

基于改进 U-Net 的自动聚焦相衬技术在细胞成像中的应用

杨柳, 王华英, 董昭, 郭海军*, 王杰宇, 王文健

河北工程大学数理科学与工程学院, 河北 邯郸 056038

摘要 本文针对普通显微镜相衬成像需要手动聚焦、切换相位板等问题, 提出了一种基于深度学习的自动聚焦相衬显微方法, 并且基于该方法设计了一种基于 U-Net 的网络框架。在该网络框架中引入残差模块和空间注意力机制, 目的是使网络更好地利用特征图之间的关系, 同时使用密集模块加强特征信息复用, 以提高网络的性能。采用三种不同类型的样本在不同的焦距下进行训练网络, 数值计算和实验结果表明, 所提方法可以快速、精准地实现自动聚焦相衬成像, 并达到去噪的效果。此外, 将本文所提网络框架与 U-Net、生成对抗网络进行了比较, 较高的 SSIM 值显示了所提网络框架的优势。最后, 使用基于少量数据集即可完成训练的生成对抗网络对自动聚焦相衬成像进行验证, 证明了该方法的可行性。本文所提出的基于改进 U-Net 的自动聚焦相衬成像方法有助于细胞生物学研究。

关键词 医用光学; 深度学习; 相衬显微; 自动聚焦; U-Net

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507302

1 引言

光学显微镜是一种通用工具, 已被广泛应用于工业、生物医学等领域^[1], 其显微模式包括明场(BF)、暗场(DF)、微分干涉对比(DIC)和相衬(PC), 可以对标本进行实时观察。相位型物体不改变入射光的振幅, 但其厚度或折射率的变化会改变入射光波的相位分布, 从而难以观察真实的相位分布。为了解决这一问题, 通常需把相位变化转化为强度(或振幅)变化, 也就是把空间相位调制的信息变换为空间强度(或振幅)调制的信息。生物医学上经常通过对透明样品进行化学染色来观察其相位结构, 但化学染色^[2]会对样本产生不可逆转的影响, 同时染色还会改变样本结构, 甚至会杀死活体细胞, 使得人们不能在显微镜下如实地观察样品的生命过程。相衬法^[3-13]提供了一种无需标记和染色即可观察样品的显微镜技术, 但泽尼克相衬显微镜需要在物镜的傅里叶光谱处嵌入圆形泽尼克相位板, 而微分干涉相衬显微镜则需要一个双折射晶体, 复杂的光学配置和计算时间成本限制了它们的进一步应用^[4]。

此外, 图像自聚焦也是光学成像中的一个难题, 它是对样本进行高质量相衬成像的关键步骤^[14-17], 在获

取不同区域的样本信息时需要进行多次聚焦, 因此不能实时获取细胞信息。传统的自动聚焦通常使用两种方法^[16-17]来实现: 一种是基于硬件的光学自动聚焦方法, 该方法依赖于与显微镜系统集成的附加距离传感器; 另一种是自动聚焦方法, 该方法通常需要轴向扫描样品, 不仅成像时间很长, 而且可能会对样品产生光毒性和光漂白作用^[15]。与常规的自动聚焦方法相比, 基于深度学习的自动聚焦方法更快速、精准, 并且不会对活体细胞造成破坏^[17]。

近年来, 深度学习技术发展迅速, 并且在计算成像等领域取得了优异成果^[17-23]。本研究团队提出了一种基于深度学习的自动聚焦相衬成像方法, 该方法不需要人工染色、聚焦等步骤即可实现自动聚焦相衬成像, 并且, 本团队为这种自动聚焦相衬成像方法设计了一种 DLFP (deep learning auto-focus phase contrast imaging) 网络框架, 以快速、精准地实现自动聚焦相衬成像。采用洋葱表皮细胞、红细胞、人皮过汗腺切片等样本进行训练测试, 训练好的网络可以快速输出高质量的聚焦相衬图像。此外, 本团队利用不同网络对自动聚焦相衬成像的实验效果进行了评估, 结果证明本文所提网络框架性能均优于传统的神经网络结构。

收稿日期: 2021-12-06; 修回日期: 2022-01-13; 录用日期: 2022-01-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(62175059)、河北省自然科学基金重点项目(2018402285)、河北省创新能力提升计划(20540302D)

通信作者: *Eghj6028039@163.com

此外,考虑到实际应用中采集大量实验数据来制作训练数据集难度较大,本团队采用基于数据集就能够完成训练的生成对抗网络(pix2pix-GAN)^[23]进行实验验证,实验结果再一次证明了本文所提自动聚焦相衬成像方法的可行性。

2 基本原理

2.1 泽尼克相衬显微方法

泽尼克相衬法改变的是频谱面中心光场的振幅或相位,在物光场上叠加一个平行光参考光束,因此又称为“幅相变换”。图 1 所示为泽尼克相衬显微原理图。泽尼克相衬显微镜将相位的改变变换为等效的人眼可以看到的振幅的改变。设样品的复振幅透过率为 $t(x_1, y_1)$,光强为 $I \approx 1$,滤波函数为 $H(\xi, \eta)$,通过滤

波函数之后的频谱为

$$F(\xi, \eta)H(\xi, \eta) = \pm j\delta(\xi, \eta) + j\varphi(\xi, \eta), \quad (1)$$

复振幅分布为

$$g(x_3, y_3) = \pm j + j\varphi(x_3, y_3), \quad (2)$$

像的强度分布为

$$I(x_3, y_3) = |j[\pm 1 + \varphi(x_3, y_3)]|^2 \approx 1 \pm 2\varphi(x_3, y_3), \quad (3)$$

式中: $F(\xi, \eta)$ 是对样品的复振幅透过率 $t(x_1, y_1)$ 作傅里叶变换后的结果; $\delta(\xi, \eta)$ 是对 1 作傅里叶变换后的结果; $\varphi(x_3, y_3)$ 表示由生物样品引起的光场的相位延迟。由式(3)可知像的强度与物的相位呈线性关系,因此可以将物的强度分布转换为光的强度分布,从而可以观察到透明物体的相位信息。取正号时,光强强,称为正相衬;取负号时,光强弱,称为负相衬^[3]。

