

荧光显微图像 3D重建技术与应用

王 瑜 著



科学出版社

荧光显微图像 3D 重建技术与应用

王 瑜 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书以显微光学成像系统获取的降质荧光显微样本图像或图像栈为研究对象,利用有效的图像去噪、去模糊和 3D 重建方法,获得更高清晰度和对比度的荧光显微图像,或者样本 3D 模型,便于后期观察与分析。全书分为 6 章,第 1~2 章是基础知识部分,主要介绍显微样本 3D 立体成像技术的发展与现状;第 3~5 章是算法研究部分,主要利用压缩感知、偏微分方程、反卷积和正则化等技术,提出一系列 2D 荧光显微图像去噪、去模糊和 3D 荧光显微图像栈重建等相关算法;第 6 章详细介绍设计并搭建的荧光显微图像显示与分析系统。

本书可供从事光学显微图像处理技术的科研人员和工程人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

荧光显微图像 3D 重建技术与应用/王瑜著. —北京:科学出版社, 2015.9

ISBN 978-7-03-045390-7

I. ①荧… II. ①王… III. ①荧光摄影—显微摄影—图像重建 IV. ①TN919.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 193632 号

责任编辑:王 哲 董素芹 / 责任校对:郭瑞芝

责任印制:张 倩 / 封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

天津市新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 9 月第 一 版 开本:720×1 000 1/16

2015 年 9 月第一次印刷 印张:9 3/4 插页:10

字数:170 000

定价:55.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

作者简介

王瑜，女，1977年4月生，北京科技大学工学博士，清华大学博士后，2011年7月入职北京工商大学，2012年晋升为计算机与信息工程学院副教授、硕士生导师，主要研究方向为模式识别、图像处理、计算机视觉。目前主持国家自然科学基金面上项目1项，市委组织部青年拔尖人才支持计划项目1项，北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目1项，中国博士后科学基金面上项目1项，北京市优秀人才培养资助项目1项，北京工商大学青年教师科研启动基金项目1项，作为项目技术骨干参与完成国家级项目3项。近年来，已在科学出版社出版学术专著1部，在 *Optics Letters*、*Optics Communications*、*Journal of Electronic Imaging*、*Optical Engineering*、*Science China Information Sciences*、电子学报、ICPR 等国际国内期刊与会议发表论文三十余篇，SCI 收录6篇，EI 收录15篇；一项教育部科学技术成果鉴定（排名第十）；申请国家发明专利12项，授权3项，授权软件著作权4项。目前为中国自动化学会、中国电子学会和中国人工智能学会高级会员，生物信息学与人工生命专业委员会委员，IEEE 和计算机学会会员，CCF YOCSEF 委员，*Optics Letters*、*Optics Communications*、*Journal of Electronic Imaging*、*IEEE Transactions on Instrumentation & Measurement* 国际期刊审稿人。

前 言

现代科技的不断进步，尤其是显微成像技术、荧光探针技术、光物理技术、计算机技术和 CCD (Charge Coupled Device) 技术的飞速发展，以及医学、生命科学、生物学、细胞学、材料学等高新科技领域的迫切需求，催生了显微样本 3D 重建与分析这一新兴国际前沿研究课题。该课题的研究成果可以广泛应用于医疗、科教、新型材料和工业电子等领域，具有广阔的应用前景和实用价值。

由于光学显微成像系统的物理限制、成像条件和人为因素等干扰，成像过程不可避免地包含有噪声或模糊等降质现象，本书在分析光学显微成像系统成像机理和退化模型的基础上，研究有效的 2D 荧光显微图像去噪声方法，探索有效的点扩散函数 (Point Spread Function, PSF) 估计方法，并在此基础上，研究有效的 2D 荧光显微图像去模糊和 3D 荧光显微图像栈重建方法，以便获取高质量的荧光样本图像或图像栈，实现荧光显微样本 3D 可视化，为后续研究提供更加全面可靠的数据和参考。

