

厚试样层析图像重构的研究*

张 平 吴 震 王翠英 向际鹰

(华中理工大学光电子工程系 武汉 430074)

提要 从激光在厚试样中入射和受激发荧光在试样中出射时光能的吸收与散射损耗的基本原理获得了光学系统接收荧光的归一化光强表达式。给出了迭代法、FFT 方法的数学模型,进行了计算模拟,并分析比较了 FFT 方法和迭代法的计算量和计算精度。给出了用 FFT 法层析恢复后的图像。

关键词 厚试样,层析图像,共焦扫描,显微术

1 引 言

激光共焦扫描显微术以其独有的高轴向分辨率与横向分辨率被誉为超分辨率成像。共焦扫描荧光显微镜的层析特性使之具有对厚试样成三维图像的能力。由于厚试样对入射激光束与被激发荧光的散射、吸收等损耗,往往使深层试样的图像信息被湮没^[1]。这时当用二维层析图像重构试样三维图像时,则必须对这种损耗以某种数学模型对图像进行必要的修正,以得到真实的三维图像。本文采用迭代法和 FFT 方法对厚试样的层析图像进行了计算模拟与图像恢复,得到了较好的效果。

2 光在试样中传播的数理模型

设平行光经物镜会聚在入射试样时的光能量为

$$I_0 = \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \cos\theta R^2 \sin\theta = \pi l R^2 \sin\omega \quad (1)$$

式中 ω 为半孔径角, θ 为球坐标中心线与 z 轴夹角,球坐标 (θ, ϕ, R) 以 P 为原点。 ϕ 是 xy 平面的夹角, R 为会聚光的波面半径,参见图 1。

光在试样中传播时按指数形式衰减,衰减因子 α 与混合型坐标 (z', θ, ϕ) 有关,为表示简洁起见,以下用 r' 代替混合坐标 (z', θ, ϕ) ,以 r 代替直角坐标 (x, y, z) 。图 1 中, (z', θ, ϕ) 的原点为 P , z' 是直角坐标中的 z 轴坐标, θ, ϕ 为球坐标系中的 θ, ϕ 。经衰减后入射光能量为

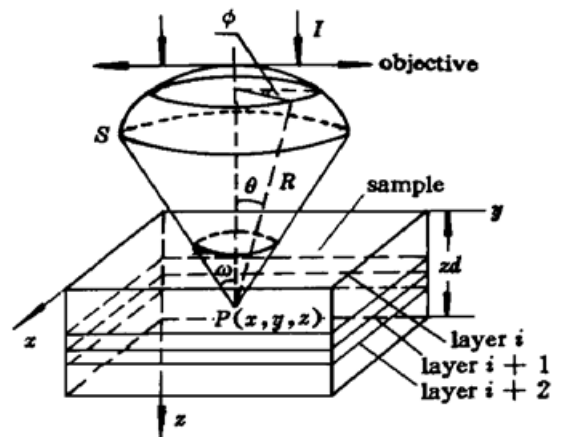


图 1 球坐标示意图

Fig. 1 Spherical coordinate scheme

* 国家自然科学基金资助项目。

$$I_{in} = \int_0^{\omega} \int_0^{2\pi} I \cos\theta R^2 \sin\theta \, d\theta \, d\phi \exp\left\{ \int_0^z [-dz' \cdot \alpha(z', \theta, \phi) / \cos\theta] \right\} \quad (2)$$

定义入射损耗因子 γ_{in} 为

$$\gamma_{in} = \frac{I_{in}}{I_0} = \frac{1}{\pi \sin^2 \omega} \int_0^{\omega} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin\theta \cos\theta \exp\left\{ \int_0^z [-dz' \cdot \alpha(z', \theta, \phi) / \cos\theta] \right\} \quad (3)$$

若荧光效率为 $\rho(r)$, 激发的荧光 F 为

$$F(r) = \rho(r) I_{in}(r) \quad (4)$$

被物镜收集的荧光 F_0 为

$$F_0(r) = \int_0^{\omega} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \frac{F}{4\pi} \sin\theta = \frac{1 - \cos\omega}{2} F(r) \quad (5)$$

