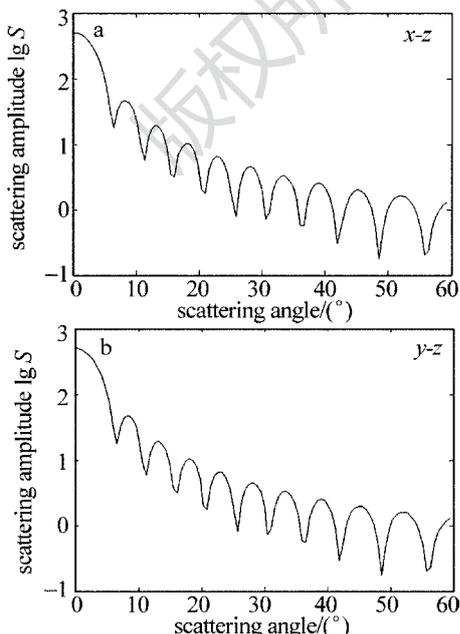


Fig. 3 Scattering amplitude distribution & scattering angle for oblate ellipsoid

从图 3 中可以得到, 散射光在 $x-z$ 平面和 $y-z$ 平面内散射光幅值随散射角的分布相同。当 $a = b$ 时, 扁椭球模型将近似为球形模型, 图 4 中红色曲线是在 $a = b = 4\mu\text{m}$ 时散射光在前向 60° 内在 $x-z$ 平面和 $y-z$ 平面内散射光幅值随散射角的分布, 这与米氏散射理论相符^[6]。从图 4 可以得出, 扁椭球模型相对于球形模型而言, 相邻波峰与波谷之间的差距将变大, 并且散射光幅值将明显小于球形模型的散射光幅值分布, 但是散射光幅值随散射角的总体分布趋势没有变化。

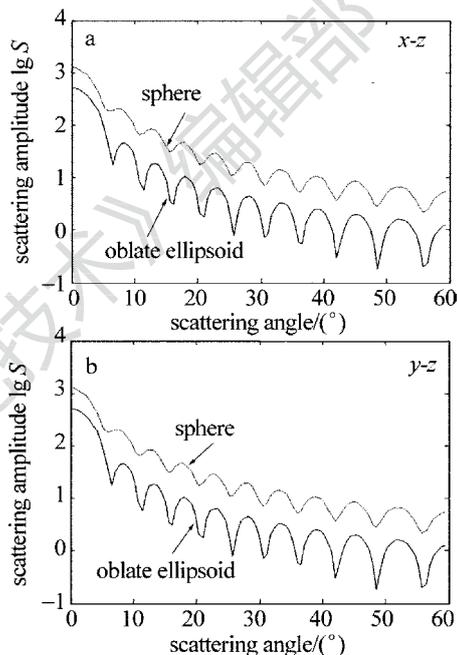


Fig. 4 Comparison of the scattering amplitude distribution with scattering angle for sphere and oblate ellipsoid model

2.1 相同形体、不同体积大小红细胞光散射的分布

无论是正常红细胞还是病理红细胞, 其大小都存在着一定的差异, 其光散射信息同样也存在着一定的差异。取扁椭球体模型红细胞的相对折射率 $m = 1.05$, 取向角 $\varphi = \pi/4$, 取细胞的长短半轴分别为 $a = 2.5\mu\text{m}, b = 1\mu\text{m}; a = 3\mu\text{m}, b = 1.2\mu\text{m}; a = 4\mu\text{m}, b = 1.6\mu\text{m}$ ($a/b = 2.5$) 进行数值仿真模拟。得到在 $x-z$ 平面内散射光幅值分布如图 5 所示。从图

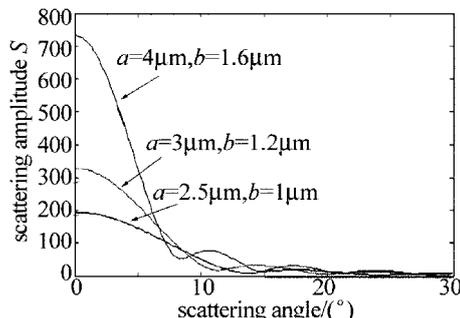


Fig. 5 Scattering amplitude distribution with the same form and the different volume