本书的结构安排如下：第 1 章系统阐述显微样本 3D 立体成像技术的发展与现状；第 2 章详细介绍荧光显微样本 3D 重建方法的设计思路与优势、物理与统计模型，以及经典算法；第 3 章详细论述两种荧光显微图像去噪算法；第 4 章详细论述两种 2D 荧光显微图像复原算法；第 5 章详细论述两种 3D 荧光显微图像重建方法；第 6 章详细介绍设计并搭建的荧光显微图像显示与分析系统。

本书得到了国家自然科学基金面上项目“荧光显微样本 3D 重建关键技术研究”（项目编号：61171068）的支持，特此致谢！

荧光显微图像复原与重建技术是一种非常有前景的科学技术，相关研究成果不仅对医学、生物学、生命科学等领域的发展具有重要意义，而且很多方法和技术可以应用于自然场景宏观图像，因此对于图像处理和计算机视觉等科学领域的发展也具有重要的参考和借鉴价值。希望本书能够为从事荧光显微图像复原和重建技术相关研究的科研工作者和产品研发的技术人员提供一些有用的帮助。

作 者

2015 年 5 月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 研究背景	1
1.3 显微镜成像原理	4
1.3.1 人眼的可见光范围	4
1.3.2 显微镜的基本成像原理	4
1.4 国内外显微样本 3D 立体成像发展与现状	5
1.4.1 波前重建显微镜方法	5
1.4.2 全息显微镜方法	6
1.4.3 共焦显微镜方法	8
1.4.4 CT 显微镜方法	9
1.4.5 倾斜视角重建显微镜方法	11
1.4.6 基于微透镜阵列的显微镜方法	12
1.4.7 体视显微镜方法	15
1.4.8 荧光显微镜 3D 重建方法	15
1.5 本章小结	20
参考文献	21
第 2 章 荧光显微图像 3D 重建	24
2.1 引言	24
2.2 荧光显微图像 3D 重建方法的思路与优势	24
2.2.1 算法设计思路	24
2.2.2 荧光显微图像 3D 重建方法的优势	26
2.3 物理与统计模型	26
2.3.1 物理模型	26
2.3.2 统计模型	27

2.4	光场表示与性质	29
2.4.1	光场表示	29
2.4.2	微观光场性质	30
2.4.3	基于微观光场的几点讨论	31
2.5	荧光显微图像 3D 重建方法	34
2.5.1	近邻方法	34
2.5.2	线性方法	35
2.5.3	非线性方法	37
2.5.4	统计方法	38
2.5.5	盲反卷积方法	40
2.6	本章小结	42
	参考文献	43
第 3 章	荧光显微图像去噪算法研究	47
3.1	引言	47
3.2	偏微分方程	47
3.2.1	偏微分方程的概念	47
3.2.2	偏微分方程的特点	50
3.3	基于方向四阶偏微分方程的荧光显微图像去噪	51
3.3.1	方法介绍	51
3.3.2	评价方法	56
3.3.3	实验与讨论	57
3.4	基于四阶偏微分方程和对比度增强的荧光显微图像去噪	61
3.4.1	方法介绍	61
3.4.2	实验与讨论	62
3.5	本章小结	65
	参考文献	66
第 4 章	2D 荧光显微图像复原算法研究	68
4.1	引言	68
4.2	基于稀疏表示约束的 2D 荧光显微图像复原	69
4.2.1	基本理论知识	69
4.2.2	方法介绍	75