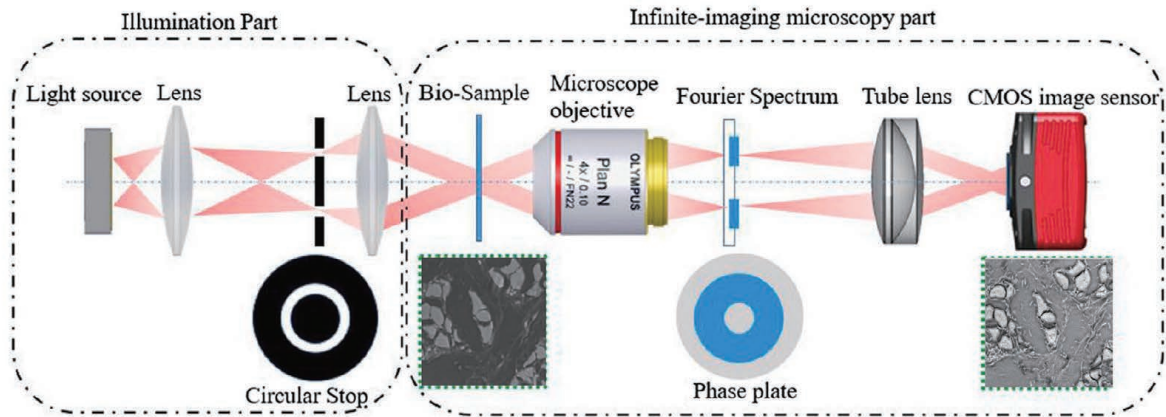


图 1 传统泽尼克相衬显微成像系统的光路图^[4]

Fig. 1 Optical path schematic of traditional Zernike phase contrast microscopic imaging system^[4]

2.2 数据准备

本文所提 DLFP 网络框架实现自动聚焦相衬成像由训练和测试两个过程构成,如图 2 所示。在神经网络训练过程中,使用成对的随机离焦显微图像及其相应的聚焦相衬图像进行训练,如图 2(b)所示。神经

网络的测试过程如图 2(b)所示,选取未出现在网络训练集中的随机离焦图像输入至训练好的神经网络中,可以快速输出聚焦相衬图像。所有实验数据的采集均采用 XSP-37XF 显微镜进行。图像的获取过程主要包括两部分:一是图像的采集,通过手动调整焦

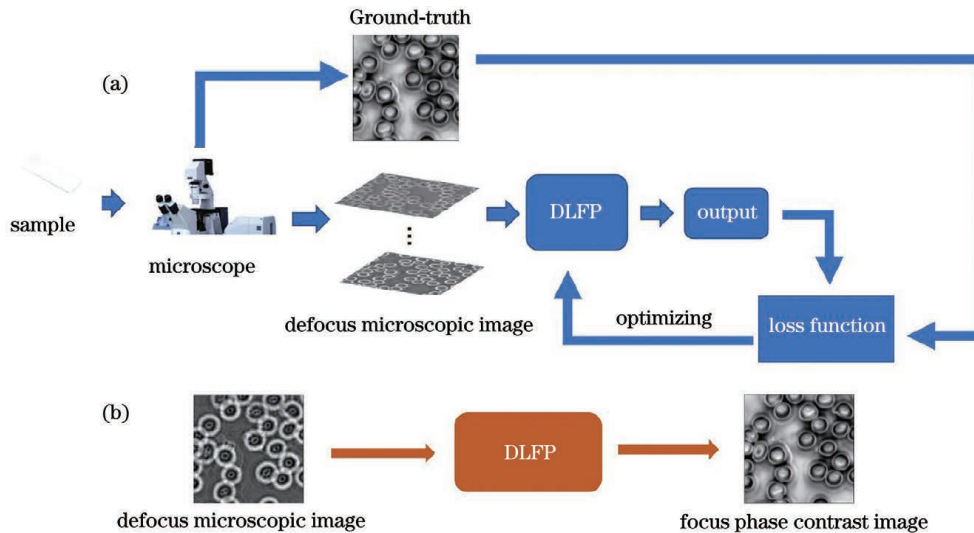


图 2 网络训练和测试流程图。(a)数据采集以及网络训练流程图;(b)网络测试流程图

Fig. 2 Flow charts of network training and testing. (a) Flow chart of data collection and network training; (b) flow chart of network testing

距(Z)为 $0, \pm 4, \pm 8, \pm 12 \mu\text{m}$ 来获取显微图像,再移动圆形泽尼克相位板得到该显微图像对应的相衬图像;二是通过平移、旋转等方法来扩充数据集。图 3 所示为部分数据集,其中,图 3(a)、(b)分别为不同焦距下红细胞和洋葱表皮细胞相同区域的离焦显微图像,图 3(c)展示了人皮过汗腺切片随机区域的离焦显微图像。由图 3(a)可以看出,红细胞体积很小,形如圆盘。红细胞具有弹性和可塑性,可

以改变形状。通过相衬成像可以观察到红细胞的信息,如中间下凹,边缘较厚。洋葱表皮细胞较大,便于观察,表现为长的以多边形栅栏状排列的规则细胞,在图 3(b)中可以观察到洋葱表皮细胞的细胞壁、细胞质、细胞核。由图 3(c)可以看到,人皮过汗腺切片的每一侧膜上都整齐地排列着若干细胞,细胞形状不规则,显微镜下的细胞内部特征结构不清晰。

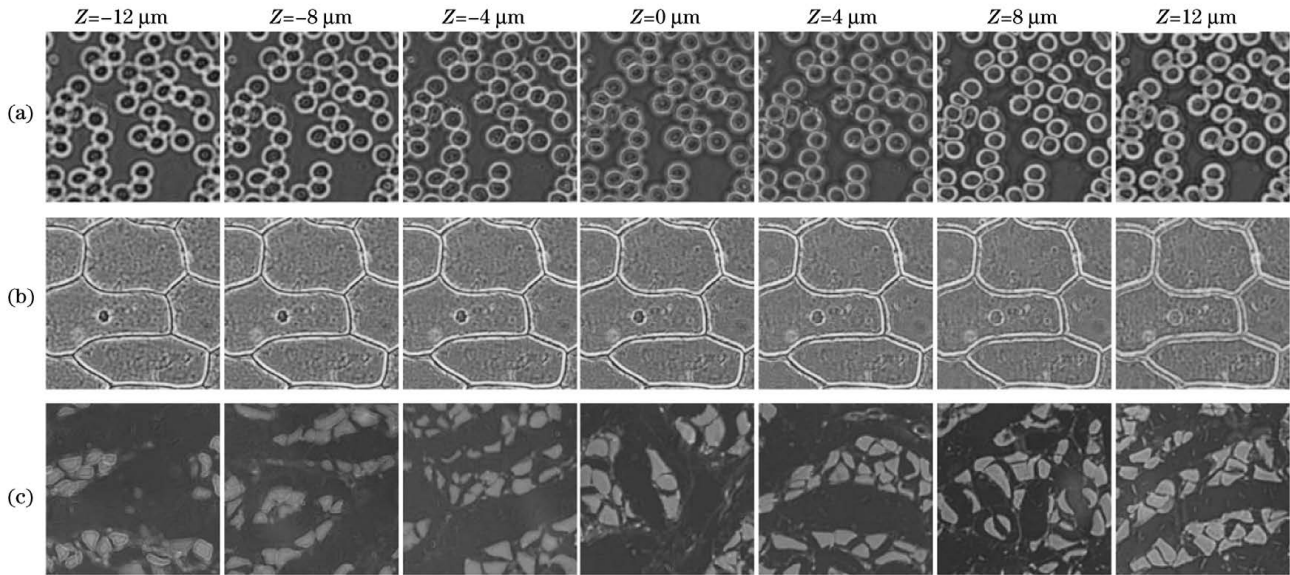


图 3 部分数据集。(a)红细胞的离焦显微图像;(b)洋葱表皮细胞的离焦显微图像;(c)人皮过汗腺切片的离焦显微图像
Fig. 3 Partial data sets. (a) Defocused microscopic images of red blood cells; (b) defocused microscopic images of onion epidermal cells; (c) defocused microscopic images of human skin perspiration glands slices

