

窄带 LED 照明的多光谱显微成像系统研究

王成^{1*}, 刘宾¹, 周楚², 李念宁¹, 张浩南², 项华中¹, 郑刚¹, 王秀丽^{2**}, 张大伟³

¹上海理工大学生物医学光学与视光学研究所医用光学技术与仪器教育部重点实验室, 上海 200093;

²同济大学医学院光医学研究所, 上海市皮肤病医院, 上海 200443;

³上海理工大学现代光学系统重点实验室教育部光学仪器与系统工程研究中心, 上海 200093

摘要 在生物医学领域,为了降低成本,降低对高端器件的依赖,以及实现对无标记样本的光谱和结构等多维度图像分析的目的,基于窄带 LED 光源技术,自主研发了一套多通道 LED 照明的多光谱显微成像系统。本系统在 420~680 nm 范围内系统的光谱分辨率约为 20 nm,空间分辨率优于 2 μm ,在放大倍数为 13 倍时成像范围为 520 μm \times 416 μm 。为了验证系统在临床病理分析中的可行性,采集了小鼠皮肤鳞状细胞原位癌病变病理切片和正常皮肤组织病理切片的多光谱图像。从多光谱图像中可以清楚地观察结构,由图像序列中提取的光谱信息表明,癌变细胞核的反射率在可见光波段内与正常细胞核有明显差异,能有效区分两种细胞。这些实验结果表明,基于 LED 照明的多光谱显微成像系统有望替代传统昂贵、复杂的多光谱成像系统,并可在病理分析中发挥重要作用。

关键词 生物光学; 显微成像; 多光谱成像; 反射率光谱; LED 光源; 组织病理学

中图分类号 O433.1

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.1207006

Multispectral Microimaging System with Narrowband LED Illumination

Wang Cheng^{1*}, Liu Bin¹, Zhou Chu², Li Nianning¹, Zhang Haonan², Xiang Huazhong¹,
Zheng Gang¹, Wang Xiuli^{2**}, Zhang Dawei³

¹Key Laboratory of Medical Optical Technology and Instruments, Ministry of Education, Institute of Biomedical Optics and Optometry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

²Institute of Photomedicine, Shanghai Skin Disease Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200443, China;

³Engineering Research Center of Optical Instrument and System, Ministry of Education, Key Laboratory of Modern Optical Systems, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract In the biomedical field, to reduce the cost and dependence on advanced devices and to realize multi-dimensional image analysis for unlabeled samples, including spectra and structures, a multispectral microimaging system with multi-channel LEDs was independently developed based on narrow-band LED light source technology. The spectral resolution of the system was 20 nm over 420–680 nm, with spatial resolution better than 2 μm and an imaging range of 520 μm \times 416 μm under 13 \times magnification. To verify feasibility of the system for clinicopathological analysis, multispectral images of mouse skin squamous cell carcinomas were collected, for both *in situ* and normal skin tissues. Excitingly, cell structure was clearly observed using the multispectral image system. Spectral information extracted from the image sequence shows that reflectance of the cancerous nucleus has significant difference with that of the normal nucleus in the visible band, allowing the two types of cells to be effectively distinguished. These results indicate that LED illumination-based multispectral imaging systems are promising alternatives to replace traditional, expensive, and complex multispectral imaging systems and play an important role in pathological analysis.

Key words biotechnology; multispectral imaging; microimaging; reflectance spectrum; LED; histopathology

OCIS codes 170.0180; 170.6510; 300.6550; 230.3670

收稿日期: 2020-07-09; 修回日期: 2020-07-22; 录用日期: 2020-08-03

基金项目: 国家自然科学基金(61775140)

*E-mail: c. wang@usst.edu.cn; **E-mail: xlwang2001@aliyun.com

1 引言

传统显微成像技术仅仅能获得物体的形态学和二维空间信息,不能给出感兴趣区域的组分信息,不便于深入研究。而光谱成像技术能同时获得物体的空间信息和光谱信息。随着显微成像技术和光谱成像技术的长足发展,越来越多的研究聚焦于两种技术的有机结合^[1-2]。光谱成像技术最早应用于航空遥感领域^[3-4],它通过接收物体在不同波段光照射下反映的光谱信息,对物体组成成分进行分析,将其与显微成像技术结合就可以在观察物体微观结构的同时获得样品的显微光谱,分析其生化信息,因此,显微光谱成像技术现已广泛应用于刑侦学、农业、病理学、物体表面检测等多个领域^[5-8]。光谱成像技术按照成像光的带宽区分为多光谱成像与高光谱成像。高光谱成像的光谱分辨率通常可达到几十个甚至上百个光谱通道,数量庞大的光谱通道意味着可以获得精细的光谱信息,但同时也会造成“维度灾难”,增加了处理后续数据的难度^[9-10]。多光谱成像技术的光谱通道通常有十几个,系统的带宽一般为 20~50 nm,计算量减小,数据利用度较高。相比高光谱成像,多光谱成像使用经过优化选择的工作波段能够使整个系统更经济、数据处理更简单、工作效率更高。

