

基于相似块去噪和经验模态分解的结构光照明显微镜重建算法

代臻棋, 毕秀丽, 范骏超*

重庆邮电大学图像认知重庆市重点实验室, 重庆 400065

摘要 结构光照明显微镜凭借其所需的激发光强度低、曝光时间短、光毒性小、无需特定的荧光探针等优点, 非常适合于活细胞的超分辨率成像; 然而, 如果结构光照明显微镜采集的原始图像的信噪比较低, 则原始图像中包含的高斯噪声和泊松噪声将导致超分辨率图像重建过程中出现参数估计准确率低、重建伪影多等问题。为了准确估计初始相位和调制深度参数并衡量估计准确率, 本文提出了经验模态分解算法和分散指数指标, 前者可准确估计初始相位和调制深度, 后者可实现估计准确率的客观评价。同时, 为了解决重建伪影的问题, 本文进一步提出了基于相似块的图像去噪算法, 该算法能够在保留原始图像中照明结构光特征的同时抑制图像中的噪声, 进而提升参数估计的准确性, 并减少重建图像中的伪影。

关键词 生物光学; 图像处理; 显微镜; 重建算法; 经验模态分解; 分散指数; 相似块去噪

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507206

1 引言

结构光照明超分辨显微术 (SIM)^[1-2] 在成像时不需要特定的荧光探针, 比随机单分子定位显微成像^[3-8]、受激辐射损耗荧光显微术^[9-12] 等所需的激光强度更低, 适合用于活细胞的超分辨率成像。SIM 显微镜在成像时采用的是余弦样式的照明光, 可以将荧光信号在截止频率外的超分辨率频率信息调制到截止频率以内, 并被物镜接收, 从而实现超分辨率信息的采集。但采集的这些原始图像并不是最终的超分辨率图像, 需要通过后续的重建算法进行参数估计、频谱提取和移动、维纳滤波等, 才能最终重建出约 85 nm 分辨率的超分辨率图像^[13-15]。

为了减小活细胞成像时的光毒性和光漂白, 通常需要降低激发光强度和缩短曝光时间。现阶段使用的激发光强度最低为 1 W/cm^2 , 曝光时间最短可至亚毫秒量级, 最终可以实现长达 1 h 的长时程超分辨率成像^[14]。然而, 在这种弱激发、短曝光条件下采集的原始图像中包含着较多噪声, 这会导致参数估计错误和雪花状重建伪影^[14, 16]。

为了提高参数估计的准确性, 研究人员提出了一些改进的参数估计算法^[17-20]。其中, 基于迭代和非迭代的参数估计方法利用各阶次频谱成分在相同频率点位置有相同频谱、不同频率点位置有不同频谱的先验信息, 在低信噪比条件下准确地估计出了照明光波矢量等参

数^[17-18]; 预滤波参数估计方法先滤除原始图像中的低频部分再进行参数估计, 能够避免低频信号对参数估计的影响, 提高了参数估计的准确性^[19]。然而, 上述这些方法仅能提高参数估计的准确性, 无法同步给出参数估计的准确率, 甚至在估计的参数出现较大偏差时, 这些算法也无法提示, 仅能通过最终重建结果中出现参数错误导致的伪影才能判断参数估计是否准确。这对使用 SIM 显微镜的研究者辨识伪影的能力提出了更高要求。

为了抑制重建图像中的重建伪影, 研究人员提出了一些改进的重建算法^[14, 19, 21-24]。其中, 基于总变分 (TV) 正则或者 Hessian 正则的去伪影方法利用了信号的连续性先验信息, 能够较好地抑制重建超分辨率图像中的伪影^[14, 19]。最近提出的基于频谱滤波的重建算法先估计原始图像的噪声水平, 然后根据噪声水平调节重建时的滤波参数和调制深度, 能够重建出对比度较高的超分辨率图像^[22]。上述 SIM 显微镜去伪影算法在流程上都是先对 SIM 原始图像进行超分辨率重建, 然后再对超分辨率图像去伪影; 然而, 前置的超分辨率重建过程会改变图像中的噪声分布, 所以对超分辨重建图像进行去伪影时, 就不能按照传统的泊松-高斯噪声模型对图像中的噪声进行处理。

针对上述两个问题, 本团队从结构光照明超分辨显微镜的重建原理出发, 提出了基于经验模态分解 (EMD)^[25] 的参数估计方法, 该方法可在准确估计初

收稿日期: 2022-04-21; 修回日期: 2022-05-23; 录用日期: 2022-06-01

基金项目: 国家自然科学基金 (62103071)

通信作者: *fanjc@cqupt.edu.cn

始相位和调制深度的同时,实现估计准确率的客观评价。另外,本团队在对原始图像进行超分辨率重建之前引入了基于相似块的去噪算法^[26-27],这样做能够在保留 SIM 原始图像中余弦结构光特征的同时抑制噪声,进而提升估计参数的准确性和重建图像的保真度。这种对原始图像先去噪再超分辨率重建的流程主要有两个优点:1)基于原始图像的去噪算法可以严格按照成像过程的噪声模型进行构建;2)对原始图像先进行去噪可以增强参数估计的准确性,进一步增强重建超分辨率图像的保真度。本文的主要创新点总结如下:

1)使用 EMD 对估计的初始相位和调制深度的频次分布进行平稳化处理,以准确估计照明光的初始相位和调制深度;

2)提出了分散指数并将其作为量化指标,该指标可以客观地衡量估计初始相位和调制深度的准确率;

3)使用基于方差平稳(VST)变换^[28-29]和 VBM3D^[26-27]的去噪算法抑制原始图像中的噪声,提升重建算法估计参数的准确性和重建超分辨率图像的保真度。

2 基本原理

2.1 EMD 参数估计方法

SIM 显微镜的相机采集的原始图像 $D_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 可以表示为

$$D_{d,\varphi}(\mathbf{r}) = [g(\mathbf{r}) \cdot I_{d,\varphi}(\mathbf{r})] \otimes h(\mathbf{r}), \quad (1)$$

其中,

$$I_{d,\varphi}(\mathbf{r}) = [1 + c_d \cdot \cos(2\pi \mathbf{p}_d \cdot \mathbf{r} + \varphi_d)], \quad (2)$$

式中: \mathbf{r} 为空间坐标; $g(\mathbf{r})$ 为被激发的荧光基团的空间分布; $h(\mathbf{r})$ 为成像系统的点扩散函数; $I_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 是一个具有方向为 d 和相位为 φ 的余弦函数结构的照明光的强度; c_d 为结构光的调制深度; \mathbf{p}_d 为照明光的波矢; φ_d 为照明光的初始相位。原始图像 $D_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 的频域 $D_{d,\varphi}(\mathbf{k})$ 可以表示为

$$D_{d,\varphi}(\mathbf{k}) = [g(\mathbf{k}) \otimes I_{d,\varphi}(\mathbf{k})] \cdot H(\mathbf{k}), \quad (3)$$