4.2.3 实验与讨论	82
4.3 基于 Gabor 小波分解和增益图约束的 2D 荧光显微图像复原	93
4.3.1 基本理论知识	93
4.3.2 方法介绍	94
4.3.3 实验与讨论	96
4.4 本章小结	101
参考文献	101
第 5 章 3D 荧光显微图像重建算法研究	107
5.1 引言	107
5.2 基于各阶强度导数的荧光显微图像 3D 重建	107
5.2.1 基本理论知识	107
5.2.2 方法介绍	109
5.2.3 实验与讨论	113
5.3 基于空间变化点扩散函数的荧光显微图像 3D 重建	122
5.3.1 基本理论知识	122
5.3.2 方法介绍	123
5.3.3 实验与讨论	125
5.4 本章小结	129
参考文献	130
第 6 章 荧光显微图像显示与分析系统	133
6.1 引言	133
6.2 系统设计	133
6.3 系统功能实现	135
6.3.1 2D 图像复原	136
6.3.2 3D 图像重建	139
6.4 评价标准	144
6.5 本章小结	145
参考文献	145

第 1 章 绪 论

1.1 引 言

医学、生命科学、生物学、细胞学、材料学等世界前沿研究领域，迫切需以三维（Three Dimension, 3D）形式展现显微样本的结构细节，以使人们能够以新的视角和方式，重新认识和理解周围的微观世界，而显微成像技术、荧光探针技术、光物理技术、计算机技术和 CCD 技术的飞速发展，为 3D 显微样本结构重建提供了必要的基础和条件。该课题相关研究已经快速成为一种生物、医学研究的客观标准，用于判别科学结论的正确性和可靠性，丰富人们的理解 and 需求。

本章详细介绍荧光显微样本 3D 重建这一研究课题的背景与意义，并从显微光学成像系统的基本原理入手，系统阐述显微样本 3D 立体成像技术的发展与现状，重点介绍荧光显微样本 3D 重建方法的研究内容，为后续章节提供必要的知识准备。

1.2 研究背景

传统显微成像技术展现的多是样本的二维（Two Dimension, 2D）信息，往往成像不充分，主要有以下几点原因。首先，2D 图像只能提供生物样本的局部信息，有关样本的整体结构、形状、尺寸，以及感兴趣部分和整体结构之间的相互关系等详细的形态学信息，则无法通过传统 2D 形式准确地表达，相比之下，3D 图像重建可以提供更丰富的内涵。其次，由于每幅 2D 图像只能提供一定的局部信息，为了完整地理解所研究的样本，需要分析样本的多幅 2D 图像，而 2D 图像间的相互影响和理解具有很大的不确定性，所以结果的准确性难以保证。相比之下，3D 图像重建（如图 1.1 所示）可以提供更多更准确的量化数据，进而避免对样本的误解，使人们更加信任得到的结果。总之，3D 图像重建可以使样

本更加清晰、明确，更重要的是，可以发现得更多、展示得更多、表达得更多。为了充分满足医学、生命科学、生物学、细胞学、材料学等领域的科学研究和生产生活的迫切需要，亟须开展荧光显微样本 3D 图像重建的研究。

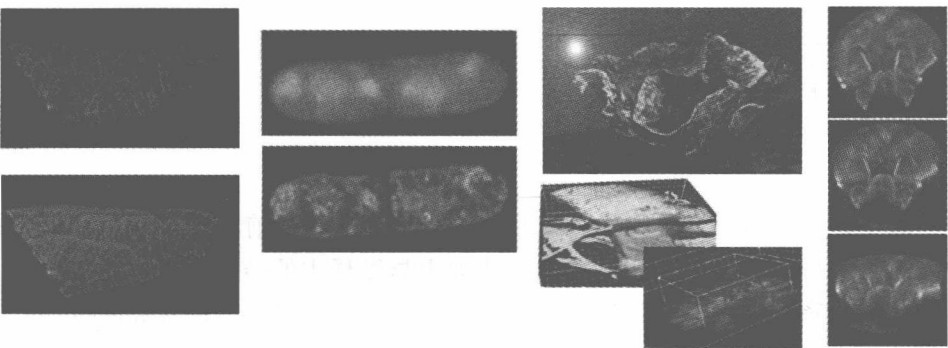


图 1.1 3D 图像重建实例（见彩图）

荧光显微样本 3D 重建与分析研究的主要问题包括利用显微光学成像系统的变焦方法，以及图像理解和相关性分析等理论指导，获得荧光显微样本的光学截面图像栈；研究荧光显微图像去噪、图像融合等方法，提高图像栈的质量；在准确估计点扩散函数的基础上，对图像栈进行 3D 重建与分析，图 1.2 显示了荧光显微样本 3D 重建与分析的流程示意图。