若荧光的衰减因子与入射光衰减因子相同, 出射的荧光 F_{out} 为

$$F_{out}(r) = \int_0^{\omega} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \frac{F}{4\pi} \sin\theta \exp\left[\int_0^z \left| -\frac{dz'}{\cos\theta} \alpha(z', \theta, \phi) \right| \right] \quad (6)$$

定义出射损耗因子 γ_{out} 为

$$\gamma_{out}(r) = \frac{F_{out}(r)}{F_0(r)} = \frac{1}{2\pi(1 - \cos\omega)} \int_0^{\omega} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin\theta \exp\left[\int_0^z \left| -\frac{dz'}{\cos\theta} \alpha(z', \theta, \phi) \right| \right] \quad (7)$$

即

$$F_{out}(r) = \gamma_{out}(r) F_0(r) \quad (8)$$

将(5)式, (4)式, (3)式依次代入(8)式, 并对 $F_{out}(r)$ 进行归一化得

$$f(r) = F_{out}(r) / \left[\frac{1 - \cos\omega}{2} I_0 \right] = \gamma_{in}(r) \gamma_{out}(r) \rho(r) \quad (9)$$

在观察最上面一层时, 光能量没有损耗, 即 $(\gamma_{in}, \gamma_{out} = 1)$, $f(r) = \rho(r)$, $\rho(r)$ 可认为是所要求的原始信息。

3 厚试样图像恢复的数理模型

为了对厚试样进行有效的恢复, 重构真实的三维图像, 可采用迭代法和 FFT 法对试样的光损耗进行有效的补偿, 从而使图像恢复获得满意的结果。

3.1 迭代法

为处理简单起见, 假设厚试样由 n 层构成, 每层厚度为 Δz , 且假定每层中沿 z 方向衰减因子是恒定的, 实际上衰减因子可能每一层略有变化, 但变化不大。光束经过 $n - 1$ 层厚达到扫描点, 光束每经过一层都要乘上一个衰减因子。若令 $d\theta = \frac{\omega}{N}$, $d\phi = \frac{2\pi}{M}$, 为减小误差, $\cos\theta$ 和 $\sin\theta$ 取 θ_j 和 θ_{j-1} 之间的平均值, 即

$$\langle \cos\theta \rangle = \frac{N}{\omega} \int_{\theta_{j-1}}^{\theta_j} d\theta \cos\theta = \frac{N}{\omega} (\sin\theta_j - \sin\theta_{j-1})$$

$$\langle \cos\theta \sin\theta \rangle = \frac{N}{\omega} \int_{\theta_{j-1}}^{\theta_j} d\theta \cos\theta \sin\theta = \frac{N}{\omega} (\sin^2\theta_j - \sin^2\theta_{j-1})$$

则(3)式和(7)式变为

$$\gamma_{in}(r) = \frac{1}{M \sin^2 \omega} \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^M (\sin^2\theta_j - \sin^2\theta_{j-1}) \exp\left[-\sum_{i=1}^{n-1} \frac{\omega \alpha(i, \theta_j, \phi_k) \Delta z}{N (\sin\theta_j - \sin\theta_{j-1})} \right] \quad (10)$$

$$\gamma_{out}(r) = \frac{1}{M(1 - \cos\omega)} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^M (\cos\theta_{j-1} - \cos\theta_j) \exp\left[-\sum_{i=1}^{n-1} \frac{\omega \alpha(i, \theta_j, \phi_k) \Delta z}{N (\sin\theta_j - \sin\theta_{j-1})} \right] \quad (11)$$

式中 $\alpha(z', \theta, \phi) = \begin{cases} \alpha_1 & \rho(z', \theta, \phi) < h \\ \alpha_2 & \rho(z', \theta, \phi) > h \end{cases}$ 可用下述两种方法确定: (1) 选取不同的 α_1, α_2 直到不同层间相同部分有相近光强为止; (2) 对均匀透明样品进行测试, 得出了光强 F 随 z 的变化曲线, 取不同的 α 计算得出 Y_{in}, Y_{out} 随 z 变化曲线, 同 F 曲线相近曲线的 α 值即为 α_2 , 再对不均匀的透明物体用上述方法求出 α_1 . 图像恢复的具体作法是对第一层有 $\rho(1, \theta, \phi) = f(1, \theta, \phi)$ 及 $\alpha(1, \theta, \phi)$, 利用(10)式, (11)式, (9)式, 计算得到 $\rho(2, \theta, \phi)$, 则可得到第二层衰减因子 $\alpha(2, \theta, \phi)$, 如此重复即可还原原始图像 $\rho(i, \theta, \phi)$.