5可以得到,相同形体的细胞由于体积不同散射光幅值的分布将产生变化,尤其在向前小角度范围内(小于 7°),散射光幅值分布将随着细胞体积的增大而变强。

2.2 不同形体血红细胞光散射幅值分布

血红细胞处于血流系统中,不会一直处于同一种形体,而且不同血红细胞的形体也存在着一定的差异。当血红细胞相对折射率 $m = 1.05$ 以及取向角 $\varphi = \frac{\pi}{4}$ 时,取扁椭球血红细胞模型中长半轴 $a = 4\mu\text{m}$,短半轴分别取 b 为 $1\mu\text{m}$, $1.25\mu\text{m}$, $1.6\mu\text{m}$,在 $x-z$ 平面内进行仿真模拟如图 6 所示。

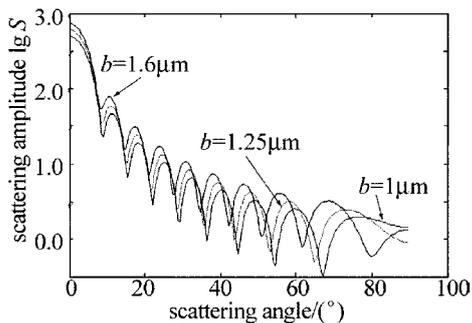


Fig. 6 Scattering amplitude distribution with the different form

从图 6 可以得出,不同形体细胞光散射幅值分布在小角度范围内几乎没有变化,在大角度范围内,随着形体越来越扁,光散射幅值分布的极小值和极大值将明显向大角度方向非线性偏移。

2.3 不同相对折射率的血红细胞光散射幅值分布

血红细胞在人体生命活动中起到非常重要的作

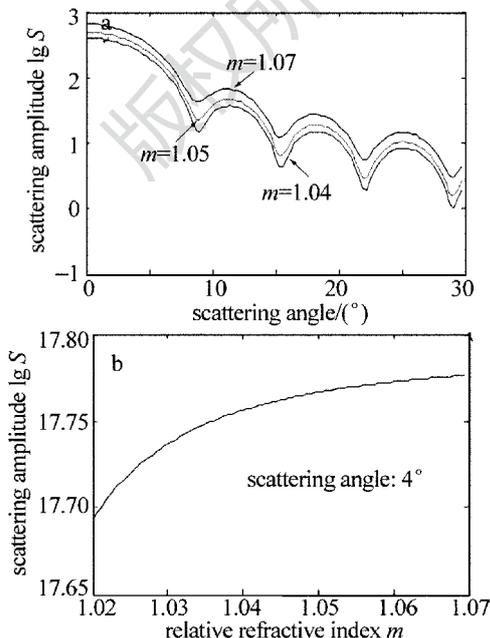


Fig. 7 Scattering amplitude distribution with different relative refractive index

用,在正常情况下,其相对折射率在 $1.04 \sim 1.05$ 之间,但是,当细胞发生病变等情况时,其相对折射率会很容易超出这一范围。选取血红细胞大小为 $a = 4\mu\text{m}$, $b = 1\mu\text{m}$,取向角为 $\varphi = \frac{\pi}{4}$ 进行仿真模拟,如图 7 所示。

图 7a 是选取血红细胞两个正常相对折射率 $m = 1.04, m = 1.05$ 和一个非正常相对折射率 $m = 1.07$ 在 $x-z$ 平面内进行仿真模拟得到的结果,由图可知,血红细胞相对折射率的变化对于光散射幅值的分布形态没有影响,图 7b 是在散射角为 4° 时得到的光散射幅值随血红细胞相对折射率的变化,可以得出,当血红细胞相对折射率变时光散射幅值也将呈非线性增大。

2.4 不同取向角的血红细胞的光散射幅值分布

血红细胞处于流体中时,由于流体中一定的剪切力的作用都将使细胞旋转从而形成一定的取向角,而且当细胞发生病变时,取向角也将发生一定的变化,取向角的不同将影响散射光信息的分布。取血红细胞大小 $a = 4\mu\text{m}$, $b = 1\mu\text{m}$,相对折射率 $m = 1.05$,分别取散射角为 $4^\circ, 5^\circ, 7^\circ, 8^\circ, 10^\circ$ 时,得到散射光幅值分布在 $x-z$ 平面内随取向角的变化如图 8 所示。