2.3 DLFP 网络结构

如图 4(a)所示,基于 U-Net 改进的 DLFP 网络中的下采样采用的是最大池化方法,上采样采用的是反卷积方法,5 个最大池化(Max pool)层和 5 个转置卷积层用于生成多尺度特征。其中:最大池化层取 2×2 区域的最大值,并将特征大小减小一半;反卷积的每个卷积层的核大小选择 3×3 ,输出结果的最后一层是 1×1 卷积层。除最后一层没有使用激活函数外,其余每一层都使用 ReLu 激活函数。DLFP 网络中保留了 U-Net 模型的多个跳跃连接结构,以重用编码过程中提取的特征。编码后的特性连接到逆卷积层,在保留高级特征信息的同时提供低级特征信息。

考虑到随着网络深度的增加,反向传播会造成梯度爆炸和梯度消失,因此,本工作在 U-Net 的基础上加入了残差块(ResNet),以解决网络深度带来的训练困难的难题,提高网络的准确度和精度。此外,使用密集模块来加强特征信息复用,同时引入简单、轻量级的 Gather-Excite Net 空间注意力机制^[24-26],以更好地挖掘图像或特征图空间的上下文信息,使网络能选择性地加强有用特征信息并抑制无用特征信息,增强网络的性能,提高图像的分辨率。如图 4(b)所示,该模块定义了 Gather,表示为 ξG , Excite 表示

为 ξE 。 ξG 聚合给定空间范围的要素,并将其以及输入张量传递给 ξE , ξE 产生与输出张量维度相匹配的输出^[26]。

2.4 生成对抗网络的结构与原理

生成对抗网络主要由生成器和判别器组成。生成器采用 U-Net 结构,其主要作用是下采样提取输入图像的特征信息与上采样图像恢复;判别器的作用是在输入图像的条件下,将输出图像判断为假,将真实图像判断为真。判别器网络用到了 PatchGAN^[23]。PatchGAN 不需要将整张图片输入到判别器中,它将一张图片切割成不同的 $N \times N$ 大小的 patch,然后对每一个 patch 进行真假判别,将一张图片所有 patch 的结果取平均值,并将平均值作为最终的判别器输出。如图 5 所示,本文判别器由 64 个大小为 4×4 、步长为 2 的卷积核构成,且添加了 LeakyReLU 层。该判别器将图像分为不同的区域,分别进行判别,并将结果取平均值,保证了图像的高分辨率^[23]。

2.5 网络训练设置

所有神经网络的训练均在 Ubuntu 18.04 环境下进行,使用 Python 及 Pytorch 编写代码,使用 MATLAB 代码处理图片。实验在一台台式计算机(Intel 酷睿处理器 i7-9700 CPU, 3 GHz, GeForce

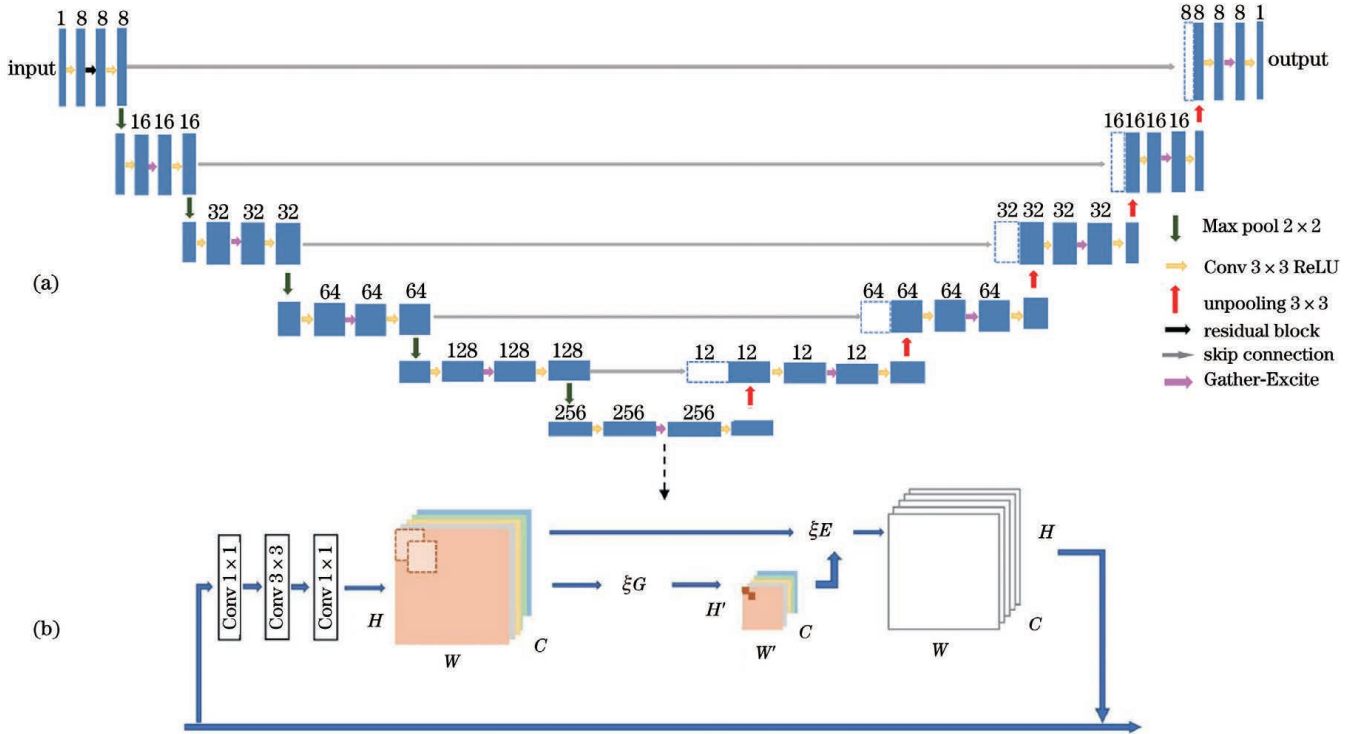


图 4 神经网络模型。(a)DLFP 网络模型结构;(b)Gather-Excite 模块操作图,其中 H 为高度, W 为宽, C 为通道数, W' 为上取整(W/e), H' 为上取整(H/e), e 表示范围比率