根据组织光学理论,组织在高光谱的光谱分辨率内展现出的光谱差异并不明显,相邻波段的图像和光谱数据几乎一致^[11-12]。研究表明,某些组织的光谱特性仅在某些波段有显著差异。Zhu 等^[13]在利用显微高光谱成像技术研究胃癌组织的光谱成像时发现苏木精-伊红(H-E)染色的癌组织细胞核和正常组织细胞核在图像上只有细微差异,且仅在 490~550 nm 和 550~700 nm 的波长下,胃癌组织细胞核的透射率光谱较正常组织细胞核有较大的差异,故这两波段可以作为研究两种组织光谱特性的特征波段。廖乘胜等^[14]使用组合光源替代商业显微镜中采用的原有光源,其光源由蓝(460 nm)、绿(520 nm)、红(620 nm)和 570 nm 的 LED 灯珠组成,这种四波段的成像方法可用于特定染色剂的吸光度剥离,能更好地突出组织染色特性。Lu 等^[15]提出了一种基于包含 10 个波段的多光谱图像提取有丝分裂细胞的方法,利用 10 个波段的图像提取细胞核信息,准确地计算出有丝分裂细胞和其他阶段细胞在 DNA 指数上的差异,并有效地分割提取出有丝分裂细胞,有望辅助诊断癌症。因此,在合理的波段选择下,较少的波段就能体现出某些组织的光谱差异,故多光谱显微图像可以用于辅助

组织病理学诊断。在实际应用中,反射光谱法不仅有无接触、无损、无侵入等优点,还可以根据应用场景不同更改光谱的组合。

戎念慈等^[16]构建了以 8 个 LED 为照明光源、1 个黑白 CCD 相机为成像单元的可见-近红外多光谱成像系统,研究了利用可见-近红外反射多光谱精确估计人体血液年龄的可行性,该系统为一种 LED 直接照明的图像采集系统。Zoueu 等^[17]基于三组可见-近红外 LED 光源组建了一种包括透射式、反射式、暗场三种成像模式的显微镜,每种成像模式的照明均由 13 个 LED 组成,利用该系统分析了健康红细胞和疟疾感染红细胞的组成成分,开拓了多光谱技术在早期无标记血液涂片诊断中的潜力。本研究自主设计了一种显微多光谱成像系统,以多个可见光 LED 灯为光源,基于光纤和透镜组与显微系统良好地耦合,并根据该原理搭建系统样机,以皮肤病变组织和正常组织的病理切片测试了实际的成像效果和系统性能。

2 系统设计与原理

2.1 成像系统总体设计

窄带 LED 照明的多光谱显微成像系统由光源模块、耦合模块和成像模块组成。如图 1 所示,具体的工作流程为:操作计算机软件依次点亮光源,光源模块发出的光经光纤束传导至镜筒内,经耦合透镜组整形后形成平行光,然后经分光镜反射进入物镜后聚焦于样品,样品反射回的光经成像透镜聚焦于 CMOS 相机靶面,使用相机控制程序依次曝光采集光谱图像,形成光谱图像序列,同时获得图像和光谱信息,取图像序列任意像素点进行图像处理及光谱分析。原理样机如图 2 所示。

光谱显微系统的总体设计指标主要分为显微镜技术指标和光谱成像技术指标两方面。显微镜的技术指标主要包括系统的放大倍率、成像范围、空间分辨率;光谱成像的主要设计指标为系统的光谱范围和光谱分辨率^[18]。因本系统为一种使用 CMOS 成像的无限远光学系统,考虑到成像范围太小会影响观察,合理设计成像透镜的焦距以获得较大的成像范围,当成像范围达到 $500\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ 以上时,图像细节清晰视野的范围较大。放大率和成像范围与相机成像透镜的参数和相机的传感器的尺寸有关。其中系统的有效放大率可表示为