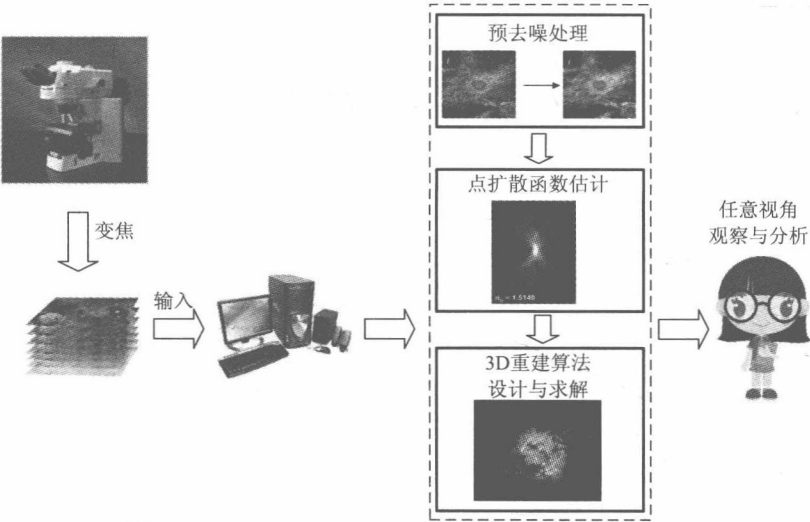


图 1.2 荧光显微样本 3D 重建与分析的流程示意图

该课题的研究大致分为光学截面图像栈采集、预处理和 3D 重建三个阶段,区别于以往的 2D 显微光学成像技术,3D 图像重建具有许多特有的属性,从而引发了相应的多项技术需求。首先,在采集阶段,3D 图像重建需要利用显微光学成像系统的变焦手段,密集采集多幅图像(图像栈),为了重建精确,变焦步长需要选择恰当,太小会导致产生海量数据,造成计算复杂,耗时费力,同时增加了存储资源的成本,太大则会导致关注区域信息丢失,结果粗糙,甚至导致对样本理解错误,因此,选择适当的变焦步长,既保证获得准确结果,又满足降低计算复杂度的需求,已经成为众多研究者普遍关注的问题;其次,由于 3D 图像重建建立在同一样本图像栈的基础上,所以除了要注重单幅图像内容的理解,同时也要非常注重图像间的相互影响和理解,这些有价值的信息反过来也可以正确指导变焦步长的正确选择,可见,如何正确理解单幅图像的内容和多幅图像间的相互关系,也是相关领域专家面临的难题;再次,在预处理阶段,为了获得高质量的 3D 模型,各种提高图像栈质量的措施不可或缺,包括背景估计、去噪技术和融合技术等;最后,在 3D 重建阶段,需要准确、高效地估计点扩散函数,并重建样本模型,在三个维度上进行反卷积处理,面对成百上千幅光学截面图像,如何准确、高效地完成相关预处理的工作和重建显微样本的 3D 结构,已经成为图像处理和数学领域的典型难题。综上所述,该课题涉及荧光显微成像、图像理解与增强、信息处理、计算机视觉、应用数学等诸多相关研究领域,海量数据、大空间存储、复杂理解、高效运算等问题对高质量 3D 图像重建的研究提出了严峻的挑战,其具有极强的科学意义和实用价值,具体体现在以下几方面。

