

# 基于压缩感知的荧光显微多光谱成像

王金成 匡翠方 王轶凡 刘旭

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027)

**摘要** 将压缩感知(CS)理论应用于荧光显微成像,设计搭建了一套新型的显微成像系统。使用液晶光阀实现待测图像到随机光斑的线性投影,以单点探测进行荧光信号采集,结合CS信号重构理论得到样品图像。采样数远低于Nyquist-Shannon定理要求的次数,成像过程无需扫描,系统结构简单。相对于传统的更换滤光片和光栅扫描成像的光谱成像模式,该系统仅需要使用光谱仪采集信号、对光谱分波段计算即可得到荧光样品的多光谱图像。荧光显微成像过程中存在荧光衰减的影响,实验中对数据进行强度归一化预处理,结果表明该处理方法有效消除了荧光衰减对图像重构的影响。

**关键词** 显微; 光谱成像; 压缩感知; 强度归一化

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201340.1204003

## Multispectral Fluorescence Microscopic Imaging Based on Compressive Sensing

Wang Jincheng Kuang Cuifang Wang Yifan Liu Xu

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University,  
Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

**Abstract** Compressive sensing (CS) theory is used in fluorescence microscopy imaging and a new microscopic imaging system is designed and implemented. A liquid crystal light valve is employed to calculate the linear projection of an image onto pseudorandom patterns. Fluorescence is collected on a point detector. Images of the samples are acquired combined with the reconstruction theory of CS. The number of samples is smaller than that imposed by the Nyquist-Shannon theorem. The system hardware is simple as scanning is unnecessary during the imaging process. Compared with the traditional spectral imaging modalities, such as using optical filter and raster scanning, this system only needs a spectrometer to acquire signal and then multispectral images are reconstructed from measurements corresponding to a set of sub-bands. As the fluorescence microscopy imaging suffers fluorescence decay during imaging process, in this experiment, data preprocessing such as intensity normalization is applied and the results indicate that the influence of fluorescence decay on reconstruction is eliminated effectively with this processing method.

**Key words** microscopy; spectral imaging; compressive sensing; intensity normalization

**OCIS codes** 170.2520; 110.1758; 110.4234

收稿日期: 2013-06-28; 收到修改稿日期: 2013-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(61205160)、浙江省钱江人才计划基金(2011R10010)、教育部博士点基金(20110101120061、20120101130006)

作者简介: 王金成(1987—),男,硕士研究生,主要从事压缩感知光谱成像方面的研究。

E-mail: wjincheng\_2006@163.com

导师简介: 匡翠方(1977—),男,博士,副教授,主要从事超分辨显微成像方面的研究。

E-mail: cfkuang@zju.edu.cn(通信联系人)

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

## 1 引 言

可压缩信号的少量线性投影包含了重构和处理所需的足够信息,基于此 Candès 等<sup>[1-3]</sup>提出了压缩感知(CS)理论。CS将压缩和采样结合,以远低于 Nyquist-Shannon 定理要求的采样率即可精确重构稀疏信号。包括生物图像在内的大部分图像都是可压缩的,因此 CS 适用于模数转换<sup>[4-5]</sup>、天文学<sup>[6]</sup>、数字全息<sup>[7]</sup>和医学共振成像<sup>[8-9]</sup>等众多领域。相较于完善的理论发展,基于 CS 硬件实现的实际应用仍非常有限。荧光显微成像因其高光学灵敏度和分子识别能力,是生物医学研究<sup>[10]</sup>的基本工具,本文将 CS 应用于荧光显微成像系统,在宽场激励的条件下使用桶探测模式,借助 CS 重构算法,无需扫描即可恢复样品图像。

荧光分子在激发光照射的过程中会逐渐失去发光能力,这个过程称为荧光衰减<sup>[11-12]</sup>。虽然低采样率是压缩感知的一个显著优势,但基于单点探测模式仍需一定数量的随机测量,这个过程将不可避免地受到荧光衰减的影响,以致无法准确重构图像。降低激发光强度和减少曝光时间可以减弱荧光衰减,但同时降低了荧光强度从而导致信噪比下降。本文提出在重构计算前首先进行强度归一化处理,实验结果表明该方法有效消除了荧光衰减造成的影响。系统探测端使用光纤光谱仪,对采集到的光谱数据分波段分别计算<sup>[13]</sup>,无需扫描或更换滤光片即得到荧光样品的多光谱图像。