Fig. 4 Neural network model. (a) DLFP network model structure; (b) operation diagram of Gather-Excite module, where H is the height, W is the width, C is the number of channels, W' is the rounded up (W/e), H' is the rounded up (H/e), and e represents the ratio of selected ranges

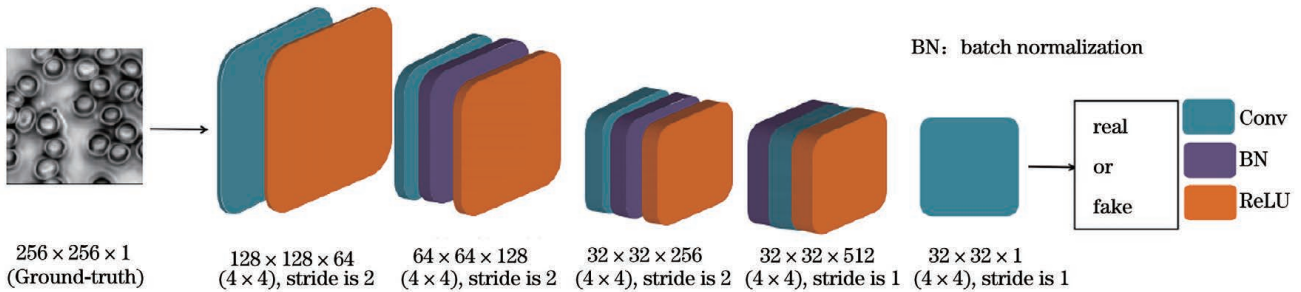


图 5 判别器网络结构

Fig. 5 Discriminator network structure

GTX2060,显存 8 GB)上进行。数据集由焦距为 0、 ± 4 、 ± 8 、 $\pm 12 \mu\text{m}$ 的显微图像以及对应的相衬图像构成,网络输入图像和输出图像的尺寸均为 256 pixel × 256 pixel。不同的样本在网络训练时均使用 29561 幅不同离焦距离下的显微图像作为神经网络数据集,其中数据集的 95%和 5%分别用作训练集和测试集。网络参数设置如表 1 所示。在进行少量数据集验证时,

表 1 网络参数设置

Table 1 Network parameter setting

Network	Batch size	Learning-rate	Epoch	Training set
DLFP	16	1×10^{-3}	120	28000
U-Net	16	1×10^{-3}	120	28000
Pix2pix	16	1×10^{-3}	120	28000

生成对抗网络(pix2pix)使用 1000 幅图像对作为数据集,其中 80%作为训练集,20%作为测试集,网络参数设置不变。

3 分析与讨论

3.1 视觉评价

图 6 为基于深度学习的相衬成像结果,样本为完全透明的洋葱表皮细胞、红细胞、人皮过汗腺切片。图 6(a)、(d)、(g)为显微镜采集的三种样本的显微图像,图 6(b)、(e)、(h)为真实值(Ground-truth),图 6(c)、(f)、(i)为 DLFP 网络输出结果。显微图像、Ground-truth、相衬图像的尺寸均为 256 pixel × 256 pixel。由图 6(a)、(d)、(g)可以看出,各细胞样品显微图像的对比度较低,如图 6(g)所示的人皮过汗腺