式中: $g(\mathbf{k})$ 为荧光信号 $g(\mathbf{r})$ 的傅里叶频谱; $H(\mathbf{k})$ 为点扩散函数 $h(\mathbf{r})$ 的傅里叶变换; $I_{d,\varphi}(\mathbf{k})$ 为余弦结构照明光强度 $I_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 的傅里叶变换。将式(2)中的 $I_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 的傅里叶变换[即 $I_{d,\varphi}(\mathbf{k})$]代入式(3),可得原始图像 $D_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 的频谱 $D_{d,\varphi}(\mathbf{k})$ 为

$$D_{d,\varphi}(\mathbf{k}) = \left[g(\mathbf{k}) + \frac{c_d}{2} g(\mathbf{k} - \mathbf{p}_d) \exp(-i\varphi_d) + \frac{c_d}{2} g(\mathbf{k} + \mathbf{p}_d) \exp(+i\varphi_d) \right] \cdot H(\mathbf{k}). \quad (4)$$

采集到 SIM 原始图像 $D_{d,\varphi}(\mathbf{r})$ 后,需要经过参数估计、频谱提取、频域移位和叠加、维纳反卷积等步骤,才能重建出最终的 SIM 超分辨率图像。在第一步的参数估计过程中,需要估计照明光波矢 \mathbf{p}_d 、照明光初始相位 φ_d 和调制深度 c_d 这三个参数。通常引入相位差为 $2\pi/3$ 的三个照明光(三个照明光的相位分别为

$\varphi_d^{(1)}$ 、 $\varphi_d^{(2)}$ 和 $\varphi_d^{(3)}$) 进行三次照明,然后通过 $2\pi/3$ 的相位差,即 $\varphi_d^{(2)} - \varphi_d^{(1)} = 2\pi/3$ 和 $\varphi_d^{(3)} - \varphi_d^{(2)} = 2\pi/3$, 就可以提取出 $m(m=0, \pm 1)$ 阶频率成分 $C_m^{(k)}$, 即

$$\begin{bmatrix} C_0^{(k)} \\ C_{-1}^{(k)} \\ C_{+1}^{(k)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} g(\mathbf{k}) \cdot H(\mathbf{k}) \\ g(\mathbf{k} - \mathbf{p}_{d_1}) \cdot H(\mathbf{k}) \cdot \frac{c_{d_1}}{2} \exp[-i\varphi_{d_1}^{(1)}] \\ g(\mathbf{k} + \mathbf{p}_{d_1}) \cdot H(\mathbf{k}) \cdot \frac{c_{d_1}}{2} \exp[+i\varphi_{d_1}^{(1)}] \end{bmatrix}, \quad (5)$$

式中: $C_0^{(k)}$ 是截止频率内的 0 阶频谱; $C_{+1}^{(k)}$ 和 $C_{-1}^{(k)}$ 是包含了截止频率外高频信息的 ± 1 阶频谱。因为 $C_0^{(k)}$ 和 $C_{-1}^{(k)}$ (或 $C_0^{(k)}$ 和 $C_{+1}^{(k)}$) 所包含的频谱区域有重叠,如图 1(a)所示,因此,可以利用两者重叠频谱区域的相关性计算出照明光的波矢量估计值 \mathbf{p}'_{d_1} 。在计算出结构光波矢量的估计值 \mathbf{p}'_{d_1} 之后,比较 0 阶频谱 $C_0^{(k)}$ 和 -1 阶频谱 $C_{-1}^{(k+\mathbf{p}'_{d_1})}$, 二者在每个频率点 \mathbf{k} 处都只差一个 $c_{d_1} \exp[-i\varphi_{d_1}^{(1)}]/2$ 的倍数关系。通过统计 0 阶频谱 $C_0^{(k)}$ 和 -1 阶频谱 $C_{-1}^{(k+\mathbf{p}'_{d_1})}$ 在每个频率点的比值 $c_{d_1} \exp[-i\varphi_{d_1}^{(1)}]/2$, 即可估计出照明光的初始相位 $\varphi_{d_1}^{(1)}$ 和调制深度 c_{d_1} 。

理想情况下,对于每一个频率点的比值,照明光的相位和调制深度均为同一个 $\varphi_{d_1}^{(1)}$ 和 c_{d_1} , 所以相位和调制深度频次的统计分布类似于冲激函数的形状;而在实际数据中,由于噪声等因素的影响,其实际频次的分布是一条有局部抖动的平滑曲线。

以初始相位为例,在理想情况下其频次的统计分布如图 1(b)所示;而在实际数据中,其频次的统计分布如图 1(c)中实线所示,其最高点对应的横坐标即为估计的初始相位 $\varphi_{d_1}^{(1)}$ 。

有局部抖动的平滑曲线不利于初始相位的准确估计,因此,本文提出了一种基于 EMD 的初始相位估计方法,该方法能够实现频次的平稳化处理。EMD 方法的本质是在时间尺度上将复杂信号由高频到低频逐级分解成各个固有模态函数的分量。使用 EMD 算法将图 1(c)中的实线分解成各阶模态函数,然后仅保留 4 阶以下的模态分量并叠加,就可以将图 1(c)中实线所示的初始相位频次拟合合成图 1(c)中更为平滑的虚线。然后在 EMD 拟合的虚线中找到最高频次对应的相位,该相位即为估计的照明光的初始相位 $\varphi_{d_1}^{(1)}$ 。对于 d_2 和 d_3 方向,均可以按照上述流程计算对应的初始相位 $\varphi_{d_2}^{(1)}$ 和 $\varphi_{d_3}^{(1)}$ 。同理,调制深度的估计与上述步骤类似。

EMD 参数的估计流程如图 2 所示。

对于 EMD 拟合的曲线,根据其分布情况可以判断出参数估计的准确性。EMD 拟合曲线越接近尖锐的冲激函数,说明该参数的估计值越准确;拟合曲线越接近扁平的平滑曲线,说明该参数估计值的准确性相对越低。虽然可以通过 EMD 拟合曲线的形状直观地判断参

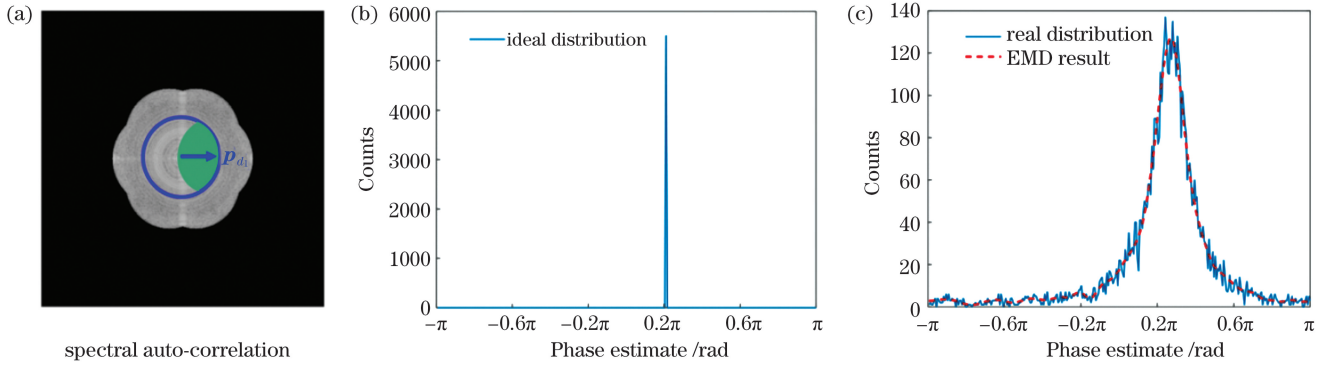


图 1 基于 EMD 的参数估计算法。(a) 频谱自相关; (b) 理想参数估计值的频次分布; (c) 实际参数估计值的频次分布及其 EMD 结果
 Fig. 1 Parameter estimation algorithm based on empirical mode decomposition (EMD). (a) Spectral auto-correlation; (b) frequency distribution of ideal parameter estimation; (c) frequency distribution of actual parameter estimation and its EMD result