## 2 压缩感知成像理论

压缩感知是建立在两个基本原则上的全新的信号采集理论<sup>[14]</sup>:一是信号的稀疏性,二是感知模式的非相干性。对于二维图像,可以将  $N$  个像素点重新排列成一个  $N \times 1$  维列向量  $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N$ 。 $\mathbb{R}^N$  空间的任意信号都可以表示为一组  $N \times 1$  维向量  $\boldsymbol{\psi}_i$  的线性组合  $\mathbf{x} = \sum_{i=1}^N s_i \boldsymbol{\psi}_i$ ,  $s_i = \langle \mathbf{x}, \boldsymbol{\psi}_i \rangle = \boldsymbol{\psi}_i^T \mathbf{x}$  是权重系数,写成矩阵形式即

$$\mathbf{x} = \boldsymbol{\Psi} \mathbf{s}, \quad (1)$$

式中  $\boldsymbol{\Psi} = \{\boldsymbol{\psi}_1, \boldsymbol{\psi}_2, \dots, \boldsymbol{\psi}_N\}$ ,  $\mathbf{s}$  是  $N \times 1$  维列向量,若  $s_i$  只有  $K \ll N$  个是非零的,其余大部分系数都为零或近似为零,则称这个信号是  $K$  稀疏的,在稀疏矩阵  $\boldsymbol{\Psi}$  下具有稀疏表征。大部分自然信号都可以在  $\boldsymbol{\Psi}$  选取合适的情况下被稀疏表征。压缩感知利用信号的稀疏性,将采样和压缩结合,从少量的线性测量中

重构数据<sup>[1,15]</sup>。根据 CS 理论,并非测量信号本身,而是要采集信号与测量基向量  $\boldsymbol{\phi}_j$  的内积  $y_j = \langle \mathbf{x}, \boldsymbol{\phi}_j \rangle$ ,  $j = 1, 2, \dots, M$ , 考虑测量噪声  $\mathbf{e}$ , 矩阵形式可写为

$$\mathbf{y} = \boldsymbol{\Phi} \mathbf{x} + \mathbf{e} = \boldsymbol{\Phi} \boldsymbol{\Psi} \mathbf{s} + \mathbf{e}, \quad (2)$$

式中  $\mathbf{y}$  是  $M$  个线性测量值  $y_j$  组成的列向量,  $\boldsymbol{\Phi}$  是  $M \times N$  维测量矩阵,因为  $K < N$ , 因此从(2)式中求解  $N$  维信号  $\mathbf{x}$  是个病态问题,会有无穷多个可能解。CS 理论表明,当  $\boldsymbol{\Phi}$  和  $\boldsymbol{\Psi}$  是不相干的且测量次数  $M$  足够多时<sup>[16]</sup>,  $\mathbf{x}$  可以被近似恢复。当测量基  $\boldsymbol{\Phi}$  是随机矩阵或伪随机矩阵时,可以满足与大部分稀疏矩阵的非相干性。从随机测量  $\mathbf{y}$  恢复信号  $\mathbf{x}$  可以转化为求解  $\ell_1$  范数最小化问题:

$$\mathbf{s}' = \operatorname{argmin} \|\mathbf{s}'\|, \text{ s. t. } \|\mathbf{y} - \boldsymbol{\Phi} \boldsymbol{\Psi} \mathbf{s}'\|_2 < \epsilon, \quad (3)$$

式中 s. t. 表示约束条件,  $\epsilon$  是噪声幅值上界。由于自然图像的离散梯度大多是稀疏的,因此使用全变差<sup>[17]</sup>(TV)法重构信号效果优于  $\ell_1$  范数优化方法。采用 TV 算法,模型<sup>[18]</sup>如下所示:

$$\min[F_{\text{TV}}(\mathbf{x})], \text{ s. t. } \boldsymbol{\Phi} \mathbf{x} = \mathbf{y}, \quad (4)$$

式中  $F_{\text{TV}}(\mathbf{x}) = \sum_i \|D_i \mathbf{x}\|$ ,  $D_i \mathbf{x}$  为信号  $x_i$  处的离散梯度。TV 法基于信号离散梯度的稀疏性,计算过程中不需要再选择表达基。

## 3 实验装置

实验系统的原理和装置如图 1 所示。图中 PC 为计算机,OL 为物镜,FL 为场镜,LCLV 为液晶光阀。图 1(a)为压缩感知荧光显微多光谱成像系统架构图。波长 488 nm 的激光由二色镜反射后照射荧光样品,被激发出的荧光经过通带为 500~550 nm 的滤波片滤波后被成像系统成像在液晶光阀面。电脑控制液晶光阀加载随机光斑,对样品的像进行强度调制,选用随机抽样的 Hadamard 矩阵作为测量基  $\boldsymbol{\Phi}$ 。之后光束被透镜组收集至多模光纤,导入光谱仪记录光谱数据。之所以选择光谱仪作为探测器,是因为可以在系统不作变动情况下实现两类成像:将光谱数据进行强度积分后再用于计算即为桶探测模式,而对光谱分波段分别压缩重构即可得到多光谱图像。搭建如图 1(b)所示实验装置,系统基于一台 IX71 (Olympus) 显微镜,电寻址液晶光阀对角线尺寸为 0.9 inch (1 inch = 2.54 cm),分辨率为 1024 pixel  $\times$  768 pixel,光谱仪使用美国海洋光学 QE65000 微型光纤光谱仪。