(1) 为了实现荧光显微样本 3D 重建,需要认真分析现有显微光学成像系统的成像机理、成像模型、退化因素等,同时以光场、小波分析、压缩感知、反卷积等理论为研究基础,在图像理解、图像去噪、图像融合、图像复原等关键技术上取得突破,这是对上述基础理论研究从宏观到微观,从 2D 到 3D 的重要延伸与探索。

(2) 3D 建模与分析方法不仅适用于宽场或共焦显微光学成像系统,而且可以有效移植于任何一种显微光学成像系统,用于提高显微图像的对比度与清晰度,更好地发挥这些光学成像系统的性能。

(3) 较传统 2D 成像技术,3D 重建与分析的研究成果具有很多显著优势,更具实用性。例如,反卷积的使用可以进一步提高传统 2D 图像细节信息的清晰度和对比度;可以在采集图像栈以后,按照研究人员的意愿,随时进行计算

机后期处理工作，操作更灵活；可以对样本进行 3D 建模仿真，满足科研人员随意调整视角进行观察的需要，观察更方便，理解更透彻等。同时，相应的研究成果可以广泛应用于医疗诊断、生物制药、新型材料分析、集成电路设计和科教研究等领域，具有很大的商业潜力和实用价值。

目前，荧光显微样本 3D 重建的研究已经成为国际上的热点课题，而国内相关研究则非常匮乏，但是该项课题的研究对医学、生命科学、生物学、细胞学、材料学等很多学科领域的显著影响和由此产生的巨大经济效益是不容忽视的。随着新型显微成像、荧光探针、光物理、计算机、激光和 CCD 等技术的不断涌现和突破创新，以及人们需求的不断增长，相信准确、直观、高效、鲁棒的荧光显微样本 3D 重建技术将对相关学科领域和人们的生产生活发挥越来越重要的作用。

1.3 显微镜成像原理

1.3.1 人眼的可见光范围

人眼可以观测到样本的可见光范围如图 1.3 所示，属于白光光谱的一部分，为 400~750nm^[1]。

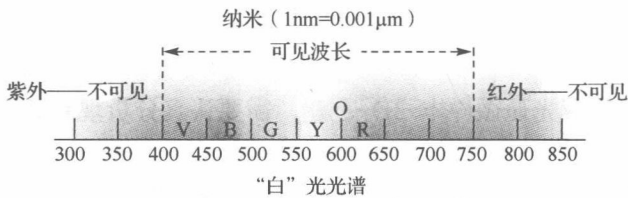
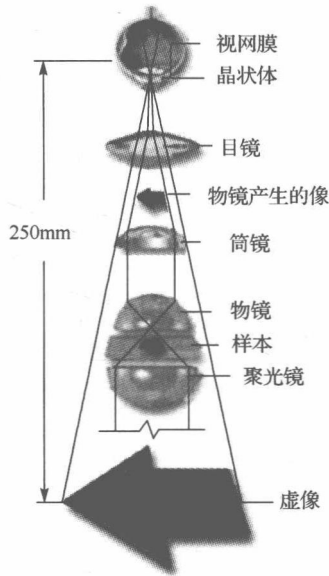


图 1.3 白光光谱图^[1]（见彩图）

1.3.2 显微镜的基本成像原理

显微镜成像原理图如图 1.4 所示，可见光光源被聚光镜（condenser）聚光后照射到标本（specimen）上，经物镜（objective）在中间成像面上得到一次放大的实像，再利用目镜（eyepiece）在无穷远处成二次放大的虚像，并呈现在视网膜（retina）上^[2]。

图 1.4 显微镜成像原理图^[2] (见彩图)

从显微镜的成像原理简图可以看出, 显微镜属于垂直视角成像, 同时需要考虑光的波动属性, 如光的波长等, 由于标本一般为透明或半透明状态, 所以能够得到标本不同焦平面的图像, 称为图像栈。