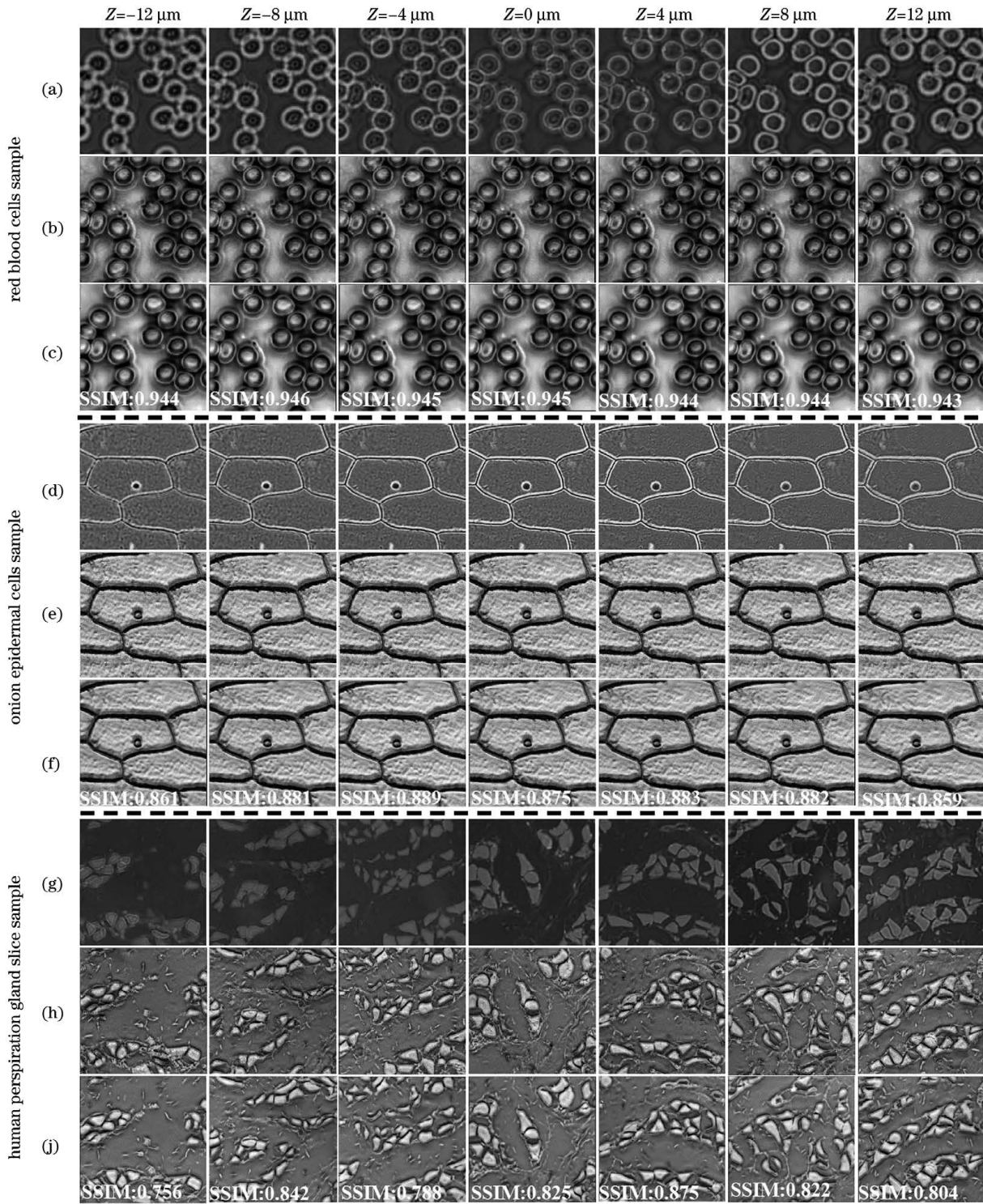


图 6 测试结果。(a)(d)(g)网络输入显微图像;(b)(e)(h)Ground-truth;(c)(f)(i)DLFP 网络输出结果

Fig. 6 Test results. (a)(d)(g) Network input microscopic images; (b)(e)(h) Ground-truth; (c)(f)(i) output results of DLFP network

切片,其细胞内部特征结构不清晰。采用 DLFP 网络结构得到的相衬结果可以很好地将显微图像中的高度信息及细节展现出来。

3.2 实验结果分析

为了定量评估网络的输出结果,本文使用结构相似性指数(SSIM)作为评价指标来计算网络输出图像与 Ground-truth 的相似度。SSIM 的计算公式为

$$SSIM(x, y) = \frac{(2u_x u_y + c_1) + (2\sigma_{xy} + c_2)}{(u_x^2 + u_y^2 + c_1)(\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + c_2)}, \quad (4)$$

式中: u_x 为 x 的均值; u_y 为 y 的均值; σ_x^2 为 x 的方差; σ_y^2 为 y 的方差; σ_{xy} 为 x 和 y 的协方差; c_1 、 c_2 为两个常数,是为了避免分母为 0 带来系统错误而人为加入的。SSIM 值在 0~1 之间,数值越大,网络输出图像与 Ground-truth 的相似性越高。

红细胞的测试结果如图 6(a)~(c)所示。网络输入随机离焦图像如图 6(a)所示,可见,输入图像的对比度较低,不能有效观察细胞内部特征结构。神经网络输出结果如图 6(c)所示,训练好的网络可以快速输出高质量聚焦相衬图像,当离焦距离 Z 为 -12 、 -8 、 -4 、 0 、 4 、 8 、 $12 \mu\text{m}$ 时,红细胞的网络输出结果与 Ground-truth 之间的 SSIM 值分别为 0.944 、 0.946 、 0.945 、 0.945 、 0.944 、 0.944 、 0.943 ,验证了 DLFP 网络输出结果与真实值的相似性较高。

洋葱表皮细胞样本和人皮过汗腺切片样本的实验结果如图 6(d)~(i)所示。当离焦距离 Z 为 -12 、 -8 、 -4 、 0 、 4 、 8 、 $12 \mu\text{m}$ 时,洋葱表皮细胞的网络输出结果与 Ground-truth 之间的 SSIM 分别为 0.861 、

0.881 、 0.889 、 0.875 、 0.883 、 0.882 、 0.859 ,人皮过汗腺切片的网络输出结果与 Ground-truth 之间的结构相似性指数分别为 0.756 、 0.842 、 0.788 、 0.825 、 0.875 、 0.822 、 0.804 。不同样本的测试结果进一步验证了本文所提 DLFP 网络的自动聚焦相衬成像方法的可行性。

同时,本文详细比较了 DLFP 网络输出图像与 Ground-truth 在水平方向(h)和垂直方向(v)上的像素点数值。如图 7 所示,随机抽取三个不同的样本中进行分析,DLFP 网络输出图像与 Ground-truth 在水平方向和垂直方向上均能达到较高的重合度,进一步证明了网络输出图像与 Ground-truth 高度相似,也证明了 DLFP 网络的准确性。