3.2 FFT 法

FFT 法是针对衰减“较小”的情况下一种图像恢复方案, 衰减是与衰减因子 $\alpha(r')$ 、试样层深度 z 有关, 取两者最大值之积 Σ 作为衰减度的数学描述

$$\Sigma = \|\alpha\| \cdot z_d = \max \alpha(r') \cdot \max z \tag{12}$$

用 $\|\alpha\|$ 及 z_d 对 $\alpha(r')$ 及 z 进行归一化, 用归一化的 $\alpha(r')$ 及 \tilde{z} 将指数因子改写后代入(9)式, 用 z 代替 \tilde{z} , 用 $\alpha(r')$ 代替 $\alpha(r')$ 得

$$f(r) = \rho(r) \cdot \frac{1}{\pi \sin^2 \omega} \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin\theta \cos\theta \exp\left[-\Sigma \int_0^{\tilde{z}} \frac{dz'}{\cos\theta} \alpha(r')\right] \cdot \frac{1}{2\pi(1-\cos\omega)} \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin\theta \exp\left[-\Sigma \int_0^{\tilde{z}} \frac{dz'}{\cos\theta} \alpha(r')\right] \tag{13}$$

式中引入衰减因子之后, 荧光效率 $\rho(r)$ 可改写为关于 (r, Σ) 的形式, 可用解析函数 $\rho(r)$ 的 Σ 线性和来表示:

$$\rho(r) = \rho_0(r) + \Sigma \rho_1(r) + \Sigma^2 \rho_2(r) + \dots \tag{14}$$

指数因子可用泰勒展开式展开, 和式(14)代入(13)式后, 将式中的积分展开相乘得

$$f(r) = [\rho_0(r) + \Sigma \rho_1(r) + \Sigma^2 \rho_2(r) + \dots] \cdot \left[1 - \Sigma \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\tilde{z}} dz' (c_{in} \sin\theta + c_{out} \tan\theta) \alpha(r')\right] \tag{15}$$

式中
$$c_{in} = \frac{1}{\pi \sin^2 \omega} \quad c_{out} = \frac{1}{2\pi(1-\cos\omega)} \tag{16}$$

因 Σ 很小, 可以认为 $f(r)$ 约等于 Σ 的 0 次幂, 则

$$f(r) = \rho_0(r) \tag{17}$$

因此可得

$$\rho_1(r) = \rho_0(r) \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\tilde{z}} dz' [(c_{in} \sin\theta + c_{out} \tan\theta) \alpha(r')] \tag{18}$$

将(17)式, (18)式代入(14)式有

$$\rho(r) = f(r) [1 + \Sigma c(r)] \tag{19}$$

式中

$$c(r) = \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\tilde{z}} dz' (c_{in} \sin\theta + c_{out} \tan\theta) \alpha(r') \tag{20}$$

上述运算中均略去了 Σ^2 以上的项。

为了计算小圆锥区域的三重积分 $c(r)$, 见图 2 所示, 圆锥中任一点坐标为 (x', y', z') 变换成以 $P(x, y, z)$ 为原点的右手笛卡尔坐标 (x'', y'', z'') , 式(20)可变换成