$$M_e = M_o \times \frac{f_t}{f_o}, \quad (1)$$

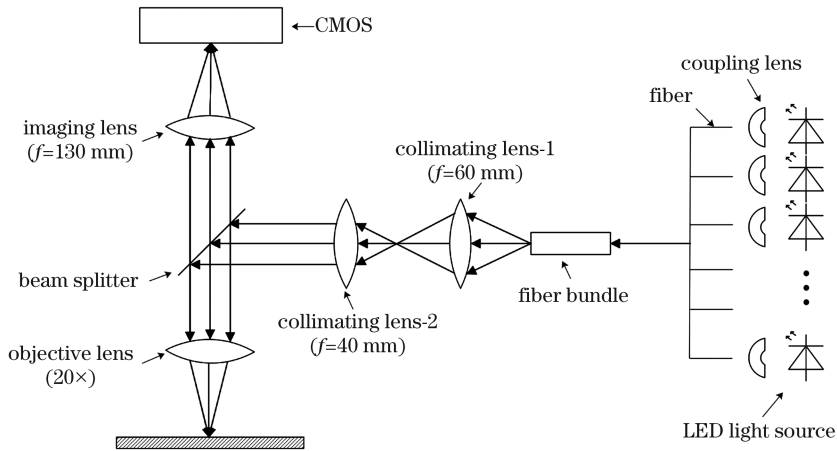


图 1 系统光路原理图

Fig. 1 Optical schematic diagram of the system

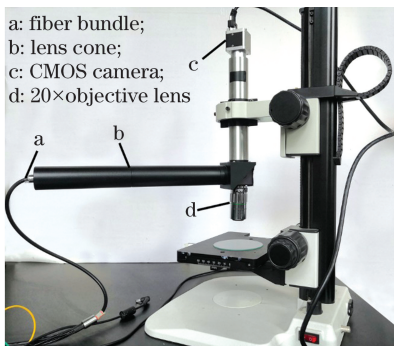


图 2 系统原理样机

Fig. 2 Picture of the experimental prototype

式中： M_e 为系统有效放大倍数， M_o 为物镜设计放大倍数， f_e 为实验中配合物镜的筒镜焦距， f_o 为无限远物镜设计的筒镜焦距。

本系统主要的应用场合为生物医学领域，而生物细胞的细胞核直径为 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ ，癌细胞核直径往往大一些，故系统的分辨能力至少要 $5 \mu\text{m}$ 以上才能用于样本结构的观察和光谱的准确提取。光谱分辨率和光谱范围对于本系统来讲主要由 LED 的通道数决定，系统的成像波段在可见光范围内，当光谱通道数大于 10 时，光谱分辨率优于 30 nm ，可以满足多光谱成像的要求。

2.2 多光谱光源模块设计

多光谱光源模块是光谱成像系统的重要组成部分，本文设计的光源模块兼具了照明和分光两种功能。若要对显微系统实现分光，实现的方法主要包括两种，一种是前分光光学系统，另一种是后分光光学系统^[19]。前分光光学系统是在显微镜的照明光源上进行分光，采用可调谐光源或采用单色仪及滤光片轮获得单波长的光，采集一系列光谱维度的灰

度图像，堆叠所采集的图像组成光谱图像序列。这种改变光源的分光方式不需要在成像光路中增加额外的光学器件，且所使用的器件成本不高，无须专门进行适配调试，避免了额外的光学像差，但是需要改变显微镜的原有光源。后分光光学系统则是在显微镜的成像光路中增加分光器件，例如液晶可调谐滤光器、声光可调谐滤光器、光栅分光等。这种分光方法的光谱分辨率较高，非常适合高光谱成像的应用，但是这类器件成本较高，控制度较复杂，牺牲了一定的系统光学性能，如液晶可调谐滤光器限制了通光孔径、视场角等参数，且需要和显微镜光路进行适配^[20]。

本系统所采用的光源为 13 个窄带宽 3 W LED 光源，波长范围为 $420 \sim 680 \text{ nm}$ ，放置于散热良好的铜制密闭盒中，由上位机依次控制点亮。这样的光源组合兼具了光源和分光系统的功能，只需要依次点亮灯珠便可以获得可调谐光波输出，照亮样品便可以获得单波长光谱图像。LED 光源的光谱分布曲线由 BWSPEC 公司的光谱仪测定，光源的光谱分辨率约为 20 nm ，半峰全宽约为 15 nm ，获得的光谱图像覆盖了可见光波段，光源发射光谱如图 3 所示。

2.3 耦合模块设计

本系统设计的耦合模块中光源经光纤传输进入显微系统。为实现均匀的照明，保障成像质量，耦合模块的设计需要考虑到光源的分布、均匀性、耦合的效率等。因为 LED 发出的光发散角较大，达到了 120° 左右，且传输过程中光能的损失不可避免，故设计了光纤与 LED 耦合和照明模块与显微成像模块耦合的耦合系统。