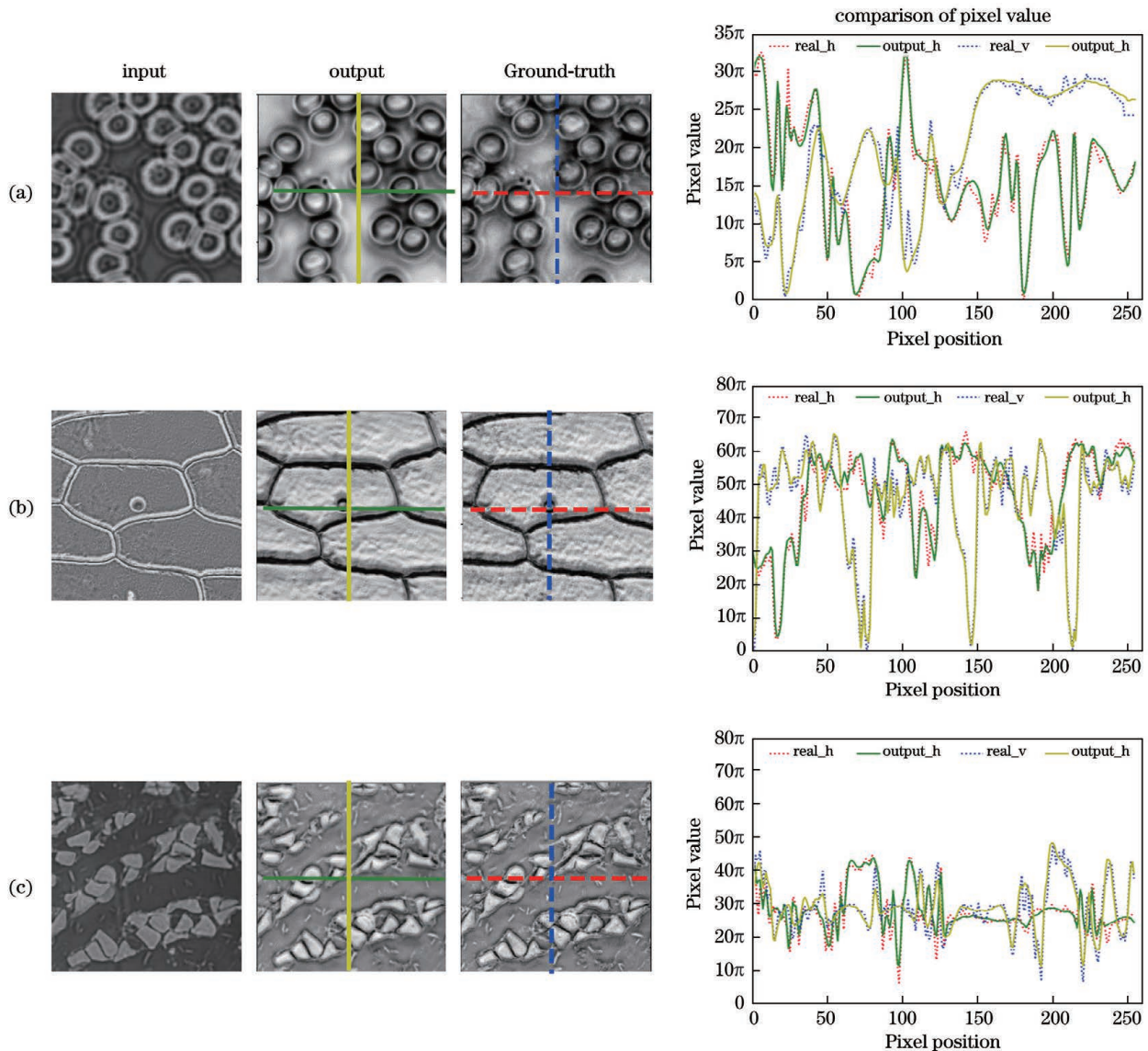


图 7 Ground-truth 与 DLFP 网络输出结果中心线之间的像素值比较。(a)红细胞;(b)洋葱表皮细胞;(c)人皮过汗腺切片
Fig. 7 Comparison of pixel values between Ground-truth and center line of DLFP network output results. (a) Red blood cells; (b) onion epidermal cells; (c) human skin perspiration glands slice

3.3 网络评估

为了展示本文所设计的网络框架的优势,将其与传统的 U-Net 结构、生成对抗网络(pix2pix)进行对

比。DLFP、U-Net 和 pix2pix 采用相同的数据集进行训练,不同网络模型的输出结果如图 8 所示。可见, U-Net 的实验结果中丢失了一些细节信息, pix2pix 的

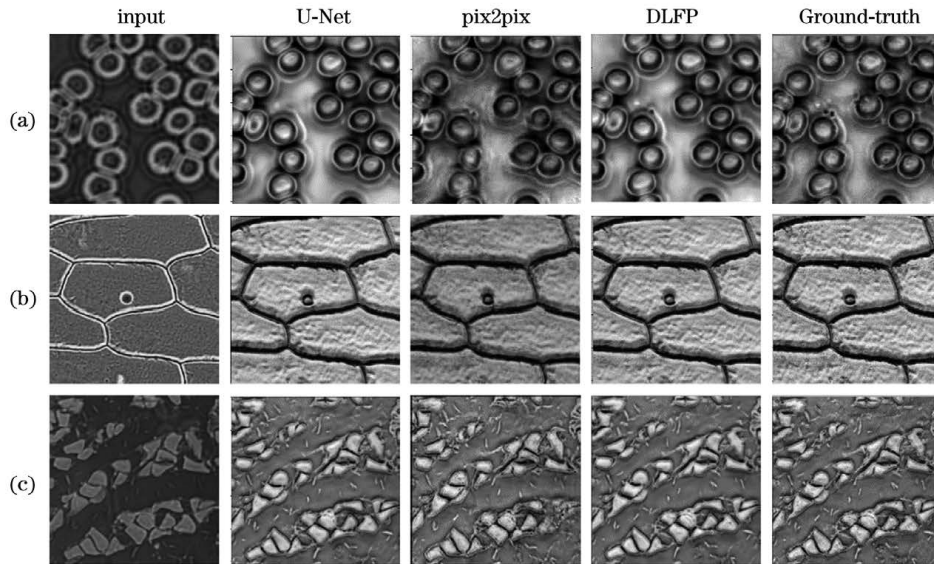


图 8 不同网络模型的输出结果。(a)红细胞;(b)洋葱表皮细胞;(c)人皮过汗腺切片

Fig. 8 Output results of different network models. (a) Red blood cells; (b) onion epidermal cells; (c) human skin perspiration gland slice

实验结果中含有大量噪声。三个模型的性能评价指标如表 2 所示,较高的 SSIM 值验证了 DLFP 网络框架的优势。

表 2 不同网络的实验结果评估

Table 2 Experimental results evaluation of different networks

Network	SSIM		
	Red blood cell	Onion epidermal cell	Human skin perspiration gland slice
U-Net	0.913±0.006	0.850±0.020	0.700±0.158
Pix2pix	0.700±0.088	0.650±0.050	0.670±0.050
DLFP	0.942±0.002	0.870±0.020	0.810±0.065

3.4 少量数据自动聚焦相衬成像结果分析

在实际应用中存在难以获取大量数据集的情况,而数据集对于深度学习来说又是至关重要的,因此,本课题组利用基于少量数据集就能够完成训练的生成对抗网络(pix2pix-GAN)进行实验,以进一步验证基于深度学习的自动聚焦相衬成像方法的有效性。

采用与前述实验相同的数据样本,即红细胞、洋葱表皮细胞、人皮过汗腺切片,采用少量训练集(800 张图像对)进行训练,生成对抗网络。将测试集输入训练好的网络中,得到的实验结果如图 9 所示。当焦距 Z 为 -12 、 -8 、 -4 、 0 、 4 、 8 、 $12 \mu\text{m}$ 时,红细胞样本的网络输出图像与 Ground-truth 之间的 SSIM 值分