1.4 国内外显微样本 3D 立体成像发展与现状

1.4.1 波前重建显微镜方法

利用显微镜记录微观样本的信息并重建其 3D 模型, 最早是由 Gabor^[3]提出的, 他使用两束一致性光束进行干涉的方法来记录样本信息, 主要是为了解决物镜的球面像差限制成像分辨率的问题, 因为在理论上, 成像分辨率要想提高 10 倍, 其物镜的球差校正准确率需要提高 10000 倍^[3], 这在现实中几乎是无法实现的, 所以有人提出利用其他方法取代物镜的使用, 进而避免校正物镜的环节来提高成像分辨率。为此 Gabor 提出了波前重建理论, 如图 1.5 所示。

图 1.5 中显示, 样本被聚焦的电子光束 (也称为主光束) 照射, 光束以半角 α 从焦点处向外散射, 只有当焦点的直径, 又称 Gaussian 直径小于分辨率限

制 $(\lambda/2) \cdot \sin \alpha$ 时, 才能保证光束充分的一致性。样本放置在焦点后面或前面很小的距离处, 成像平面放置在几倍于焦点与样本之间的距离处, 同时样本需放置在光照范围内, 传递主光波中的部分光信息。成像记录由主光波和样本散射的二次光波发生干涉产生, 可以看出, 至少在图示的外围, 最大干涉产生得比较密集, 并且只有主光波发生干涉的那部分被强烈地传递, 在相位上和振幅上都模拟了二次光波。通过实验证明, 这种干涉图像具有显著的属性, 不仅记录了标本的平面信息, 同时记录了标本的 3D 信息。然而, 这种方法由于一致性光源的限制, 无法应用于现实生活中, 而只能在严格的实验室环境下复现, 所以波前重建的普适性受到了限制, 并且立体成像的质量并不好, 但是 Gabor 新颖的立体显微成像理论, 为进一步提高光学显微镜分辨力提供了崭新的思想和途径。

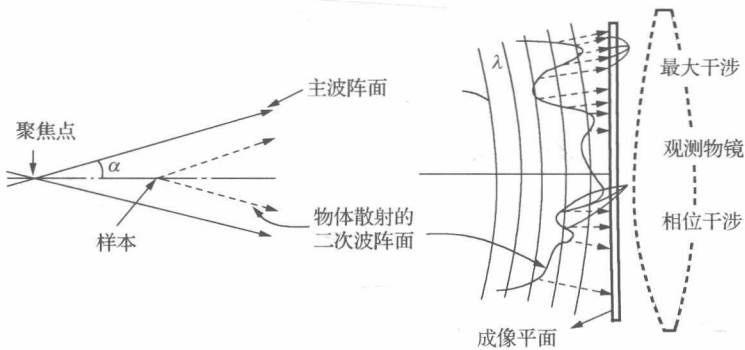


图 1.5 Gabor 的波前重建理论^[3]

1.4.2 全息显微镜方法

在 Gabor 的波前重建理论启发下, El-Sum^[4]使用 X 射线波生成全息图, 并用于波阵面重建成像, 但是由于当时技术条件的限制, 无法生成一致的 X 射线双光束, 使得该项技术无法应用于实际, 同时, 也没有 X 射线显微镜方法能够真正接近全息技术的理论分辨率极限 (一般为埃的数量级)。激光技术的发明将光波的范围扩展到紫外线和 X 射线范围, 这种一致的强辐射光源有望使得 Gabor 波阵面重建技术显微镜在这些光波范围付诸实现。

后来, Leith 和 Upatnieks^[5,6]提出了全息理论, 并在信息理论的框架下进行了讨论。该理论主要分为三个主要部分: 图像的散焦或空频域的离散化、全息记录、3D 重建过程的聚焦或压缩。该方法具体示意图如图 1.6 所示。