光纤与 LED 耦合使用光纤适配器和聚焦透镜

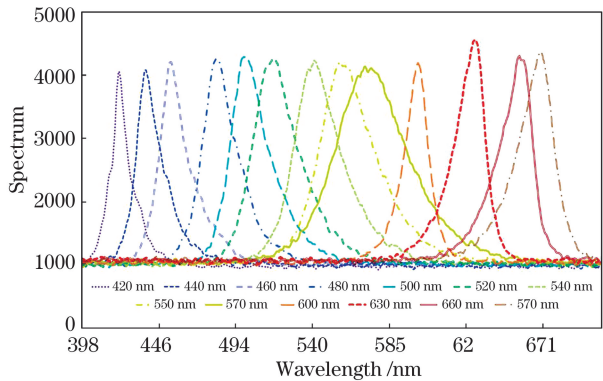


图 3 LED 发射光谱

Fig. 3 LED emission spectrum

实现。首先要把 LED 的发光角度限制在光纤的数值孔径角之内,以保证最大化利用光能。安装耦合透镜于 LED 的发光端面,以减小发散角。因光纤的数值孔径约为 0.25,数值孔径角约为 14.5° ,选用聚焦透镜把光源发散角减小到 15° 以内,这时光纤的数值孔径角和光源发散角基本相等,可以保证 90% 以上的光进入光纤。实现的具体步骤是将 13

个 LED 光源发出的光分别用 13 根光纤导入镜筒内,每根光纤用光纤适配器安装固定在铜制金属盒上,并与每个灯珠一一对应,后将多根光纤制成光纤束,直径约为 6 mm。

照明模块与显微系统的耦合使用耦合透镜组来实现。使用 ZEMAX 软件设计了耦合透镜组,如图 4 所示,由焦距 60 mm 和焦距 40 mm 的双胶合透镜组成。双胶合透镜用于消除不同波长光引起的色差。把光纤束视为点光源,当光纤束位于第一片耦合镜的两倍焦距以外时,所成的像位于一倍焦距和两倍焦距之间,让像的位置处于第二片耦合镜的焦点位置,出射光可以得到更小直径的平行光,可改善成像的效果。具体的参数设计如表 1 所示。

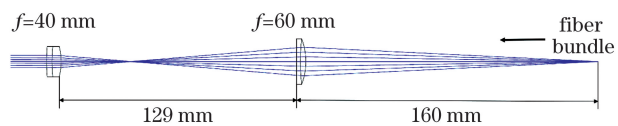


图 4 耦合设计

Fig. 4 Coupling design

表 1 耦合设计参数

Table 1 Coupling design parameters

Surface		Curvature /mm	Thickness /mm	Glass	Semi-diameter /mm
OBJ	Standard	infinity	160	—	—
1	Standard	32.33	3	SK11	12
2	Standard	-105	2	SF19	12
3	Standard	infinity	129	—	12
4	Standard	30	5	—	8
5	Standard	-80	3	SK11	8
6	Standard	-90	97.47	SF19	8
IMA	Standard	infinity	—	—	5

2.4 成像模块设计

成像模块由分光镜、物镜、成像透镜和 CMOS 相机组成,是一种从上方照明的显微系统,根据无限远光学系统原理设计所得。在无限远光学系统中,成像样品反射的光经过物镜后并不直接由物镜成像,而是作为平行光束进入成像透镜,由成像透镜形成中间像。无限远光学系统的特点是物镜到成像透镜之间传输的光束是平行光束,相比普通光学系统具有以下明显的优点:拉长或缩短物镜与成像透镜的距离时,成像的倍率不发生改变^[21]。成像部分使用的物镜是无限远超长工作距离平场复消色差物镜(北京派迪威仪器),参数为数值孔径 $NA=0.35$ 、放大倍率为 $20\times$ 、焦距 $f=200\text{ mm}$;成像透镜的焦距为 130 mm;图像传感器(微视,RS-A1300-GM60)为黑白

CMOS 相机,其像素为 130 万,分辨率为 $1280\text{ pixel}\times 1024\text{ pixel}$,像元尺寸为 $5.3\text{ }\mu\text{m}\times 5.3\text{ }\mu\text{m}$ 。

3 实验结果与分析

3.1 系统性能测试

由于光谱成像系统的技术参数之间是相互影响和相互制约的,因此,其主要技术指标的确定和评价需要根据使用的器件来讨论。多光谱显微成像系统的系统性能测试包括总体设计指标中的光谱范围、光谱分辨率、空间分辨率、视场范围和系统放大倍数。

光谱范围为 $420\sim 680\text{ nm}$,光源发射光谱如图 3 所示,共有 13 个波段,带宽约为 20 nm,可以满足多光谱显微成像对光谱分辨率的要求。