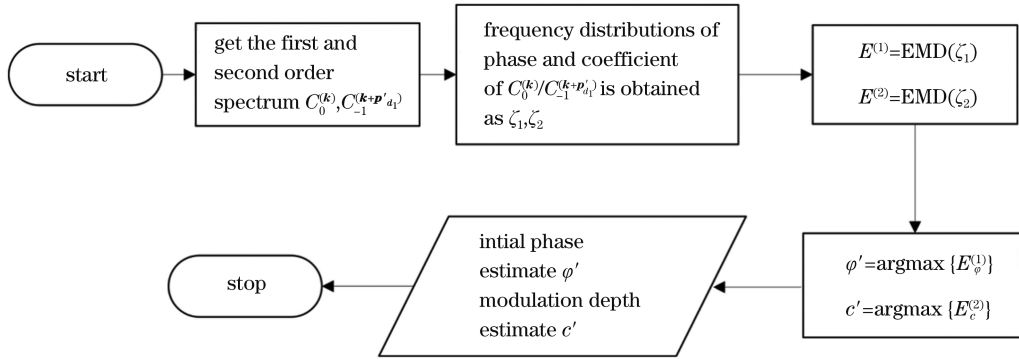


图 2 EMD 参数估计流程图
 Fig. 2 Flow chart of EMD parameter estimation

数估计的准确性,但为了进行客观的衡量,本团队提出了分散指数这一指标,用其判断参数估计的准确性。

2.2 分散指数的计算方法

在噪声的影响下,EMD 拟合的参数分布从冲激函数向有局部抖动的平滑曲线转变,且参数分布的分散程度与参数估计的准确性直接相关。参数估计越准确,相位和调制深度的分布越集中。为了客观地评价参数估计的准确性,本文提出了新的评价指标——分散指数。分散指数越小,说明重叠区域的初始相位和调制深度分布越集中,参数估计的准确性越高。根据经验,当分散指数取值小于 0.5 时,参数估计值的准确性较高。分散指数的计算流程如图 3 所示。

分散指数的计算过程主要从整体到局部刻画估计值频次分布对冲激函数的近似程度。整体刻画部分主要通过最大波动程度 s 实现。 s 的计算公式为

$$s = \tanh\left(\frac{\omega_{\max} - \omega_{\min}}{\omega_{\text{mean}}}\right), s \in [0, 1), \quad (6)$$

式中: ω_{\max} 、 ω_{\min} 和 ω_{mean} 分别为 EMD 波形序列归一化后的最大值、最小值和平均值。 s 刻画了 EMD 拟合曲线的最大波动程度,若 s 偏小,则 EMD 波形对冲激函数的近似程度必然很小,但 s 值较大时并不能说明 EMD 波形对冲激函数的近似程度就大,还需要对其进行局部刻画。

在局部刻画部分,对于相同波动程度(即 s 相等)的 EMD 拟合波形,需要进一步考虑低频次的参数值个数。低频次的参数值个数越多,EMD 波形就会与冲

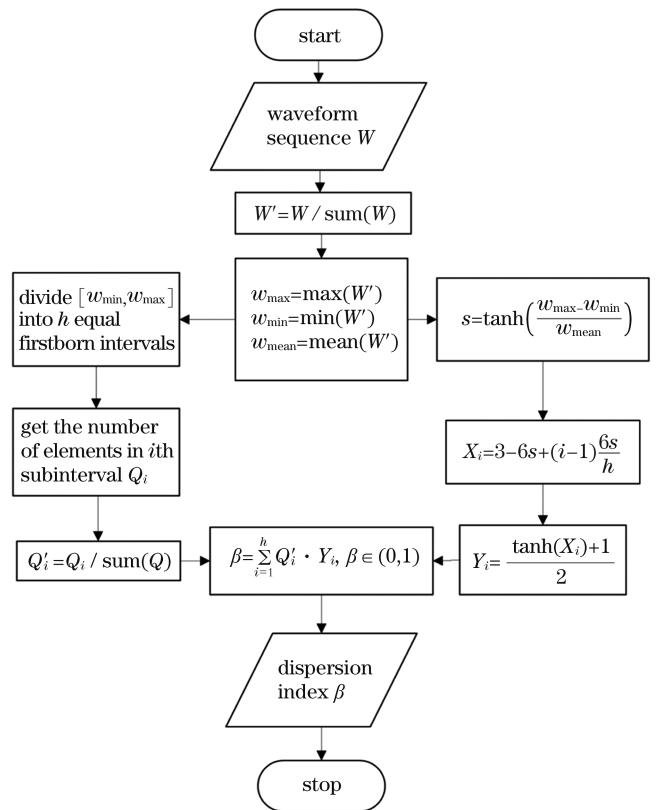


图 3 分散指数的计算流程图

激函数越近似。出于这种直观的认识,本团队使用分组惩罚的方式对 EMD 波形进行量化处理。如图 4(a)