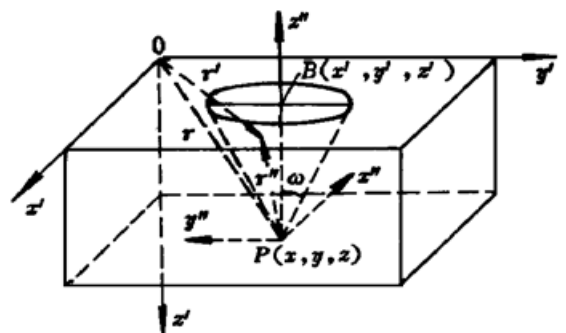


图 2 积分区域示意图
Fig. 2 Scheme of integration area

$$\begin{aligned}
c(r) &= \int_0^z dz'' \oint_{B(x,y,r_0)} dx'' dy'' \frac{1}{z''} (c_{in} \cos^3 \theta + c_{out} \cos^2 \theta) \alpha(r - r'') \\
&= \int_0^z dz'' \oint_{B(x,y,r_0)} dx'' dy'' \frac{1}{z''} \left[c_{in} \frac{z''}{(x''^2 + y''^2 + z''^2)^{3/2}} + c_{out} \frac{1}{(x''^2 + y''^2 + z''^2)} \right] \alpha(r - r'') \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} dr'' k(r'') \alpha(r - r'') = k(r) \odot_3 \alpha(r)
\end{aligned} \quad (21)$$

其中 \odot_3 为三维卷积, 在 $0 < z'' \leq z, x''^2 + y''^2 \leq (z'' \tan \omega)^2$ 处有

$$k(r) = c_{in} \frac{z''}{(x''^2 + y''^2 + z''^2)^{3/2}} + c_{out} \frac{1}{(x''^2 + y''^2 + z''^2)} \quad (22)$$

在其它地方 $k(r)$ 均为 0。

对式(21)的三维卷积可用 FFT 计算即

$$c(r) = F^{-1} \{ F[k(r)] \cdot F[\alpha(r)] \} \quad (23)$$

对第一层有 $f(r) = \rho(r)$ 和 $\alpha(1, x', y')$, 用式(23)式计算卷积 $c(r)$, 然后由(19)式计算第二层 $\rho(r)$, 重复上述步骤可对深层图像进行快速恢复。

4 结果和讨论

4.1 两种方法的比较

4.1.1 计算量比较

迭代法从离散的角度出发并进行了精确积分, FFT 法通过对吸收度 Σ 的限制、对模型 $\rho(r)$ 进行两次简化, 忽略了 Σ^2 项及更高项, 将两积分式 $\mathcal{Y}_{in}, \mathcal{Y}_{out}$ 相乘简化为一个积分式 $c(r)$, 通过坐标将三维积分变换成三维卷积, 改用两次傅里叶快速正变换代替三维积分(因 z 方向层数较少可用直接积分), 大大地节省了计算工作量。

对于迭代法, 每一点均需进行 $2N \cdot M$ 次实数乘和实数加, 一个 $N \times M$ 平面需 $N^2 \cdot M^2$ 次实数乘和实数加。对于 FFT 法, 每个点的一次二维快速傅里叶变换需 $\frac{1}{2} \log_2(N \cdot M)$ 次复数乘, $\log_2(N \cdot M)$ 次复数加, 还有一次两个 $N \times M$ 复矩阵的点乘等量于

$$N \cdot M 6 \log_2(N \cdot M) + 4NM \text{ 次实数乘}$$

$$N \cdot M 9 \log_2(N \cdot M) + 2NM \text{ 次实数加}$$

对 512×512 图像, 迭代法有 2^{36} 次实数乘, 2^{36} 次实数加, 而 FFT 法则只有 112×2^{18} 次实数乘和 164×2^{18} 次实数加, 计算量只有迭代法的 $2^{36} / (112 \times 2^{18}) = 1/2340$ 。

另外在 z 方向上迭代法需进行两次积分, 因而总计算时间随层数 n 以 n^2 次增长 [$T_n = (N/m)^2 T_m$], 而 FFT 法只需一次 z 向积分, 时间随层数线性增加。