视场范围和放大倍数与物镜的焦距、成像透镜的

焦距及 CMOS 的像元大小有关。使用标准显微镜测微尺标定系统测定视场范围和放大倍率。将显微镜测微尺置于平移台上,拍摄图像如图 5 所示。图中测微尺每格长度代表 $10\ \mu\text{m}$, CMOS 横向分辨率为 1280 pixel, 图中横向共长 $520\ \mu\text{m}$, 因此每一个像素代表 $0.4\ \mu\text{m}$ 。根据像元的大小, 可知相机的成像靶面横向长为 $6764\ \mu\text{m}$, 则像到相机的实际放大倍数为 13 倍, 与 (1) 式中计算得到的有效放大率相同, 此时的成像范围为 $520\ \mu\text{m} \times 416\ \mu\text{m}$, 均满足设计指标中的要求。

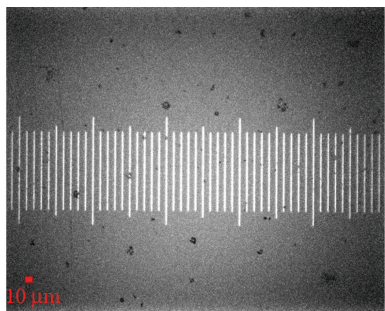


图 5 显微镜测微尺
Fig. 5 Microscope graticules

系统的空间分辨率主要由物镜的数值孔径和照明光的波长所限制, 采用 USAF1951 鉴别率板测试系统的空间分辨率, 实际测试结果如图 6 所示, 图中可以观察到系统可以分辨 (7-6) 组的线条, 此时的线间距离为 $2.2\ \mu\text{m}$, 可见系统的分辨率满足总体设计中对于细胞核观察所需的分辨率要求, 且此分辨率还未达到系统分辨率的极限。

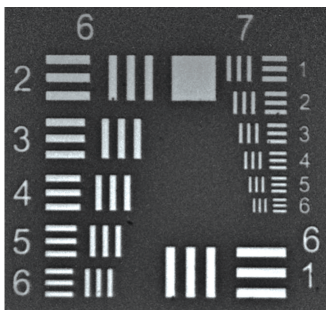


图 6 USAF1951 鉴别率板 (7-6 组, $228\ \text{lp/mm}$)

Fig. 6 USAF1951 resolution test target (group 7-6, $228\ \text{lp/mm}$)

3.2 实验结果分析

在对系统性能指标评价之后, 利用本多光谱显微成像系统采集了小鼠鳞状细胞癌病理切片光谱图像, 共采集 13 个波段的灰度图像。进行采集操作时仅需要将载玻片置于显微镜的平移台上, 切换光源, 分别采集图像并存储, 用相同波长光照样本的不同区域时需保证相机曝光时间相同, 采集样本图像

的环境为无外界环境光干扰的暗室。所采集的光谱图像均经过谱段间的暗电流和辐射校正, 首先采集无照明情况下相机的暗噪声, 切换光源, 采集载玻片无样本区域下的图像作为参考光强, 在相同光照条件下采集各个波长下被测样本图像作为样本光强。反射率校正原理为^[22]

$$R(\lambda) = \frac{I_{\text{raw}}(\lambda) - I_{\text{dark}}}{I_{\text{ref}}(\lambda) - I_{\text{dark}}}, \quad (2)$$

式中: $I_{\text{raw}}(\lambda)$ 代表样本图像光强, I_{dark} 代表相机暗噪声, $I_{\text{ref}}(\lambda)$ 代表参考图像光强。

小鼠的病理样本来自于上海市皮肤病医院, 所选小鼠为紫外光照射 20 周的 SKH-1 无毛小鼠, 皮肤表层已经发生原位癌, 处于皮肤鳞状细胞癌的早期。切片制作方法为表皮层至真皮层的纵切切片, 染色方法是常规 H-E 染色, 切片病理图像经过病理医生明确指出表皮层的病变区域, 根据划分的区域采集光谱图像。如图 7 所示分别为小鼠组织切片的表皮层癌变区域的四幅单波段图像, 如图 8 所示分

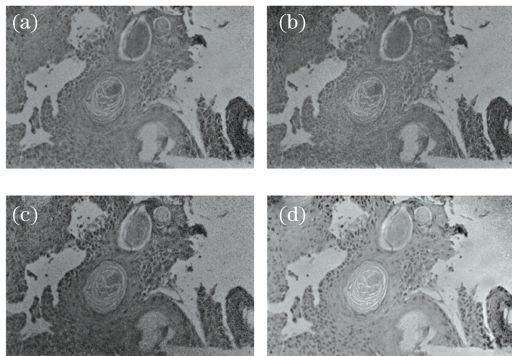


图 7 癌组织单波段图像。(a) $480\ \text{nm}$; (b) $520\ \text{nm}$; (c) $600\ \text{nm}$; (d) $660\ \text{nm}$

Fig. 7 Single-band images of cancer tissue. (a) $480\ \text{nm}$; (b) $520\ \text{nm}$; (c) $600\ \text{nm}$; (d) $660\ \text{nm}$