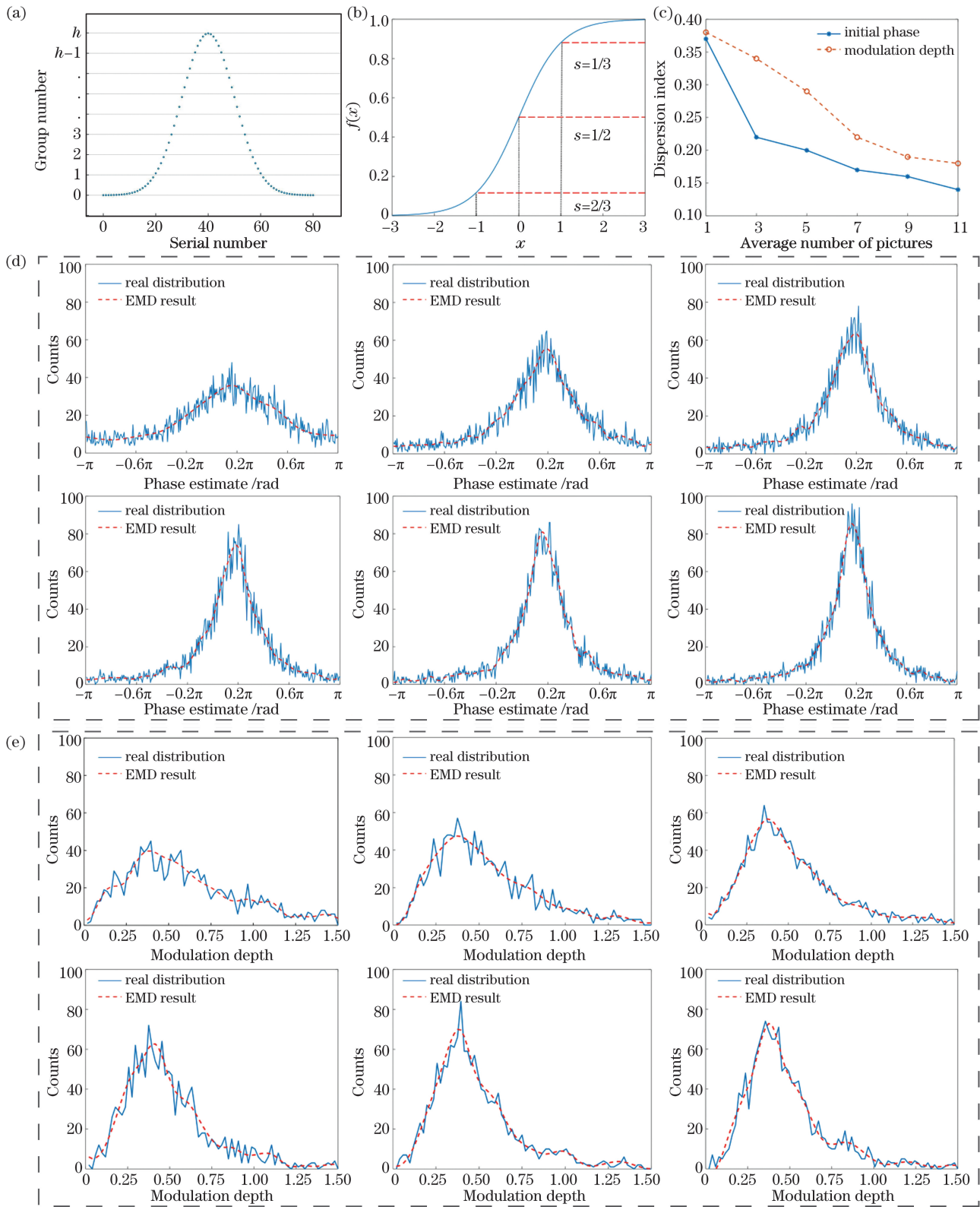


图 4 分散指数。(a)区间划分示意图;(b)权重分配函数及函数取值范围示意图;(c)图 4(d)~(e)中 EMD 波形的分散指数;(d)将同一样本多次激发,取前 1、3、5、7、9、11 个时间点的原始图像平均后分别估计的初始相位(从左至右,从上至下);(e)将同一样本多次激发,取前 1、3、5、7、9、11 个时间点的原始图像平均后分别估计的调制深度(从左至右,从上至下)

Fig. 4 Dispersion index. (a) Schematic of interval partition; (b) schematic of weight distribution function and value range of function; (c) dispersion index of EMD waveform of Fig. 4 (d) and Fig. 4 (e); (d) initial phase (from left to right and from top to bottom) estimated by averaging original images at the first 1, 3, 5, 7, 9, and 11 time points after exciting the same sample for many times; (e) modulation depth (from left to right and from top to bottom) estimated by averaging original images at the first 1, 3, 5, 7, 9, and 11 time points after exciting the same sample for many times

所示,首先将 EMD 波形按频次大小进行分组,然后为每组的统计概率进行权重分配。由于低频次的参数值个数越多,EMD 波形就会越集中,所以分配的惩罚权重应随着各组对应频次的增大而增大。此外,EMD 波形斜率的绝对值会随着频次的增加而先增大后减小。为了更好地凸显局部差异,权重分配的变化率也应当有类似的变化趋势,因此选取

$$f(x) = \frac{\tanh(x) + 1}{2}, x \in [3 - 6s, 3], \quad (7)$$

作为权重分配函数,其曲线如图 4(b) 所示。

将同一样本连续拍摄 20 组具有相同照明光的原始图像,取其前 1、3、5、7、9、11 组图像分别进行平均,得到 6 组信噪比逐渐增大的原始图像。可以发现,随着原始图像信噪比增大,EMD 拟合曲线[图 4(d)和图 4(e)中的虚线]越来越接近于冲激函数的形状,分散指数也逐渐降低[如图 4(c)所示]。因此,分散指数很好地表征了原始图像信噪比和参数估计准确性之间的对应关系。

2.3 VST-VBM3D 去噪算法

在 SIM 重建算法中,重建一帧超分辨率图像需要对同一样本用不同的余弦条纹光成像 9 次。9 次照明分别使用了三个不同方向(d_1 、 d_2 、 d_3)的照明光,照明光的波矢量为 \mathbf{p}_d ,每个方向包含三个不同的相位。为使描述简明易懂,本文将上述重建 1 张超分辨率图像所需的 9 张原始图像记为对同一样本的 1 组成像。

在 SIM 重建算法的实际应用中,通常会将对同一样本进行多个时间点的连续成像,以观察活细胞结构的

动态变化。因为曝光时间可以低至亚毫秒量级,所以对同一样本多次成像采集到的多组数据具有较强的相似性。本文根据这种相似性的先验信息,将基于块相似的去噪算法融入 SIM 重建算法中。

之前的 SIM 显微去噪和去伪影算法先对 SIM 原始图像进行超分辨率重建再进行去噪或去伪影,而本文提出的是对原始图像先去噪再进行超分辨率重建的流程。这种重建流程主要有三个优点:1)基于原始图像的去噪算法可以严格按照成像过程的噪声模型进行构建,而如果原始图像先经过超分辨率重建再进行去噪,其噪声分布会发生改变;2)对原始图像先进行去噪处理可以增强参数估计的准确性,从而进一步增强重建超分辨率图像的保真度;3)重建前先去噪可以与重建后进行后处理去伪影的算法相结合,实现更好的伪影抑制效果。

本文采用相似块去噪算法对 SIM 原始图像进行去噪。算法的输入是对同一样本连续拍摄的 n 组原始图像。为了满足相似块的先验条件,本文取 $n \leq 3$ 。首先,将具有相同方向和相位的 n 组原始图像进行平均,得到 1 组平均图像,即

$$A_{x,y}^{(d,\varphi)} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n G_{j,x,y}^{(d,\varphi)}, \quad (8)$$

式中: $G_{j,x,y}^{(d,\varphi)}$ 为第 j 组方向为 d 、相位为 φ 的原始图像; n 为原始图像的组数; $A_{x,y}^{(d,\varphi)}$ 为按照方向 d 和相位 φ 平均后的图像; x 和 y 为像素的横纵坐标。然后,将平均图像 A 与原始图像组合进行后续的综合去噪。整体流程如图 5 所示。