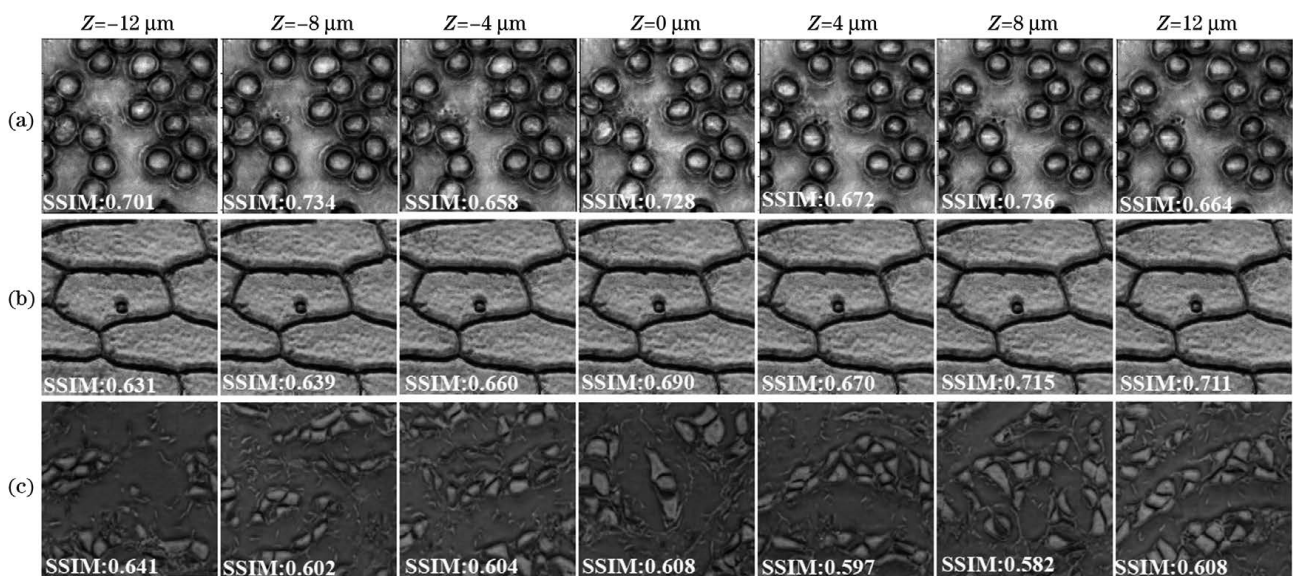


图 9 少量数据集在生成对抗网络中的测试结果。(a)红细胞样本的测试结果;(b)洋葱表皮细胞样本的测试结果;(c)人皮过汗腺切片样本的测试结果

Fig. 9 Test results of a small number of data sets in generating adversarial network. (a) Test result of red blood cell sample; (b) test result of onion epidermal cell sample; (c) test result of human skin perspiration gland slice sample

别为 0.701、0.734、0.658、0.728、0.672、0.736、0.664, 洋葱表皮细胞样本的网络输出图像与 Ground-truth 之间的 SSIM 值分别为 0.631、0.639、0.660、0.690、0.670、0.715、0.711, 人皮过汗腺切片的网络输出图像与 Ground-truth 之间的 SSIM 值分别为 0.641、0.602、0.604、0.608、0.597、0.582、0.608。不同实验样本的测试结果证明少量数据集通过神经网络训练同样具有自动聚焦相衬的效果, 并且能够观察到图像的相位信息。

4 结 论

本文首先提出了一种基于深度学习的自动聚焦相衬显微方法, 利用深度学习将对比度低、细胞内部特征结构不清晰的显微图像转换为聚焦相衬图像; 接着, 提出了一种专门为自动聚焦相衬显微方法设计的 DLFP 网络框架。该框架基于 U-Net 网络对所提方法的不足之处进行改进, 加入了残差块, 用于提高网络的准确度和精度, 同时引入了简单、轻量级的 Gather-Excite Net 空间注意力机制, 使用密集模块加强特征信息复用, 提高了网络的性能和网络输出图像的分辨率。在不同的焦距下对网络进行训练, 结果显示, 所提方法可以实现自动聚焦相衬成像。以未染色的洋葱表皮细胞、红细胞、人皮过汗腺切片为例进行实验验证, 结果表明, DLFP 网络输出图像与 Ground-truth 之间的 SSIM 值均较高, 提高了细胞内部结构特征的辨识度。数值计算和实验结果表明, DLFP 网络框架可快速、精准地实现自动聚焦相衬成像。本文所提网络框架与 U-Net、生成对抗网络的比较结果显示, 所提网络框架较高的 SSIM 值显示了它的优势。最后, 考虑到实际应用中存在数据量过少的情况, 本文采用生成对抗网络验证了基于深度学习的自动聚焦相衬成像方法的有效性和可行性。

参 考 文 献

- [1] Toda K, Tamamitsu M, Nagashima Y, et al. Molecular contrast on phase-contrast microscope[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9957.
- [2] Rivenson Y, Wang H, Wei Z, et al. Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning[J]. Nature Biomedical Engineering, 2019, 3(6): 466-477.
- [3] Maurer C, Jesacher A, Bernet S, et al. Phase contrast microscopy with full numerical aperture illumination[J]. Optics Express, 2008, 16(24): 19821-19829.
- [4] Bian Y X, Jiang Y N, Huang Y R, et al. Smart-phone phase contrast microscope with a singlet lens and deep learning[J]. Optics & Laser Technology, 2021, 139: 106900.
- [5] Bian Y X, Jiang Y N, Deng W J, et al. Deep learning virtual Zernike phase contrast imaging for singlet microscopy[J]. AIP Advances, 2021, 11(6): 065311.
- [6] Niu M X, Luo G, Shu X, et al. Portable quantitative phase microscope for material metrology and biological imaging[J]. Photonics Research, 2020, 8(7): 1253-1259.
- [7] 刘中法, 杨艺哲, 方宇, 等. 基于深度学习的虚拟相衬成像方法[J]. 光学学报, 2021, 41(22): 2217001.
Liu Z F, Yang Y Z, Fang Y, et al. Deep learning-based virtual phase contrast imaging method[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(22): 2217001.
- [8] Mehta S B, Sheppard C J R. Partially coherent image formation in differential interference contrast (DIC) microscope[J]. Optics Express, 2008, 16(24): 19462-19479.
- [9] 陈剑钊, 林丹樱, 黄建衡, 等. 用于高分辨 X 射线显微镜的相衬方法研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2013, 50(6): 060004.
Chen J Z, Lin D Y, Huang J H, et al. Research progress of phase contrast methods for high-resolution X-ray microscope[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2013, 50(6): 060004.
- [10] Herring G K, Hesselink L. Holographic X-ray detection: a method for high resolution, high efficiency X-ray detection with differential phase contrast[J]. Applied Physics Letters, 2021, 118(26): 261105.
- [11] Fan Y, Sun J S, Chen Q, et al. Optimal illumination scheme for isotropic quantitative differential phase contrast microscopy[J]. Photonics Research, 2019, 7(8): 890-904.
- [12] de Oliveira C S, González A T, Hedtke T, et al. Direct three-dimensional imaging for morphological analysis of electrospun fibers with laboratory-based Zernike X-ray phase-contrast computed tomography[J]. Materials Science and Engineering: C, 2020, 115: 111045.
- [13] Pan A, Zuo C, Yao B L. High-resolution and large field-of-view Fourier ptychographic microscopy and its applications in biomedicine[J]. Reports on Progress in Physics, 2020, 83(9): 096101.
- [14] Xu J, Kong Y, Jiang Z L, et al. Accelerating wavefront-sensing-based autofocusing using pixel reduction in spatial and frequency domains[J]. Applied Optics, 2019, 58(11): 3003-3012.
- [15] Bopp M A, Jia Y, Li L, et al. Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(20): 10630-10635.
- [16] Pinkard H, Phillips Z, Babakhani A, et al. Deep learning for single-shot autofocus microscopy[J]. Optica, 2019, 6(6): 794-797.
- [17] Luo Y L, Huang L Z, Rivenson Y, et al. Single-shot autofocusing of microscopy images using deep learning[J]. ACS Photonics, 2021, 8(2): 625-638.
- [18] 左超, 冯世杰, 张翔宇, 等. 深度学习下的计算成像: 现状、挑战与未来[J]. 光学学报, 2020, 40(1): 0111003.
Zuo C, Feng S J, Zhang X Y, et al. Deep learning based computational imaging: status, challenges, and future[J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(1): 0111003.
- [19] 王一同, 周宏强, 闫景道, 等. 基于深度学习算法的计算光学研究进展[J]. 中国激光, 2021, 48(19): 1918004.
Wang Y T, Zhou H Q, Yan J X, et al. Advances in computational optics based on deep learning[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(19): 1918004.
- [20] 王飞, 王昊, 卞耀明, 等. 深度学习在计算成像中的应用[J]. 光学学报, 2020, 40(1): 0111002.
Wang F, Wang H, Bian Y M, et al. Applications of deep learning in computational imaging[J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(1): 0111002.
- [21] 李浩宇, 曲丽颖, 华子杰, 等. 基于深度学习的荧光显微成像技术及应用[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(18): 1811007.
Li H Y, Qu L Y, Hua Z J, et al. Deep learning based fluorescence microscopy imaging technologies and applications[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(18): 1811007.
- [22] 肖康, 田立君, 王中阳. 基于深度学习的低信噪比下的快速超分辨荧光显微成像[J]. 中国激光, 2020, 47(10): 1007002.
Xiao K, Tian L J, Wang Z Y. Fast super-resolution fluorescence microscopy imaging with low signal-to-noise ratio based on deep learning[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(10): 1007002.