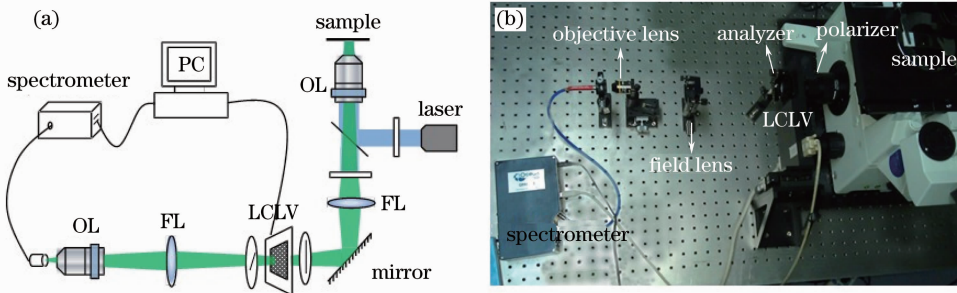


图 1 (a) 系统原理图; (b) 实验装置图

Fig. 1 (a) Schematic diagram of the imaging system; (b) experimental setup of the system

#### 4 实验结果和分析

在实验中所用的样品为 20 nm 的黄绿色荧光颗粒 (Molecular Probes, 515 nm Yellow-green FluoSpheres, 美国)。图 2(a) 是传统电荷耦合器件 (CCD) 拍摄的成像视场内荧光团的像。进行了 2000 次随机投影测量后, 对每一次测量数据不是进行光谱细分而是将 500~550 nm 波段强度值积分后作为  $y_i$ , 代入(2)式并结合 TV 重构算法即可得到重构图像。如图 2(b) 所示, 重构图像为 128 pixel × 128 pixel, 并未复现样品的结构特征, 即使提高采样次数重构质量也无法让人满意。

考虑到荧光测量过程中存在荧光衰减, 低于 Nyquist-Shannon 定理的采样率是压缩感知具有的一大优势, 但是基于单点采样模式仍需要一定数量的随机采样而不是一次成像, 时间消耗不可避免, 因此荧光强度衰减致使重构质量不高。图 3(a) 为绘制的第 1 次、第 1000 次和第 2000 次随机测量光谱强度曲线, 可以看到在有荧光信号的 500~550 nm 波段曲线明显下降, 图 3(b) 直观地表明了 2000 次测量过程中荧光光强的衰减。从压缩感知的采样过程来看, 每次的测量值事实上是若干图像像素的组合, 目标的信息包含在不同光强值的差异之

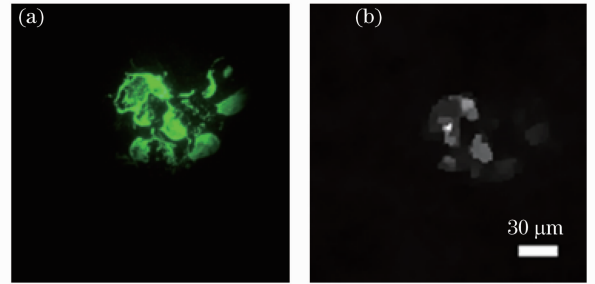


图 2 荧光样品成像结果。(a) 传统 CCD 所成的像; (b) 不采取归一化措施由 CS 重构的像

Fig. 2 Imaging results of fluorescence samples. (a) Image by traditional CCD camera; (b) reconstructed image by CS without normalization [10], 而荧光衰减造成的光强变化和噪声一样会混淆这种差异, 以致将图像信息淹没。

采用强度归一化的方法来解决荧光衰减问题。在每次随机测量后都额外进行一次总光强的测量: 液晶光阀加载一幅随机图片, 记录下被调制后的荧光信号强度  $y'_i$ , 随后加载一张全白图片, 探测器得到的就是样品发出的荧光总光强  $y''_i$ , 然后再加载下一幅随机图片, 依次进行 2000 次采样。因为测量时间相差很短, 可以认为  $y''_i$  就是探测  $y'_i$  时的荧光总强度, 将  $y_i = y'_i / y''_i$  作为归一化后的采样值构成  $y$ , 代