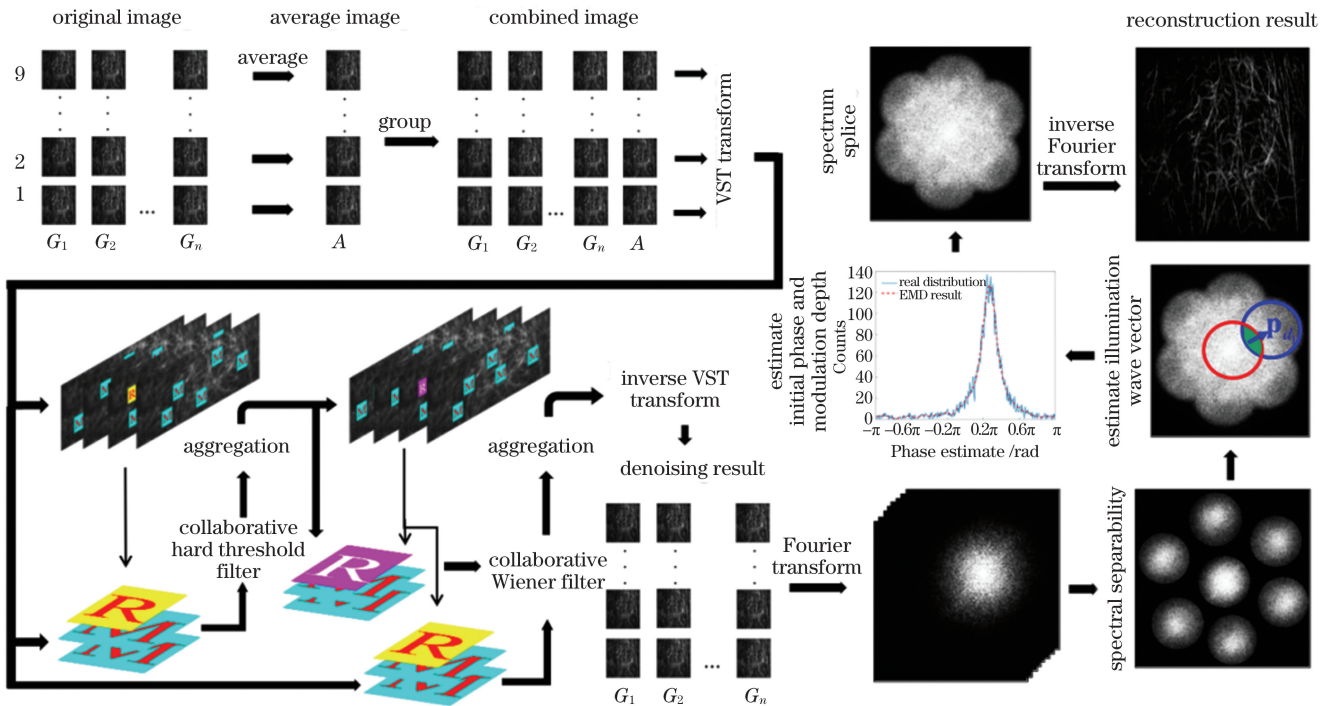


图 5 VST-VBM3D 去噪算法流程图

Fig. 5 Flow chart of VST-VBM3D denoising algorithm

平均图像与原始图像组合之后,对每一帧图像进行 VST 变换,变换公式为

$$\text{VST}(z) = \frac{2}{\alpha} \sqrt{\alpha z + \frac{3}{8} a^2 + \sigma^2 - at}, \quad (9)$$

式中: z 为输入图像; α 为增益; σ 为高斯噪声的标准差; t 为高斯噪声的均值。拍摄的图像主要含有高斯噪声和泊松噪声。基于相似块的 VBM3D 只能抑制高斯噪声, 所以需要使用 VST 变换将图像中的泊松噪声转化为高斯白噪声, 以便于后续使用 VBM3D 算法去噪。

VST 变换之后, 采用 VBM3D 去噪算法对原始图像进行去噪处理。VBM3D 可以充分利用多组原始图像在帧内和帧间的相似块进行协同滤波, 在去噪的同时可以很好地保留图像的原有余弦特征, 从而保证重建图像的保真度。

VBM3D 主要分为基础估计和最终估计两部分。基础估计主要利用协同硬阈值滤波实现部分噪声的去除, 然后将滤波结果作为最终估计的参考。协同硬阈值滤波可表示为

$$\vartheta = \Gamma_{3D}^{-1} \{ \gamma [\Gamma_{3D}(\vartheta_0)] \}, \quad (10)$$

其中,

$$\gamma(\lambda) = \begin{cases} \lambda, & |\lambda| > \lambda_{thr} \\ 0, & |\lambda| \leq \lambda_{thr} \end{cases}, \quad (11)$$

式中: ϑ_0 为协同硬阈值滤波输入的三维相似块图像; ϑ 为协同硬阈值滤波输出结果; Γ_{3D} 和 Γ_{3D}^{-1} 分别为三维变换运算符和逆三维变换运算符; γ 为硬阈值滤波算子; λ 为三维变换后的系数; λ_{thr} 为设置的系数阈值。协同硬阈值滤波作为 VBM3D 的基础估计方法, 能够在变换域中去除一定的噪声, 为 VBM3D 最终估计中的维纳滤波提供信噪比更高的参考图像, 从而进一步提升 VBM3D 抑制噪声的效果。在本文中, 上述 VBM3D 去噪算法中的参数均使用论文[26-27]中的默认参数, 仅原始图像噪声标准差这一项参数是根据原始图像信噪比手动调节的。

得到 VBM3D 的去噪结果之后, 使用逆 VST 变换 (IVST) 将去噪结果转换到原始空间, 即

$$D' := IVST(D) = \frac{1}{4}D^2 + \frac{1}{4}\sqrt{\frac{3}{2}}D^{-1} - \frac{11}{8}D^{-2} + \frac{5}{8}\sqrt{\frac{3}{2}}D^{-3} - \frac{1}{8}, \quad (12)$$

式中: D 为逆 VST 变换的输入图像; D' 为逆 VST 变换后的去噪结果^[29]。

将 D' 中包含的去噪后的原始图像提取出来, 再将其作为 SIM 重建算法的输入进行后续的超分辨率重建 (如图 5 所示)。

3 实验结果及分析

为了验证 VST-VBM3D 去噪算法在提升参数估计准确性和重建图像保真度方面的有效性, 本节在客观指标和主观效果两个方面进行分析。在参数估计准确性方面, 本文采用 2.2 节提出的分散指数进行评估; 在重建图像保真度方面, 本文采用峰值信噪比 (PSNR, 记为 r_{PSNR}) 和结构相似性指标 (SSIM, 记为

I_{SSIM}) 进行评估。其中, PSNR 的计算公式为

$$r_{PSNR} = 10 \lg \left(\frac{\eta_{max}^2}{e_{MSE}} \right), \quad (13)$$

式中: η_{max} 表示图像灰度的最大数值; e_{MSE} 是重建图像与真值图像之间的均方误差。SSIM 计算公式为

$$I_{SSIM} = \frac{(2\mu_{v_i}\mu_{u_i} + C_1)(2\delta_{v_i u_i} + C_2)}{(\mu_{v_i}^2 + \mu_{u_i}^2 + C_1)(\delta_{v_i}^2 + \delta_{u_i}^2 + C_2)}, \quad (14)$$