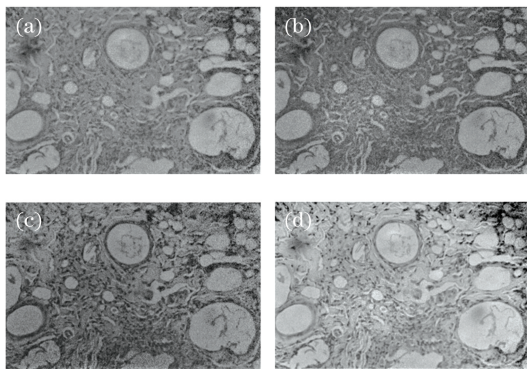


图 8 正常组织单波段图像。(a) $480\ \text{nm}$; (b) $520\ \text{nm}$; (c) $600\ \text{nm}$; (d) $660\ \text{nm}$

Fig. 8 Single-band images of normal tissue. (a) $480\ \text{nm}$; (b) $520\ \text{nm}$; (c) $600\ \text{nm}$; (d) $660\ \text{nm}$

别为小鼠组织切片的真皮层正常组织区域的四幅单波段图像,所选波段分别为 480, 520, 600, 660 nm。可以看出不同波段下的灰度图像可以突出不同的特征,其中 660 nm 的图像中细胞核最为明显,480 nm 和 520 nm 波段的图像主要突出了切片上皮肤组织结构,而 600 nm 波段的图像中组织结构和细胞核都可以观察到,同时,四种波段都可以观察到鳞状细胞癌巢区域的角化珠。

如图 9 和图 10 所示分别是癌变组织和正常组织单波段灰度图合成的假彩色图像和细胞核的反射率光谱。合成的假彩色图像质量良好,适合临床观察视诊使用,从中可以清楚地观察到两种图像中的组织结构和细胞的差异。分别提取癌变组织和正常组织的多光谱图像中 20 个细胞核的反射率,然后对

光谱曲线作平均处理。从光谱曲线中可以看出,正常细胞核的反射率在所测波段范围内与癌细胞核有较大的差别。对于两种细胞核间的光谱差异,使用两种样本光谱之间各个波段的欧氏距离总和来定量描述,表达式为^[13]

$$d = \sum_{k=1}^n \sqrt{(R_{1k} - R_{2k})^2}, \quad (3)$$

其中 n 为波段数量, R_{1k} 和 R_{2k} 分别为随机选取细胞核的反射率, k 为不同波段。表 2 列出了随机选取的 10 组正常细胞核和癌细胞核光谱的计算结果,其中 d_{nn} 为随机正常细胞核光谱差异, d_{cc} 为随机癌细胞核光谱差异, d_{nc} 为随机癌细胞核和正常细胞核的光谱差异。结果表明,同类细胞核间的光谱差异不大,正常细胞核和癌细胞核的光谱差别较大。