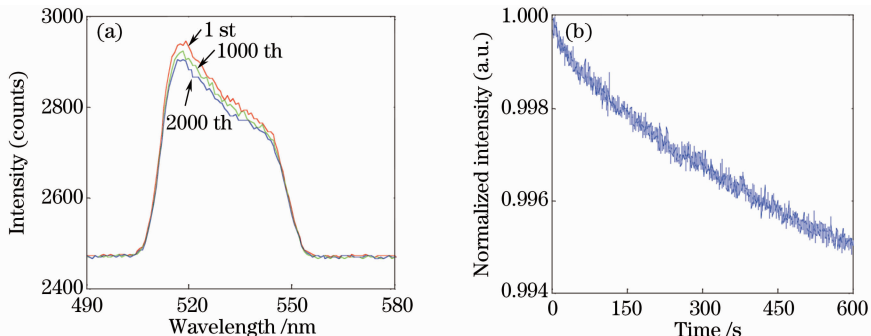


图 3 (a) 光谱曲线; (b) 荧光衰减曲线

Fig. 3 (a) Spectral curves; (b) fluorescence decay curve

入(2)式进行计算。假设第1次和第2000次采样的随机图案是相同的,这段时间荧光衰减比值为 $r$ ,即 $y'_{2000} = ry'_1, y''_{2000} = ry''_1$ ,显而易见 $y_{2000} = y_1$ ,荧光衰减的影响 $r$ 被消除了。这样一来采样次数加倍,但4000次采样对于 $128 \text{ pixel} \times 128 \text{ pixel}$ 的重构分辨率来说采样率也仅为24.4%。采样时间同样被延长,将导致荧光衰减更加显著,但对数据进行了归一化处理可抵消这个不利影响,重构效果有显著改善,如图4(b)、(c)所示。事实上因为每次测量时间很短,可以适当选取每连续随机测量数次后再进行一

次总光强测量,不至对重构有明显影响的情况下大幅降低采样次数。每5次随机采样后获取一次即时总光强,采样率降至14.65%,归一化后重构的图像与图4(b)相比质量略有下降,均方误差为 $5.5828 \times 10^{-4}$ 。在 $500 \sim 550 \text{ nm}$ 波段每 $10 \text{ nm}$ 区间进行强度积分,分别重构计算得到光谱图像如图4(d)~(f)所示,其中 $500 \sim 510 \text{ nm}$ 波段荧光较弱,信号淹没在噪声中,其他波段重构效果良好。图4中重构图像的重构分辨率为 $128 \text{ pixel} \times 128 \text{ pixel}$ ,采样次数为2000次。

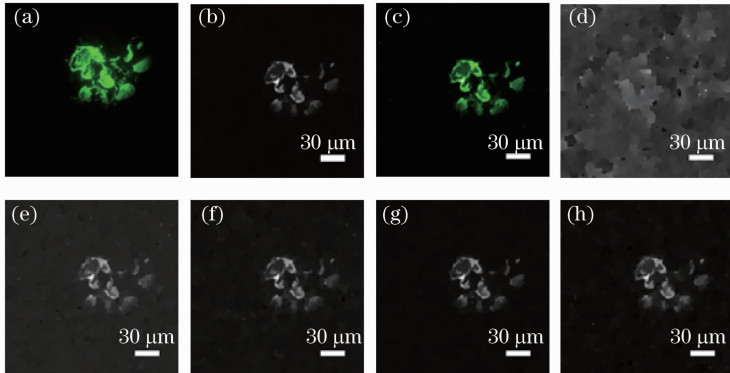


图4 成像结果对比。(a) 荧光样品的原始图像;(b) 压缩感知重构的图像,波长:500~550 nm;(c) 对(b)伪彩色处理后的图像;(d) 500~510 nm 波段重构图像;(e) 510~520 nm 波段重构图像;(f) 520~530 nm 波段重构图像;(g) 530~540 nm 波段重构图像;(h) 540~550 nm 波段重构图像

Fig. 4 (a) Imaging results comparison. (a) Original image of fluorescence samples; (b) reconstructed image by CS the wavelength range of 500~550 nm; (c) pseudo-color map of (b); (d) reconstructed image in the range of 500~510 nm; (e) reconstructed image in the range of 510~520 nm; (f) reconstructed image in the range of 520~530 nm; (g) reconstructed image in the range of 530~540 nm; (h) reconstructed image in the range of 540~550 nm