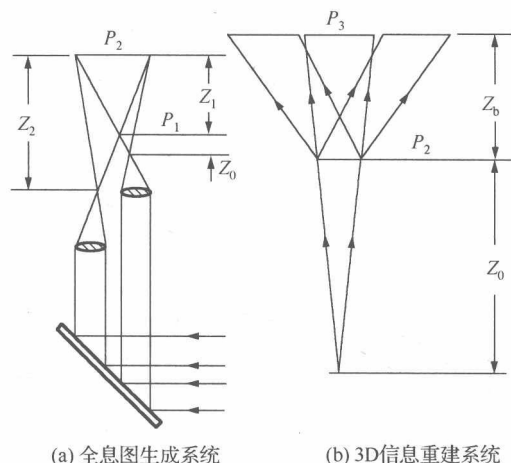
图 1.6 双光束波阵面重建显微镜^[5]

图 1.6(a)为全息图生成系统，样本放置在 P_1 平面，全息图被生成，并被记录在 P_2 平面，图 1.6(b)为 3D 信息重建系统，全息图被发散光束照射，并在 P_3 平面产生 3D 立体实像。

尽管 Gabor 提出了 3D 显微成像理论，但由于那时一致光源生成的限制而无法应用于实践，直到激光技术发明后，才直接导致了全息摄影术和全息显微镜的诞生，Ellis 的平面视角全息记录系统^[7,8]如图 1.7 所示。

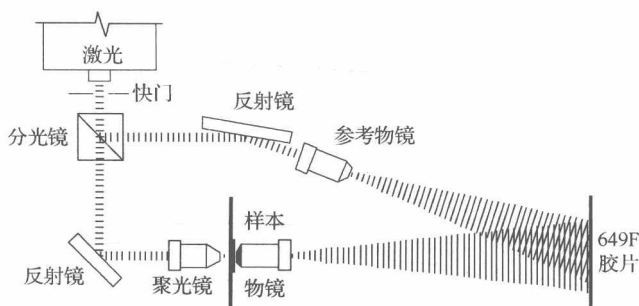


图 1.7 Ellis 的平面视角全息记录系统

图 1.7 中激光束经分光镜分为两部分，透射光束经反光镜到达聚光镜，照射在标本上，并由物镜到达 35mm 相机的焦平面上，而经分光镜的反射光束经反光镜和参考物镜到达焦平面，并与水平标本光束形成 19° 夹角。通过实验证明，利用这种系统不仅可以记录标本的全息图，同时可用于样本 3D 信息的模型重建，此外也证明了传统的双光束干涉能够用于模型重建。

1.4.3 共焦显微镜方法

在获取微观样本 3D 信息的技术中,共焦显微镜是其中最具有优势的,可以用它对厚组织切片产生质量很高的 3D 图像。1957 年, Minsky 提出了自己的专利——载物台扫描共焦光学系统,其简单的共焦原理光路如图 1.8 所示。

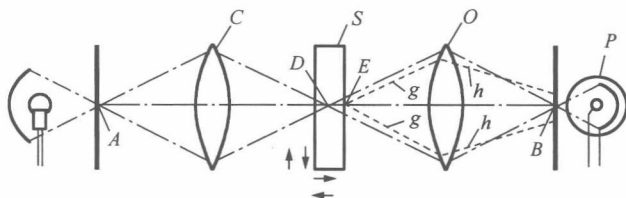


图 1.8 载物台扫描共焦光学系统^[9]

图 1.8 中,聚光镜 C 汇聚针孔 A 的光线于标本 S 上的 D 点,物镜 O 将 D 点成像于另一针孔 B 点,并被光电器 P 接收信号,但是标本上另一点 E 由于不在焦点上,从 g 到 h 的光线不能全部通过针孔 B ,大大削弱了 E 点像的清晰程度,因此,共焦显微镜可以在很大程度上提高分辨能力。同时也可以知道,横向改变载物台上标本的位置,可以得到标本上同一焦平面上不同点的清晰的像,纵向改变标本的位置,可以得到标本上不同焦平面上点的清晰的像。