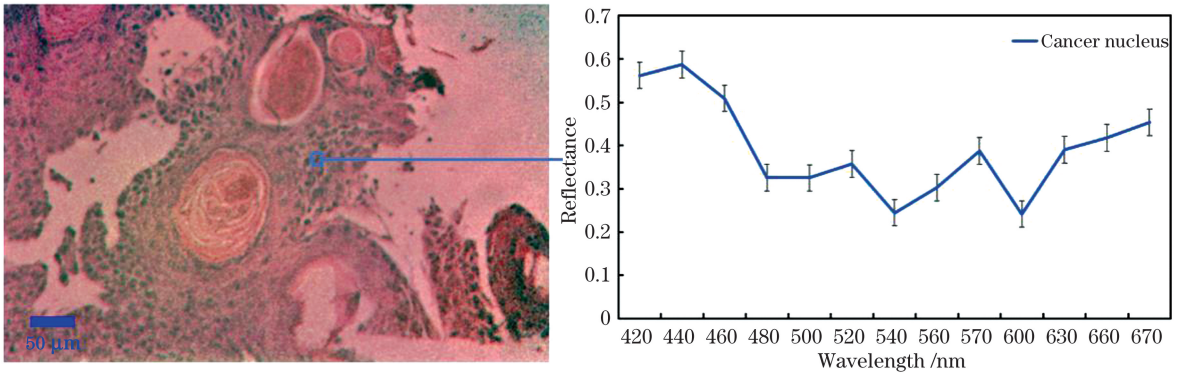


图 9 癌组织假彩色图像与光谱曲线

Fig. 9 False color image and spectra of cancer tissue

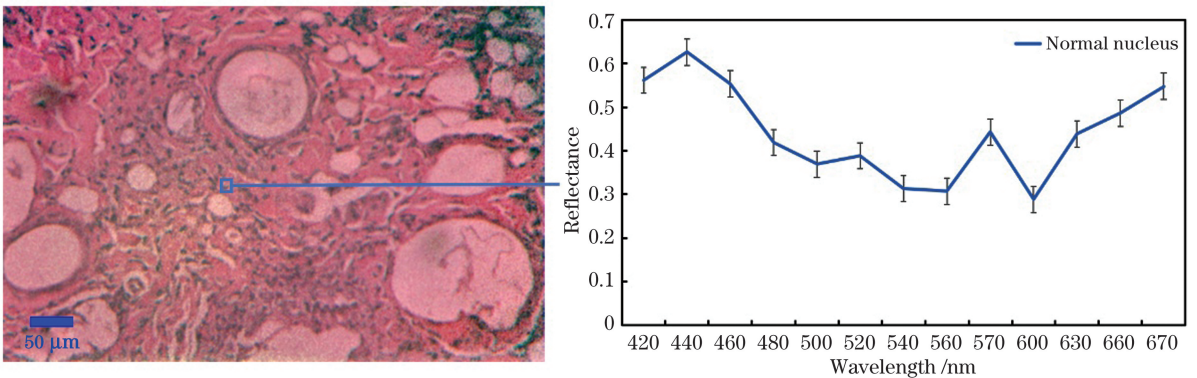


图 10 正常组织假彩色图像与光谱曲线

Fig. 10 False color image and spectra of normal tissue

表 2 样本光谱差异

Table 2 Sample spectral difference

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average
d_{nn}	0.31	0.35	0.39	0.38	0.43	0.33	0.35	0.32	0.27	0.53	0.37
d_{cc}	0.22	0.38	0.25	0.36	0.4	0.35	0.28	0.42	0.31	0.35	0.33
d_{nc}	1.24	1.02	1.31	0.96	0.99	0.94	1.47	1.19	1.15	1.11	1.14

这些图像和光谱上的差异主要由如下原因导致。从光谱图像上来看,癌细胞核的大小显著增大,但各癌细胞核的增大程度不一致,这都是由癌细胞变异及分裂失控导致的。癌细胞的细胞核较正常细胞核染色更深,这种染色中的差异主要是因为生物组织的 PH 值不同所致,但是有时这种染色的差异极其细微难以发现。光谱上的差异由癌细胞成分的变化所致。癌细胞染色质的增多,颗粒变粗,核质比失常,且正常组织和癌变组织的 PH 值也有明显的差别,肿瘤组织比正常组织具有更强的酸性。同时,由于染色质的增殖,癌细胞核的 PH 值也与正常细胞核不同。这种显著的 PH 值差异是导致反射光谱差异的主要原因。在早期癌症中,癌细胞核结构上的差异与正常细胞核并不明显,H-E 染色效果差异也十分细微,且细胞的 PH 值很难直接测量获得,但是这些差别都可以从光谱上体现。

4 结束语

结合光谱成像技术和显微成像技术,研制了一种窄带 LED 照明的多光谱显微成像系统,系统的所有部分皆根据独立的模块设计,整体体积小、稳定性好、造价低。测试了系统的性能指标,获得了实验结果。光源和分光模块采用新型的结合 LED 光纤的前分光光学系统,相比其他分光方法更容易实现,对成像的影响更小。设计的耦合系统也能更好地将光源模块与显微成像系统耦合,实现更均匀的照明。成像模块是一种无限远光学系统,在实际应用中能够获得更好的成像效果。结果表明,该系统在可见光波段内可以获得质量良好的光谱图像,相比高光谱图像数据,获得数据的复杂度低,处理便捷,成本大大降低。从图像数据中提取不同波长下的单波段图像和反射光谱数据,分析了不同细胞细胞核间的光谱差异,为病理学早期癌症诊断提供了一种新的辅助手段和参考依据。

本文验证了所建系统在皮肤鳞状细胞癌病理学应用的可行性。在未来的研究中,系统的光纤耦合结构需要继续优化,设计更大数值孔径的光纤耦合结构或设计新的 LED 与光纤间的耦合结构,可以提高能量的利用率,减小使用的 LED 功率,降低光源部分的发热量。尝试使用本系统从图像和光谱两方面实现更多不同病理切片的疾病诊断,得到不同病变组织在可见光范围内的固有光谱特性。另一方面,根据分析不同组织的光谱得出组分上的差异,在未染色的冰冻切片上划分出病变区域,实现“数字化