式中: u 为真值图像; v 为重建图像; μ_{v_i} 和 μ_{u_i} 分别为 v 和 u 在第 i 个局部图像窗口 v_i 和 u_i 的均值; δ_{v_i} 和 δ_{u_i} 是局部窗口下的方差; $\delta_{v_i u_i}$ 为 v_i 和 u_i 的协方差; C_1 设定为 $(0.01 \times L)^2$, L 为归一化后图像灰度的最大值 255; C_2 设定为 $(0.03 \times L)^2$ 。SSIM 数值越大意味着重建图像与真值图像越相似。

3.1 参数估计对比

为了进行验证实验, 本团队首先对细胞骨架肌动蛋白微丝样本连续拍摄 20 组具有相同照明光的原始图像, 每组有 9 张原始图像, 包含 3 个方向, 每个方向包含 3 个相位, 共采集了 180 张原始图像, 总的采集时间为 486 ms。取其中的 1 组作为本小节的实验数据, 如图 6(a) 所示。

对比原始图像去噪前 (图 6 中虚线) 后 (图 6 中实线) 在三个不同方向上估计的初始相位和调制深度可以发现, 去噪前的 EMD 拟合曲线更平缓, 而去噪后的 EMD 拟合曲线更陡峭。这表明去噪后的原始图像估计的初始相位和调制深度更集中, 受噪声的影响也更小。比较表 1 和表 2 所示的去噪前后图像在参数估计过程中的分散指数指标可以发现, 初始相位的分散指数在 d_1 、 d_2 、 d_3 三个方向上分别降低了 0.06、0.06 和 0.17, 调制深度的分散指数在 d_1 、 d_2 、 d_3 三个方向上分别降低了 0.07、0.11 和 0.08。综上, 主观结果和客观指标都说明了本文提出的针对原始图像的去噪算法能够使 SIM 重建流程中的参数估计更准确。

表 1 初始相位 EMD 波形的分散指数对比

Table 1 Comparison of dispersion index of initial phase EMD waveform

Direction	Dispersion index	
	Without denoising	After denoising
d_1	0.41	0.35
d_2	0.38	0.32
d_3	0.40	0.23

表 2 调制深度 EMD 波形的分散指数对比

Table 2 Comparison of dispersion index of modulation depth EMD waveform

Direction	Dispersion index	
	Without denoising	After denoising
d_1	0.43	0.36
d_2	0.45	0.34
d_3	0.41	0.33

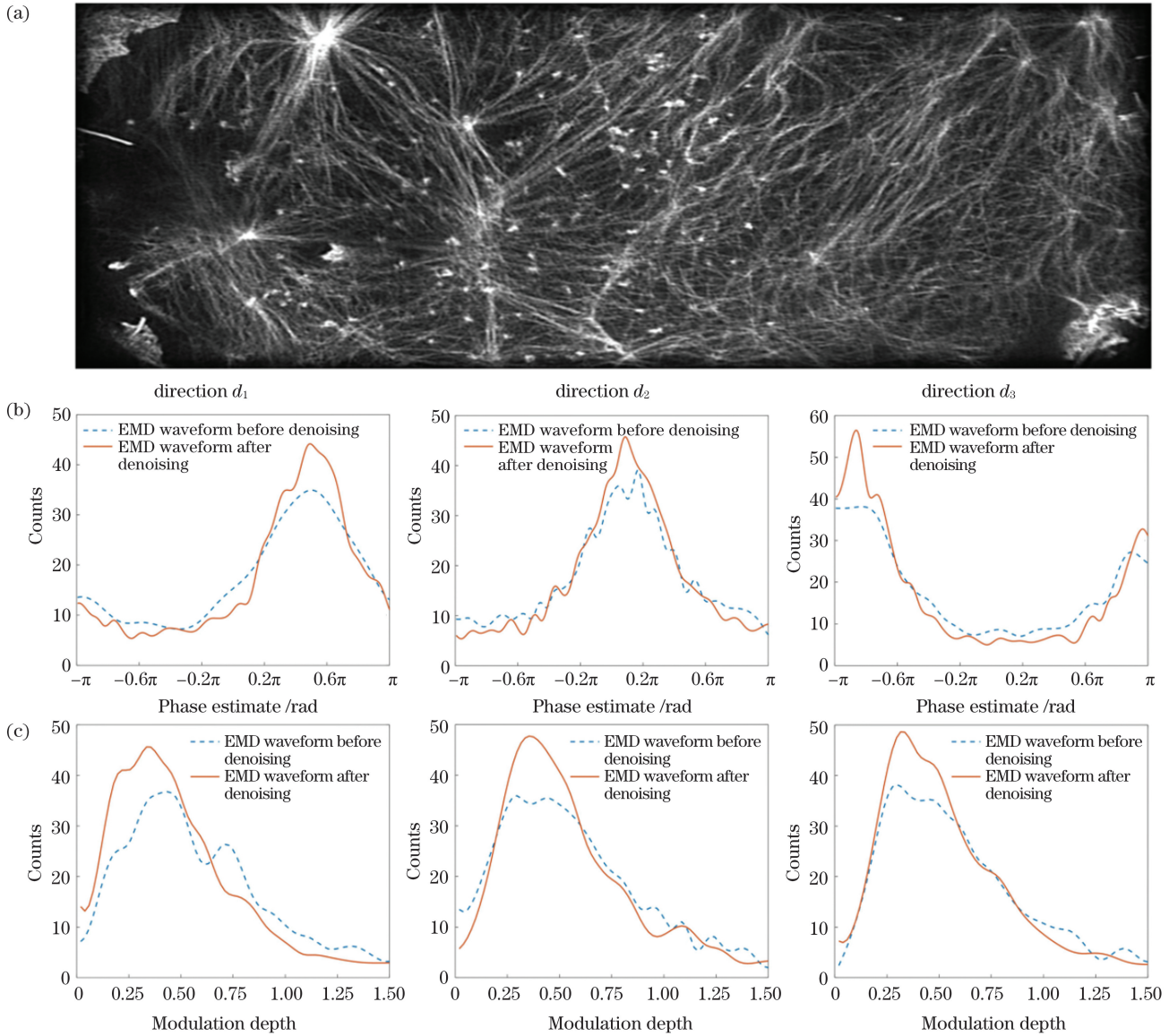


图 6 去噪前后参数估计的比较。(a)细胞骨架肌动蛋白微丝;(b)去噪前后三个方向上的初始相位估计的 EMD 波形对比;(c)去噪前后三个方向上的调制深度估计的 EMD 波形对比

Fig. 6 Comparison of parameter estimation before and after denoising. (a) Cytoskeletal actin microfilaments; (b) comparison of EMD waveform estimated with initial phase before and after denoising in three directions; (c) comparison of EMD waveform estimated with modulation depth before and after denoising in three directions