4.1.2 精度比较

FFT 法两次简化使得精度低于迭代方案, 通过实际计算进行比较, 实验数据取自文献 [1]。

取两种均匀样品, 其衰减度 Σ 均为 0.5, $z_d = 1.0$, 分 10 层进行层析, 衰减函数分别为甲样品 $\alpha_1(r') = \rho_0$, 乙样品 $\alpha_2(r') = \rho_0 e^{-\rho_0}$ (其中 ρ_0 为常数)。因 $\alpha(r')$ 是常数, 所以迭代法无需用离散积分, 直接采用下式计算, 即将(3)式代入(9)式得

$$f(r) = \rho(r) \cdot \frac{1}{\pi \sin^2 \omega} \int_0^\pi d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin \theta \cos \theta \exp \left[\int_0^z \left| -\frac{dz'}{\cos \theta} \alpha(z', \theta, \phi) \right| \right]$$

$$\cdot \frac{1}{2\pi(1 - \cos\omega)} \int_0^\omega d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \sin\theta \exp \left[\int_0^r - \frac{dz'}{\cos\theta} \alpha(z', \theta, \phi) \right] \quad (24)$$

而 FFT 方案无需卷积可直接利用式(19), (20) 计算 $\rho(r)$, 令 $\alpha(r') = A$, 取 $\omega = 60^\circ$, (24) 和 (19) 式分别简化为

$$f(r) = \rho(r) \cdot \left[1 - \frac{4}{3} \Sigma z A \right] (1 - \ln 4 \cdot \Sigma z A) \quad (25)$$

$$\rho(r) = f(r) \cdot \left[1 + \left[\frac{4}{3} + \ln 4 \right] \Sigma z A \right] \quad (26)$$

可得表 1 计算结果和图 3 所示曲线。

表 1 精度比较

Fig. 1 Precision comparison

	layer experimen		FFT	iteration	ideal		layer experimen		FFT	iteration	ideal
	-tal data	-tal data			value		-tal data	-tal data			value
	Σz	$f(z)$	$\rho(z)$	$\rho(z)$	$\rho(z)$		Σz	$f(z)$	$\rho(z)$	$\rho(z)$	$\rho(z)$
sample A	0.00	1.000	1.00000	1.00000	1.000	sample B	0.00	1.000	1.00000	1.00000	1.000
	0.05	0.873	0.93236	0.93551	1.000		0.05	0.951	0.99021	0.99146	1.000
	0.10	0.762	0.86562	0.87720	1.000		0.10	0.905	0.97962	0.98451	1.000
	0.15	0.666	0.80184	0.82582	1.000		0.15	0.861	0.96749	0.97826	1.000
	0.20	0.582	0.74028	0.77956	1.000		0.20	0.819	0.95407	0.97282	1.000
	0.25	0.509	0.68203	0.73876	1.000		0.25	0.779	0.93959	0.96833	1.000
	0.30	0.445	0.62653	0.70220	1.000		0.30	0.741	0.92430	0.96495	1.000
	0.35	0.390	0.57561	0.67154	1.000		0.35	0.705	0.90846	0.96284	1.000
	0.40	0.341	0.52648	0.64327	1.000		0.40	0.671	0.89232	0.96221	1.000
	0.45	0.298	0.48035	0.61857	1.000		0.45	0.639	0.87611	0.96300	1.000
loss ratio 70%						loss ratio 36%					
			52%	38%	0%				12%	4%	0%

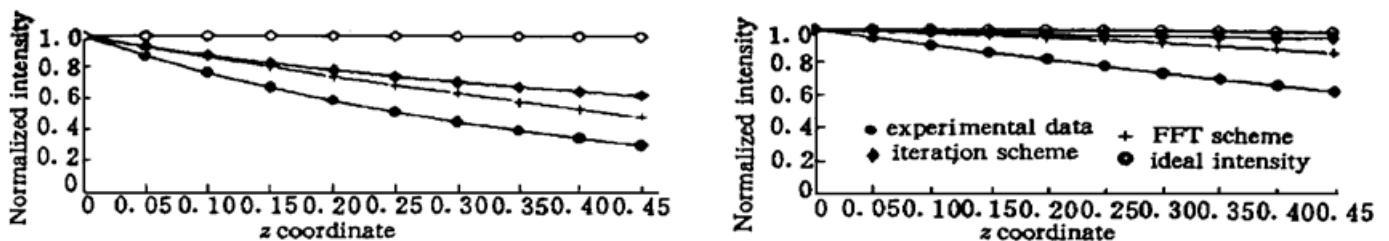


图 3 对 $\alpha = \rho$ (左), $\alpha = \rho \exp(-\rho)$ (右) 的图像恢复曲线

●: 实验数据; + : FFT 方案; ◇: 迭代方案; ○: 理想光强

Fig. 3 Image restoration curves for $\alpha = \rho$ (left), for $\alpha = \rho \exp(-\rho)$ (right)