- [23] Isola P, Zhu J Y, Zhou T H, et al. Image-to-image translation with conditional adversarial networks[C]//2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, July 21-26, 2017, Honolulu, HI, USA. New York: IEEE Press, 2017: 5967-5976.
- [24] Shi X S, Xing F Y, Xu K D, et al. Loss-based attention for interpreting image-level prediction of convolutional neural networks[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2020, 30: 1662-1675.
- [25] Zhang Z, Tang Z M, Wang Y, et al. Dense residual network: enhancing global dense feature flow for character recognition[J]. Neural Networks, 2021, 139: 77-85.
- [26] Zhang S Y, Qi G J, Cao X C, et al. Human parsing with pyramidal gather-excite context [J]. IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology, 2021, 31(3): 1016-1030.

Application of Auto-Focusing Technology Based on Improved U-Net in Cell Imaging

Yang Liu, Wang Huaying, Dong Zhao, Guo Haijun*, Wang Jieyu, Wang Wenjian

College of Mathematical Science and Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China

Abstract

Objective Chemical staining in biomedicine is used to observe the phase structure of transparent samples; however, it can change the structure of samples and even kill living cells, making it impossible to observe the life process of samples truthfully under a microscope. Phase contrast overcomes this difficulty and provides a microscopy technique for viewing specimens without labeling or staining, but the costs of complex optical configuration and computational time limit its further application. In addition, image self-focusing is a key step in the process of high-quality phase contrast imaging of samples. Multiple focuses are required to obtain sample information of different regions; thus, cell information cannot be obtained in real time. Current auto-focusing methods based on deep learning are faster and more accurate than conventional auto-focusing methods and do not damage living cells. Therefore, an auto-focusing phase contrast imaging method based on deep learning is proposed in this paper. This can realize auto-focusing phase contrast imaging without manual dyeing, focusing, and other steps. Moreover, a deep learning auto-focus phase contrast imaging (DLFP) network framework is designed for this imaging method, which can realize auto-focus phase contrast imaging quickly and accurately.

Methods Aiming at the problems of manual focusing and phase plate switching in phase contrast imaging of common microscopic images, we proposed an automatic focusing phase contrast imaging method based on deep learning, and designed a network framework based on this method. Considering that with the increase in the depth of the network, the gradient explosion and gradient disappearance occurred during back propagation, we added a residual block (ResNet) on the basis of U-Net to solve the training difficulty caused by network depth and improved the accuracy and precision of the network. Moreover, intensive modules were used to strengthen the reuse of feature information, and the simple, lightweight, Gather-Excite Net spatial attention mechanism was introduced. It can better mine the context information of images or feature map spaces, so that the network can selectively strengthen the useful feature information and suppress useless information, enhance network performance, and improve image resolution. Image acquisition was mainly divided into two parts. The first part was image acquisition, wherein the microscopic image was obtained by manually adjusting the focal length to 0, ± 4 , ± 8 , and $\pm 12 \mu\text{m}$. This is followed by the obtainment of the corresponding phase contrast image of the microscopic image by moving the circular Zernike phase plate. The second part involved expansion of the dataset by translation, rotation, and other methods. The network input and output image size was 256×256 . Approximately 29561 microscopic images at different defocusing distances were used as neural network datasets for different samples in network training, of which 95% and 5% were used as training sets and test sets, respectively.

Results and Discussions Experimental test results included random defocused microscopic images of three samples and the corresponding network output results. The high SSIM values of the test output results and real values prove the feasibility of auto-focusing phase contrast imaging method based on deep learning. At the same time, pixel values of DLFP network output images and Ground-truth on horizontal and vertical lines were compared in detail. Three different samples were randomly selected for analysis, and a high degree of coincidence could be achieved in both horizontal and vertical directions, which further proves that the network output image is highly similar to the real one. This also proves the accuracy of the DLFP network. To demonstrate the advantages of the network framework designed in this paper, it was compared with the traditional U-Net structure and the generative adversarial network (pix2pix). DLFP, U-Net, and pix2pix were trained using the same dataset. We found that the pix2pix experimental results contain a lot of noise,

whereas those of the U-Net network have lost some details. High SSIM values clearly indicate the advantages of the DLFP network framework. In practical applications, it is difficult to collect a large amount of data, and datasets are very important for deep learning. Therefore, in this paper, the generative adversarial network (pix2pix-GAN), which is often used to complete training with a small number of data sets, is used for experiments to further verify the effectiveness of auto-focusing phase contrast imaging method based on deep learning.

Conclusions A method based on DLFP network framework to transform defocused micrograph into focused phase contrast image was proposed. The experimental results show that this method can not only effectively improve the identification of cell structural features but also help to understand the phase contrast image in cell analysis and reduce the difficulty and cost of obtaining a phase contrast image. In addition, compared with the U-Net and generative adversarial networks, the high SSIM value shows the advantages of the proposed network framework. Finally, considering the fact that there is too little data in practical application, this paper adopts pix2pix-GAN to verify the validity of auto-focusing phase contrast imaging method based on deep learning, and the experimental results further prove its validity.

Key words medical optics; deep learning; phase contrast microscopy; automatic focusing; U-Net