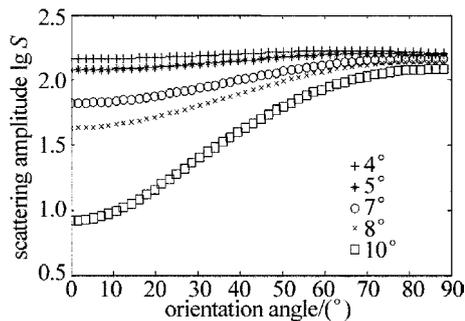


Fig. 8 Scattering amplitude distribution & different orientation angle

从图 8 中可以得到,在散射角较小(小于 5°)时,血红细胞取向角的变化对光散射幅值分布几乎不会产生影响,当处于较大散射角时,散射光幅值将明显随着取向角的增大呈非线性增大。因此,在小角度内分析血红细胞散射光信息时,可以忽略取向角的影响,但是大角度内必须考虑取向角对血红细胞光散射信息的影响。

3 实验

为了保护人体血红细胞不被破坏并获取准确的测量结果,提取人体新鲜血液经离心之后获得人体血红细胞,将获得的人体血红细胞与磷酸盐缓冲

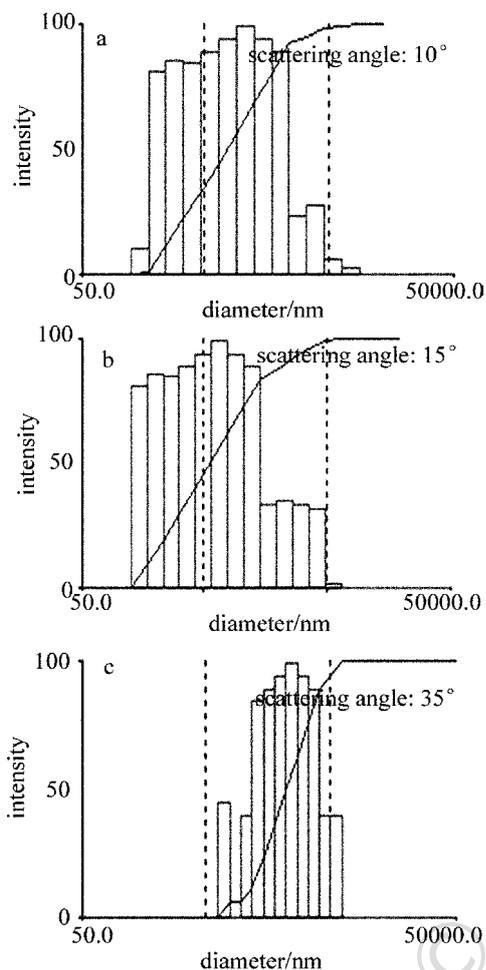


Fig. 9 Light intensity & size of red blood cell

液(摩尔分数为 0.1)按体积比 1:100000 配制。将配制好的红细胞溶液在保持温度 25°和红细胞相对折射率 1.05 不变的情况下,应用美国布鲁克海文公司生产的 BI-200SM 动态光散射仪进行测量。

由图 9 可以得出,不同粒径(体积大小不同)的血红细胞的散射光强度存在较大差异,对比 3 幅图可以得出相对于较大角度(35°),在小角度(10°, 15°)时粒径的分布范围较宽,说明在小角度时对粒径的测量分辨将更加准确,由此可以通过散射光强度更加准确地分辨出不同大小的细胞,这与前面的理论结果相一致。在实验测量过程中,10°~90°范围内,每隔 5°对配制好的红细胞溶液进行光散射,测量得到的累积散射光强度随散射角的变化如图 10 所示,可以得出散射光强分布曲线呈震荡且逐渐减小趋势,这与理论分析基本相符合。