由图 3 可见, 深度较浅 ($z < 0.15$) 或吸收较小 [$\alpha = \rho \exp(-\rho)$] 时, 两种方案精度都较高, 恢复效果较好, 对吸收较大时 ($\alpha = \rho$), 迭代法精度要明显地高于 FFT 法。

4.2 图像恢复模拟

我们以透明样液中的生物体切片的二维图像进行模拟。在深度为 z 处的荧光图像应与第一层图像图 4(c) 相同, 但由于样液及组织对激光与荧光吸收、散射不同, 致使实际观察到的图像 4(a) 与第一层图像相差很大。利用本文中 FFT 方法中给出的公式(19), (21), (22), (23) 计算 $\rho(r)$, 即可得到恢复后的图像[图 4(b)]。

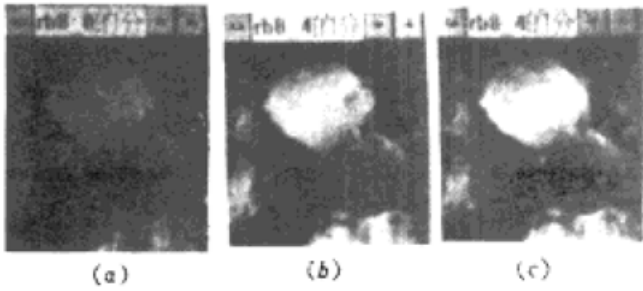


图 4 厚试样深层图像的恢复

(a) 第四层图像; (b) 恢复后的第四层图像; (c) 第一层图像

Fig. 4 The restoration of deeper layer image in thick sample

(a) the fourth layer image; (b) the fourth layer image after restoration; (c) the first layer image

在用(21)式计算任意一点 (x, y, z) 的 $c(r)$ 时,先要计算 $F[k(r)]$,而由(22)式知 $k(r)$ 是由 x'', y'', z'' 决定的,而 x'', y'', z'' 是相对于 (x, y, z) 的坐标。注意到 $k(r)$ 仅在锥形区域内有意义,利用样本实际厚度不大,一般为数十微米(可作数十层的层析,即每层为 $1\ \mu\text{m}$ 左右),可认为每一层的 $\alpha(r)$ 相等,即 $\alpha(x, y, z_1) = \alpha(x, y, z_2)$,利用(23)式计算出 $c(r)$ 代入(19)式即可求出 $\rho(r)$ 。

本文从图像恢复模拟出发,仅计算四层,可以看出,要获得清晰的反映客观实际的图像,必须对每一层的层析图像进行恢复,然后才能最后重构成一幅真正的三维图像,这足以说明图像恢复的必要性。

参 考 文 献

- 1 J. B. T. M. Roerdink, M. Bakker. An FFT-based method for attenuation correction in fluorescence confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 1993, 169: 3~ 14

Study of Restoration of Sectional Images in a Thick Sample

Zhang Ping Wu Zhen Wang Cuiying Xiang Jiying

(Dept. of Optoelectronic Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract According to the principle of the light attenuation due to absorption and scattering of both the excitation and the fluorescence lights in a deep sectional thick sample, the normalized fluorescence intensity expression is obtained for the light received by an optical system. The mathematical models of the iterative and FFT treatment methods are given. Using computer analog the FFT method is compared with the iterative one in two respects of numerical accuracy and computational efficiencies. Finally, the real image after restoration of the sectional sample is reconstructed by computer simulation with the FFT method.

Key words thick sample, sectional image, confocal scanning, microscopy