利用共焦显微镜光学成像系统,除了照射到标本上的光线,其他散射的光线不能通过光路系统,这种光学系统具有以下优势^[10]。

- (1) 减少光源散射所造成的像的模糊程度。
- (2) 增强有效的分辨率。
- (3) 提高信噪比。
- (4) 允许对厚的、散射光线严重的标本进行清晰的观察。
- (5) xy 方向的扫描可以扩大标本的测试范围。
- (6) 放大倍数的电子调节。
- (7) 尤其适合标本光学属性的量化研究。
- (8) 使用暗视场光阑、环形像图等调节孔径,可以得到无穷孔径数值平面。
- (9) 使用相对简单的设备可以得到复杂的对比效果。
- (10) 允许使用低复杂度的物镜,例如,远工作距离、紫外线、红外线成像的物镜等,但需要严格校正在一个轴点上。

由于共焦显微镜一次只能扫到标本上一个点,所以速度很慢,效率也很低。

此外,共焦显微镜成本较高,一般需要数十万到上百万美元,导致该设备虽然已经出现了近30年,且能够应用于实际,但是仍旧无法广泛使用,只能局限在实验室使用。

1.4.4 CT 显微镜方法

全息显微摄影术不仅记录了标本的信息,同时也记录了显微镜的内部结构,这严重限制了该技术的使用^[11],而共焦显微镜虽然能够应用于实际,但是其昂贵的价格使其很难作为普及的实验工具,另外,共焦显微镜只限于荧光样本的观测,在很大程度上限制了其使用范围。

与共焦显微镜相比,CT (Computed-Tomography) 显微镜是一种在价格上可以将其有效替代的产品,CT 光学显微镜有两种系统可以实现其功能^[12]。

一种是直接将 X 射线 CT 技术应用于光学显微镜,可以通过在样本周围旋转显微镜系统,或显微镜系统固定不动,样本自转来实现。在该系统中,样本的空间尺寸要小于物镜的焦长或物镜与聚光镜之间的距离,以便样本能够在景深范围内旋转,因此,这种系统不能观察大尺寸的、可延展的或形状不固定的样本^[13]。图 1.9 为 CT 显微镜的坐标系系统。

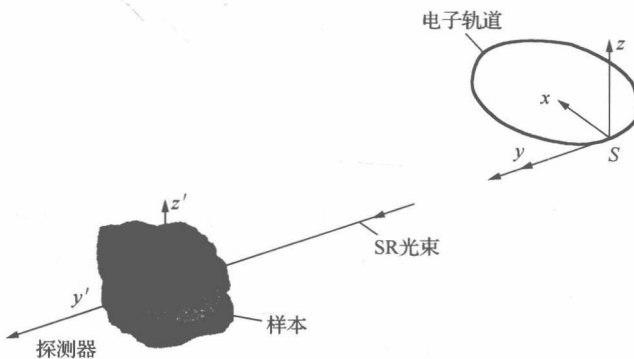


图 1.9 CT 显微镜的坐标系系统^[14]

通过使用断层照相术,不需要对样本 $s(x', y', z')$ 的每个位置 (x', y', z') 进行直接局部度量(这样处理经常会对样本的某个区域有损伤),就能决定样本的内部结构。这里,定义 x, y, z 为实验室坐标系, x', y', z' 为样本坐标系。X 射线来源于 x, y, z 坐标系的切点 S , 并沿着 y 向传播, z 轴垂直于电子储藏环轨迹。 z' 轴要么平行于 z 轴,要么平行于 x 轴。大多数情况下,样本 $s(x', y', z')$ 由吸收系数 $\mu(x', y', z')$ 表示,但有时也用折射系数 $n(x', y', z')$ 或外部磁场(和 X 射线束的偏