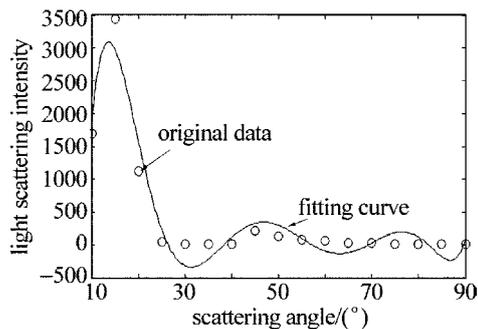


Fig. 10 Light scattering intensity & scattering angle of red blood cell

4 结论

建立了流体中红细胞的光散射模型并研究了各参量变化对光散射幅值分布的影响,描述了一种新颖的流体中血红细胞的检测方法,该方法有效地将扁椭球模型和反常衍射近似理论相结合。扁椭球模型相对于球形模型,流体中红细胞光散射幅值分布有着明显的变化。在前向小角度范围内,相同形体、不同体积的红细胞和不同折射率的红细胞的光散射幅值分布存在着较大的差异,但是形体的变化对红细胞光散射幅值的分布几乎没有影响。对于散射角较小(小于 5°)时,取向角的变化对于光散射幅值的分布几乎没有影响,当处于较大散射角时,散射光幅值分布将随着取向角的增大呈非线性增大。通过实验的方法对理论模型进行了具体的验证,理论模型与实验可以很好地相符。因此,该研究对于基于光散射理论的病理细胞的快速检测、细胞分析仪的改进以及流体中细胞的动态监测有重要的理论意义。

参 考 文 献

- [1] CRAM L S, MARTIN J C, STEINKAMP J A, *et al.* New flow cytometric capabilities at the national flow cytometry resource [J]. *Proceedings of the IEEE*, 1992, 80(6):912-917.
- [2] YANG Y, ZHANG Zh X, JIANG D Z. Application of laser light scattering techniques in cell counting and classification [J]. *Laser Technology*, 1997, 21(4):231-235 (in Chinese).
- [3] WANG Y W, BU M, CUI Q Y, *et al.* Dynamic characters of light scattering intensity distribution for a nuclear-cell [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2006, 33(10):1434-1439 (in Chinese).
- [4] BU M, WANG Y W, JIN W F, *et al.* Effect of scattering intensity modulation on the study of cell morphology [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2011, 38(11):1101001 (in Chinese).
- [5] WU D J, HONG Y, BU M, *et al.* A model for light scattering from red blood cells [J]. *Laser Technology*, 2007, 31(2):156-159 (in Chinese).

- [6] WANG Y W, HAN G C, LIU Y, *et al.* Light scattering virtual simulation of red blood cell under double curve symmetrical model [J]. Chinese Journal of Lasers, 2007, 34 (12): 1676-1681 (in Chinese).
- [7] WU D J, WANG Y W, HAN G C. Model for elastic light scattering from nucleated cells[J]. Acta Optica Sinica, 2005, 25(12): 1670-1675 (in Chinese).
- [8] WANG Y W, HAN G C, WU D J. Study on the relation between the shape and scattering distribution of cells[J]. Laser Journal, 2006, 27(5): 63-64 (in Chinese).
- [9] YANG J, GUO Y C, GAO Ch. Application of monte carlo method to the light scattering of human's erythrocytes [J]. Journal of Chongqing University (Natural Science Edition), 2005, 28(7): 27-30 (in Chinese).
- [10] WU Zh H, CUI X R, HUANG D Zh, *et al.* Spectral analysis of red blood cells in umbilical cord blood and children with congenital heart disease [J]. Laser Technology, 2012, 36(2): 238-242 (in Chinese).
- [11] MULLANEY P F, van DILLA M A, COULTER J R, *et al.* Cell sizing: light scattering photometer for rapid volume determination [J]. Review Scientific Instruments, 1969, 40(8): 1929-1932.
- [12] KERKER M, COOKE D D, CHEW H, *et al.* Light scattering by structured sphere[J]. Journal of the Optical Society of America, 1978, 68(5): 592-604.
- [13] KERKER M. The scattering of light and other electromagnetic radiation[M]. New York, USA: Academic, 1969: 414-432.
- [14] van de HULST H C. Light scattering by small particles [M]. New York, USA: Wiley, 1957: 85-100.
- [15] SLOOT P M A, FIGDOR C G. Elastic light scattering from nucleated blood cells: rapid numerical analysis[J]. Applied Optics, 1986, 25(19): 3559-3565.
- [16] SHIMIZU K. Modification of the rayleigh-debye approximation [J]. Journal of the Optical Society of America, 1983, 74(3): 504-507.
- [17] STREEK-STRA G J, HOEKSRA A G, HEETHAAR T M. Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry [J]. Applied Optics, 1994, 33(31): 7288-7296.
- [18] STREEKSTRA G J, HOEKSRA A G, NIJHOF E J, *et al.* Light scattering by red blood cells in ektacytometry: fraunhofer versus anomalous diffraction[J]. Applied Optics, 1993, 32(13): 2266-2272.