3.2 重建结果对比

本文进一步评估了 VST-VBM3D 去噪算法对 SIM 超分辨率图像的去伪影效果。首先,按照前述成像方式,连续拍摄 20 组具有相同照明光的细胞骨架肌动蛋白微丝样本;然后,直接使用维纳解卷积重建算法,将该 20 组原始图像重建为 20 张超分辨率图像;最后,将维纳解卷积重建的 20 张超分辨率图像进行平均,得到一张伪影更少的图像,并将其作为真值图像,如图 7(a)所示。同时,使用 VST-VBM3D 算法对原始图像进行去噪,再将去噪后的原始图像用维纳解卷积重建算法进行重建,得到去噪后重建的超分辨率图像。通过比较有去噪过程[如图 7(c)所示]和无去噪过程[如图 7(b)所示]的重建结果可以发现,本文提出的改进重建流程能够较好地抑制重建超分辨率图像中的伪影,如图 7(d)所示。

为了更进一步从客观指标上进行对比,取 5 个不同样本,分别按照上述实验步骤进行对比实验,并将重建结果与真值图像进行对比,同时分别计算有去噪过程和无去噪过程重建图像的 PSNR 和 SSIM 指标。由表 3 可以发现,经过 VST-VBM3D 去噪的重建图像,其 PSNR 和 SSIM 平均值(样本数为 5)相比未去噪的重建图像分别提升了 1.80 和 0.10。

表 3 PSNR 和 SSIM 平均值对比

Table 3 Comparison of mean values of PSNR and SSIM

Parameter		Value
PSNR	Without denoising	14.89
	After denoising	16.69
	Improvement	1.80
SSIM	Without denoising	0.77
	After denoising	0.87
	Improvement	0.10

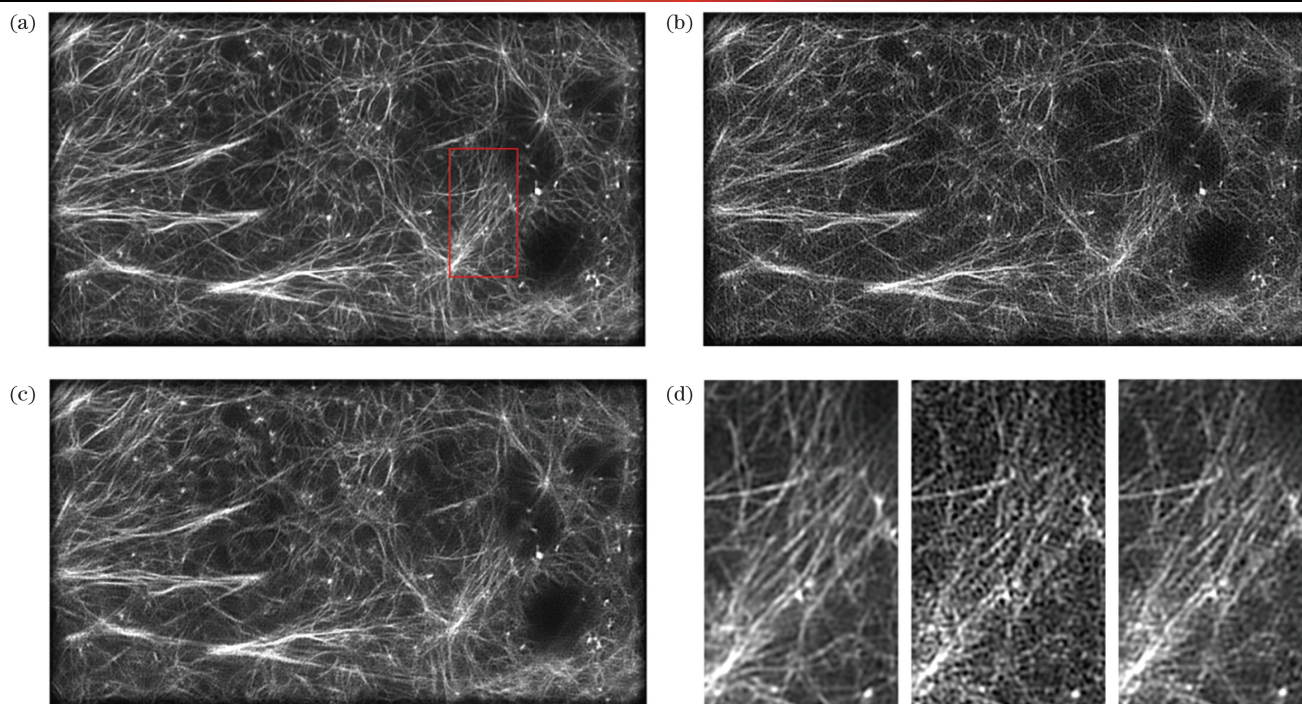


图 7 去噪前后的重建结果对比。(a)真值图像;(b)未去噪重建结果;(c)去噪后的重建结果;(d)图 7(a)、(b)、(c)的局部放大图像

Fig. 7 Comparison of reconstruction results before and after denoising. (a) Ground truth image; (b) reconstruction result without denoising; (c) reconstruction result after denoising; (d) locally magnified images of Figs. 7(a), (b), and (c)

4 结 论

基于 SIM 显微镜的重建过程,本文首先提出了 EMD 参数估计算法和分散指数指标,前者能够从原始图像中准确地估计出初始相位和调制深度,后者能够实现参数估计准确率的客观评价。同时,本文也提出了基于 VST-VBM3D 的 SIM 原始图像去噪算法,先对 SIM 显微镜采集的原始图像中的噪声进行抑制再进行超分辨率重建,既能提高参数估计的准确性,还能减少重建图像中的伪影。

参 考 文 献

- [1] 赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微镜的关键技术及应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(24): 240001. Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(24): 240001.
- [2] 刘智, 罗泽伟, 王正印, 等. 基于结构照明的超分辨荧光显微成像重建算法[J]. 中国激光, 2021, 48(3): 0307001. Liu Z, Luo Z W, Wang Z Y, et al. Super-resolution fluorescence microscopy image reconstruction algorithm based on structured illumination [J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(3): 0307001.
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [4] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-795.
- [6] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics [J]. Nature Methods, 2008, 5(5): 417-423.
- [7] 潘文慧, 陈秉灵, 张建国, 等. 基于噪声校正主成分分析的压缩感知 STORM 超分辨率图像重构 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207024. Pan W H, Chen B L, Zhang J G, et al. Compressed sensing STORM super-resolution image reconstruction based on noise correction-principal component analysis preprocessing algorithm [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207024.
- [8] 杨建宇, 董浩, 邢福临, 等. 单分子定位超分辨成像技术进展及应用 [J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(12): 1200001. Yang J Y, Dong H, Xing F L, et al. Single-molecule localization super-resolution microscopy and its applications [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(12): 1200001.
- [9] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [10] Schwentker M A, Bock H, Hofmann M, et al. Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescent protein photoswitching [J]. Microscopy Research and Technique, 2007, 70(3): 269-280.
- [11] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [12] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, et al. Nanoscopy with more than 100, 000 'doughnuts' [J]. Nature Methods, 2013, 10(8): 737-740.
- [13] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [14] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy [J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(5): 451-459.
- [15] 郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技术进展 [J]. 光学学报, 2021, 41(1): 0111001. Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution

- imaging based on frequency shift[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(1): 0111001.
- [16] Fan J C, Huang X S, Li L J, et al. A protocol for structured illumination microscopy with minimal reconstruction artifacts [J]. *Biophysics Reports*, 2019, 5(2): 80-90.
- [17] Wicker K. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space[J]. *Optics Express*, 2013, 21(21): 24692-24701.
- [18] Wicker K, Mandula O, Best G, et al. Phase optimisation for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [19] Chu K Q, McMillan P J, Smith Z J, et al. Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level[J]. *Optics Express*, 2014, 22(7): 8687-8702.
- [20] Zhao T Y, Hao H W, Wang Z J, et al. Multi-color structured illumination microscopy for live cell imaging based on the enhanced image recombination transform algorithm [J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(6): 3474-3484.
- [21] Lal A, Shan C Y, Xi P. Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2016, 22(4): 50-63.
- [22] Smith C S, Slotman J A, Schermelleh L, et al. Structured illumination microscopy with noise-controlled image reconstructions[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 821-828.
- [23] Wen G, Li S M, Wang L B, et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering [J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 70.
- [24] Wang Z J, Zhao T Y, Hao H W, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy [J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(2): 026003.
- [25] Huang N E, Shen Z, Long S R, et al. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1998, 454(1971): 903-995.
- [26] Dabov K, Foi A, Egiazarian K. Video denoising by sparse 3D transform-domain collaborative filtering [C]//2007 15th European Signal Processing Conference, September 3-7, 2007, Poznan, Poland. New York: IEEE Press, 2007: 145-149.
- [27] Dabov K, Foi A, Katkovnik V, et al. Image denoising by sparse 3-D transform-domain collaborative filtering [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2007, 16(8): 2080-2095.
- [28] Anscombe F J. The transformation of Poisson, binomial and negative-binomial data [J]. *Biometrika*, 1948, 35(3/4): 246-254.
- [29] Mäkitalo M, Foi A. A closed-form approximation of the exact unbiased inverse of the Anscombe variance-stabilizing transformation [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2011, 20(9): 2697-2698.

Reconstruction Algorithm of Structured Light Illumination Microscopy Based on Similar Block Denoising and Empirical Mode Decomposition

Dai Zhenqi, Bi Xiuli, Fan Junchao*

Chongqing Key Laboratory of Image Cognition, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China

Abstract

Objective Reducing excitation intensity or exposure time is employed to decrease the phototoxicity and photobleaching in structured illumination microscopy (SIM). However, the raw images obtained under this condition have a low signal-to-noise ratio, resulting in an error estimation of parameters and reconstruction artifacts. To improve the accuracy of parameter evaluation, some modified parameter evaluation algorithms have been proposed, including the prefiltering approach and iterative and noniterative parameter evaluation approaches. However, these approaches can only enhance the accuracy of the estimated parameters, but do not demonstrate how precise they are. In other words, these algorithms cannot assess whether there is a considerable deviation from the true value. However, to suppress the reconstruction artifacts in the reconstructed image, some reconstruction algorithms have been proposed, such as spectrum filtering, TV-SIM, and Hessian-SIM. These approaches usually reconstruct the super-resolution (SR) SIM image at the beginning, and then remove the artifacts. However, this reconstruction process will change the Poisson-Gaussian noise distribution in the images.

To address the above two issues, we first proposed a parameter evaluation approach based on empirical mode decomposition (EMD) in this research, which can precisely evaluate the initial phase and modulation depth. Measured with the proposed dispersion index, the accuracy of the estimated parameter can be given synchronously. Next, a denoising algorithm based on similar blocks was employed before SIM reconstruction in this study, which maintains the illumination pattern while suppressing the noise in the raw images. This predenoise process before reconstruction can enhance the accuracy of parameter evaluation and remove the artifacts.

Methods This study employs empirical modal decomposition (EMD) to smooth out the frequency distribution of the estimated initial phase and modulation depth. The specific process is as follows. First, the distribution curve of the parameter estimate was decomposed with each inherent mode function component. Next, only the mode component below 4 was accumulated, which can be superimposed as a smooth fitting curve. Finally, we evaluated the initial phase and modulation depth by this superimposed smooth curve.

The dispersion index was proposed as a quantitative index that can be used to measure the evaluated initial phase and modulation depth accuracy in this study. This index primarily characterized the degree of concentration of the curve from the global and local aspects.

This study also suggested a new process of denoising the raw images first and then conducting SR reconstruction, which can enhance the accuracy of the parameter estimation and reduce the artifacts. First, we obtained the average of the raw images and concatenated it with the raw images. Next, a VST transformation was performed on the concatenated images, followed by a VBM3D-based denoising process. Finally, the denoised findings were subjected to a VST inverse transformation. After the complete denoising process, we performed the subsequent SR reconstruction.

Results and Discussions We first imaged actin with 20 groups for comparison experiments. Each group contained 9 raw images, with three phases in every three directions, for a total of 180 images with 486 ms. These 20 groups of raw images can be directly reconstructed into 20 SR images by the Wiener reconstruction algorithm. Thereafter, we averaged the 20 SR images to one image that serves as the ground truth.

For the parameter evaluation, the frequency distribution of the parameter estimates is ideally similar to the shape of the impulse function [Fig. 1(b)]. However, because of the effect of noise, the actual distribution is a smooth curve with local jitter [blue solid line in Fig. 1(c)]. The EMD algorithm was then employed to fit this curve to make parameter estimation easier [Fig. 1(c) red dashed line].

To evaluate the accuracy of the estimated initial phase and modulation depth, we proposed a dispersion index and confirmed its effectiveness. First, we averaged the first 1, 3, 5, 7, 9, and 11 groups of the raw images to obtain six groups of images with various SNR. These six group images were employed as experimental data for the evaluation of the dispersion index. The experiment reveals that with the enhancement of the raw images' SNR, the EMD curve [Fig. 4(d)–(e) red dashed line] is more similar to the shape of the impulse function. Moreover, the dispersion index gradually decreases [Fig. 4(c)]. Therefore, the dispersion index characterized the relationship between the SNR of raw images and parameter evaluation accuracy.

The two benefits of the proposed denoising algorithm are also confirmed. First, we found that the EMD curve is more concentrated [Fig. 6(b)–(c)] and the dispersion index is low (Table 1 and Table 2), implying that the calculated parameters are more accurate when using the VST-VBM3D denoising algorithm. In the meantime, we discovered that the artifacts are suppressed [Fig. 7(d)] and the PSNR and SSIM values were high (Table 3) when using the proposed denoising algorithm.

Conclusions This study proposes a parameter evaluation algorithm based on the EMD algorithm and corresponding dispersion index, which can accurately evaluate the initial phase and modulation depth from the raw images and simultaneously analyze the evaluation accuracy. Simultaneously, this study also proposes a VST-VBM3D-based denoising algorithm for SIM raw images, which may suppress the noise in the raw images before the SR reconstruction procedure. This predenoise approach not only enhances the accuracy of parameter evaluation but also reduces the artifacts in reconstructed SR images.

Key words bio-optics; image processing; microscope; reconstruction algorithm; empirical mode decomposition; dispersion index; similar block denoise