## 5 结 论

将压缩感知应用于荧光显微多光谱成像,与传统成像相比采样数据量大幅降低。针对荧光衰减问题,采用强度归一化方法,将每次的随机测量值跟与之邻近时刻的总光强相除,以适当增加采样率为代价消除了荧光衰减对图像重构的影像,但采样率仍然远远低于 Nyquist-Shannon 定理的要求。与传统的色散型成像光谱仪需要扫描探测不同,成像系统借助光谱仪,无需扫描即可方便地获得荧光谱带的多光谱图像。对光谱数据分波段计算重构时,细分波段宽度即光谱分辨率,综合考虑光谱分辨率和信噪比,选取了每 $10 \text{ nm}$ 为一个波段,而所用海洋光学光谱仪光学分辨率约为 $1 \text{ nm}$ ,因此理论上可以通过增加采样次数提高信噪比,获得更高的光谱分辨率。

## 参 考 文 献

1 E Candès, J Romberg, T Tao. Robust uncertainty principles;

exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information[J]. IEEE Trans Information Theory, 2006, 52(2): 489-509.  
 2 E Candès, T Tao. Near optimal signal recovery from random projections and universal encoding strategies[J]. IEEE Trans Information Theory, 2006, 52(12): 5406-5425.  
 3 D Donoho. Compressed sensing[J]. IEEE Trans Information Theory, 2006, 52(4): 1289-1306.  
 4 J Yoo, S Becker, M Monge, et al.. Design and implementation of a fully integrated compressed-sensing signal acquisition system [C]. IEEE Int Conf Acoustics, Speech and Signal Processing, 2012. 5325-5328.  
 5 M Mishali, Y C Eldar, O Dounaevsky, et al.. Xampling: analog to digital at sub-Nyquist rates[J]. IET Cir Dev & Systems, 2011, 5(1): 8-20.  
 6 J Bolin, J L Starck, R Ottensamer. Compressed sensing in astronomy [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing, 2008, 2(5): 718-726.  
 7 Wu Yingchun, Wu Xuecheng, Wang Zhihua, et al.. Reconstruction of digital inline hologram with compressed sensing [J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(11): 1109001.  
 吴迎春, 吴学成, 王智化, 等. 压缩感知重建数字同轴全息[J]. 光学学报, 2011, 31(11): 1109001.  
 8 M Lustig, D Donoho, J M Pauly. Sparse MRI: the application of compressed sensing for rapid MR imaging [J]. Magnetic

- Resonance in Medicine, 2007, 58(6): 1182–1195.
- 9 J Trzasko, A Manduca. Highly undersampled magnetic resonance image reconstruction via homotopic  $\ell_0$  minimization[J]. IEEE Trans Medical Imaging, 2009, 28(1): 106–121.
- 10 V Studer, J Bolin, M Chahid. Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 109(26): 1679–1687.
- 11 Wang Yan, Li Heng, Qi Jing, *et al.*. Time-domain fluorescence lifetime measurement and analysis using a streak camera[J]. Chinese J Lasers, 2011, 38(s1): s108001.  
王岩, 李恒, 齐璟, 等. 基于扫描相机的时域荧光寿命测量及分析[J]. 中国激光, 2011, 38(s1): s108001.
- 12 L Song, E J Hennink, T Young, *et al.*. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy[J]. Biophys J, 1995, 68(6): 2588–2600.
- 13 Lu Minghai, Shen Xia, Han Shensheng. Ghost imaging via compressive sampling based on digital micromirror device[J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(7): 0711002.  
陆明海, 沈夏, 韩申生. 基于数字微镜器件的压缩感知关联成像研究[J]. 光学学报, 2011, 31(7): 0711002.
- 14 E Candès, M Wakin. An introduction to compressive sampling [J]. IEEE Signal Processing Magazine, 2008, 25(2): 21–30.
- 15 R Baraniuk. Compressive sensing[J]. IEEE Signal Processing Magazine, 2007, 24(4): 118–124.
- 16 D Takhar, J N Laska, M B Wakin, *et al.*. A new compressive imaging camera architecture using optical-domain compression [C]. SPIE, 2008, 6065: 606509.
- 17 Chen Jing, Wang Yongtian. Research of the compressive imaging technology[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2012, 49(3): 030002.  
陈靖, 王涌天. 压缩成像技术研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2012, 49(3): 030002.
- 18 Zhang Shuo, Wang Jie, Wang Jincheng, *et al.*. A simple calculation method for 3D imaging based on CS[J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(1): 0111004.  
张硕, 王杰, 王金成, 等. 基于压缩感知的三维物体成像的简单计算方法[J]. 光学学报, 2013, 33(1): 0111004.

栏目编辑:何卓铭