染色”的效果,可以省去病理染色繁杂的程序,节省大量的时间,提升临床诊断的效率,减少人力物力。

参 考 文 献

- [1] Polschikova O V, Machikhin A S, Ramazanova A G, et al. An acousto-optic hyperspectral unit for histological study of microscopic objects[J]. *Optics and Spectroscopy*, 2018, 125(6): 1074-1080.
- [2] Levenson R M, Fornari A, Loda M. Multispectral imaging and pathology: seeing and doing more[J]. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 2008, 2(9): 1067-1081.
- [3] Luo B, Zhang L. Robust autodial morphological profiles for the classification of high-resolution satellite images[J]. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 2014, 52(2): 1451-1462.
- [4] Yuan Q Q, Zhang Q, Li J, et al. Hyperspectral image denoising employing a spatial-spectral deep residual convolutional neural network [J]. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 2019, 57(2): 1205-1218.
- [5] Samuel S, Martin H, Himar F, et al. Hyperspectral and multispectral imaging in digital and computational pathology: a systematic review [Invited][J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(6): 3195-3233.
- [6] Li B, Beveridge P, O' Hare W T, et al. The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis[J]. *Forensic Science International*, 2011, 212(1/2/3): 198-204.
- [7] Yang Y R, Bu Y, Xu J H, et al. Measurement of surface defects of optical elements based on spectral estimation and multispectral technique [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(9): 0904002.
杨言若, 步扬, 徐静浩, 等. 基于光谱估计与多光谱技术的光学元件表面疵病检测[J]. *中国激光*, 2019, 46(9): 0904002.
- [8] Baek I, Cho B K, Gadsden S A, et al. A novel hyperspectral line-scan imaging method for whole surfaces of round shaped agricultural products [J]. *Biosystems Engineering*, 2019, 188: 57-66.
- [9] Mansfield J R. Multispectral imaging: a review of its technical aspects and applications in anatomic pathology[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(1): 185-210.
- [10] Liu L X, Li M Z, Zhao Z G, et al. Recent advances of hyperspectral imaging application in biomedicine [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2):

0207017.
刘立新, 李梦珠, 赵志刚, 等. 高光谱成像技术在生物医学中的应用进展[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207017.
- [11] Hu B L, Du J, Zhang Z F, et al. Tumor tissue classification based on micro-hyperspectral technology and deep learning [J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(12): 6370-6389.
- [12] Wang Q, Li Q L, Zhou M, et al. Melanoma and melanocyte identification from hyperspectral pathology images using object-based multiscale analysis[J]. Applied Spectroscopy, 2018, 72(10): 1538-1547.
- [13] Zhu S Q, Su K, Liu Y M, et al. Identification of cancerous gastric cells based on common features extracted from hyperspectral microscopic images[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(4): 1135-1145.
- [14] Liao C S, Zeng L B, Wu Q S. Research of a microscopic spectral imaging system with multi-band illuminants[J]. Acta Photonica Sinica, 2017, 46(11): 1130001.
廖乘胜, 曾立波, 吴琼水. 一种多波段光源的显微多光谱成像系统研究[J]. 光子学报, 2017, 46(11): 1130001.
- [15] Lu C, Mandal M. Toward automatic mitotic cell detection and segmentation in multispectral histopathological images [J]. IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics, 2014, 18(2): 594-605.
- [16] Rong N C, Huang M Z. Age estimation of bloodstains based on visible-near infrared multi-spectrum combined ensembling model [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(1): 168-173.
戎念慈, 黄梅珍. 可见-近红外多光谱和多种算法模型融合的血迹年龄预测[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(1): 168-173.
- [17] Zoueu J T, Zan S G T. Trophozoite stage infected erythrocyte contents analysis by use of spectral imaging LED microscope[J]. Journal of Microscopy, 2012, 245(1): 90-99.
- [18] Xiao G H, Shu R, Xue Y Q. Design of microscopic hyperspectral imaging system [J]. Optics and Precision Engineering, 2004, 12(4): 367-372.
肖功海, 舒嵘, 薛永祺. 显微高光谱成像系统的设计[J]. 光学精密工程, 2004, 12(4): 367-372.
- [19] Qi M J, Wang X Q, Yu C R, et al. Development of static microscopic spectral imaging system [J]. Optics and Precision Engineering, 2015, 23(5): 1240-1245.
齐敏珺, 王新全, 于翠荣, 等. 静态显微光谱成像系统的研制[J]. 光学精密工程, 2015, 23(5): 1240-1245.
- [20] Xie Z T, Yu G Y. Optimization design method for high performance tunable filter [J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(8): 0831001.
谢钟涛, 余桂英. 高性能可调谐滤波片的优化设计方法[J]. 光学学报, 2020, 40(8): 0831001.
- [21] Ryu J M, Oh J H, Jo J H. Unified analytic calculation method for zoom loci of zoom lens systems with a finite object distance[J]. Journal of the Optical Society of Korea, 2014, 18(2): 134-145.
- [22] Khelifi R, Adel M, Bourenane S. Segmentation of multispectral images based on band selection by including texture and mutual information [J]. Biomedical Signal Processing and Control, 2015, 20: 16-23.