

## 三维显微图像的分辨率评估方法及应用

罗喜亮<sup>1,2</sup>, 周舟<sup>1,2</sup>, 黄江枫<sup>1,2</sup>, 董香江<sup>1,2</sup>, 郑刚<sup>3\*</sup>, 付玲<sup>1,2</sup><sup>1</sup>华中科技大学武汉光电国家研究中心 Britton Chance 生物医学光子学中心, 湖北 武汉 430074;<sup>2</sup>华中科技大学工程科学学院生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074;<sup>3</sup>华中科技大学电子信息与通信学院, 湖北 武汉 430074

**摘要** 现有分辨率评估方法,如瑞利判据、阿贝判据、半峰全宽方法等都具有一定的应用局限性。本文采用基于切片傅里叶壳层相关(sFSC)的频域分辨率评估方法来评估系统的实际成像能力,该方法对分辨率的评估结果仅取决于图像质量,不受系统成像理论的影响,是一种客观、直接的计算方法。它将傅里叶壳层分成楔形壳层对,每个选择器都是一对镜像楔形,以改善由三维荧光成像各向异性带来的分辨率评估问题。实验结果表明,sFSC可作为一种无参考三维图像分辨率评估方法,且利用sFSC方法的分辨率结果所拟合的三维高斯点扩展函数(PSF)进行图像反卷积操作,能有效恢复图像纹理细节,提高图像信噪比,且相比于其他PSF估计方法,sFSC方法具有更好的性能。

**关键词** 生物光学; 无参考三维图像分辨率评估; 切片傅里叶壳层相关; 三维显微图像复原; 反卷积

中图分类号 Q334

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.0507015

## 1 引言

近年来,随着超分辨显微成像技术的发展日益成熟,发展一种认可度较高的成像分辨率评估方法是相关领域研究者讨论的一大热点问题,尤其是在纳米级荧光显微技术应用领域内,针对实际成像图像的分辨率评估问题的讨论愈发火热<sup>[1-4]</sup>。

传统的光学分辨率评估方法,如瑞利判据是通过测量图像中两个相邻结构之间的最小可分辨距离进行估计,但这种分辨率的定义过于主观,因为实际图像的最小可分辨距离是基于人眼的推测;也可以通过图像进行强度剖面分析来估计图像分辨率,如半峰全宽(FWHM)方法通常是对荧光小球进行成像并进行强度剖面分析,但在实际测量过程中,如果选取的两个相邻结构的激发光强度不一致或者形态结构并非标准球形,所得到的测量结果与实际成像分辨率存在一定的差异<sup>[5]</sup>。

现有的分辨率评估方法在应用于各类显微成像系统时的稳定性以及可重复性不够,易受实际成像条件的限制。对于激光扫描共聚焦显微镜<sup>[6]</sup>、双光子显

微镜<sup>[7]</sup>等常规显微镜来说,它们的点扩展函数(PSF)尺寸理论上是固定不变的,因此系统的分辨率是固定不变的,但实际成像分辨率仍受到如样品溶液折射率不匹配、抖动、环境噪声等因素的影响。对于结构光超分辨显微成像(SIM)系统<sup>[8]</sup>、受激发射损耗显微镜(STED)<sup>[9]</sup>、光激活定位显微镜(PALM)<sup>[10]</sup>和随机光学重建显微镜(STORM)<sup>[11]</sup>等超分辨显微系统,系统可通过PSF调制技术或单分子定位技术实现超分辨,这些系统的理论分辨率仅与实际所能达到的极限实验条件有关,如光漂白、光毒性、分子定位精度和图像重建技术等<sup>[12-13]</sup>,没有一个固定的分辨率数值,因此传统分辨率评估方法并不适用于所有系统。

如何精确、稳定地测量突破衍射限制下的系统分辨率一直是一个热点研究问题。1982年 van Heel等<sup>[14]</sup>和 Saxton等<sup>[15]</sup>提出了基于傅里叶环相关(FRC)的二维图像分辨率计算方法;随后在1986年,Harauz等<sup>[16]</sup>和 van Heel<sup>[17]</sup>提出一种从二维FRC方法直接推广至三维傅里叶壳层相关(FSC)计算方法。FRC/FSC方法最初在冷冻电镜对大分子复合物的单粒子重构评估中得到十分广泛的应

收稿日期: 2021-12-06; 修回日期: 2021-12-31; 录用日期: 2022-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(61890952)

通信作者: \*ZhengGang@hust.edu.cn

用,此后在 2013 年 Nieuwenhuizen 等<sup>[18]</sup>也将 FRC 方法用于评估 STED 系统成像的图像分辨率。

本文提出一种基于切片傅里叶壳层相关 (sFSC) 的分辨率评估方法。作为一种基于图像数据且不需要任何先验信息的分辨率评估方法<sup>[2,4]</sup>, sFSC 方法可直接用于衡量给定图像的细节分辨水平。利用 sFSC 方法计算得到分辨率,可以拟合出成像系统的三维 PSF,再结合图像的反卷积复原算法,理论上可以复原得到不损失原有图像信息且分辨率更高的样本图像。本文首先对 sFSC 方法的评估有效性进行验证,并将该方法应用到实际生物成像结果中,拟合出该成像系统的 PSF 后分别利用 Wiener<sup>[19]</sup>、Richardson-Lucy<sup>[20-21]</sup>、非负约束最小二乘法 (NNLS)<sup>[22-24]</sup>、Landweber (LW)<sup>[22-23]</sup> 和 Tikhonov 正则化 (TRIF)<sup>[25]</sup> 等反卷积算法对原始图像进行处理<sup>[26]</sup>,最后用无参考图像模糊评价 (BIBLE) 算法<sup>[27]</sup> 对图像复原效果进行评价。

## 2 基本原理

### 2.1 FRC/FSC

对于傅里叶空间中的相关性计算,二维情况下

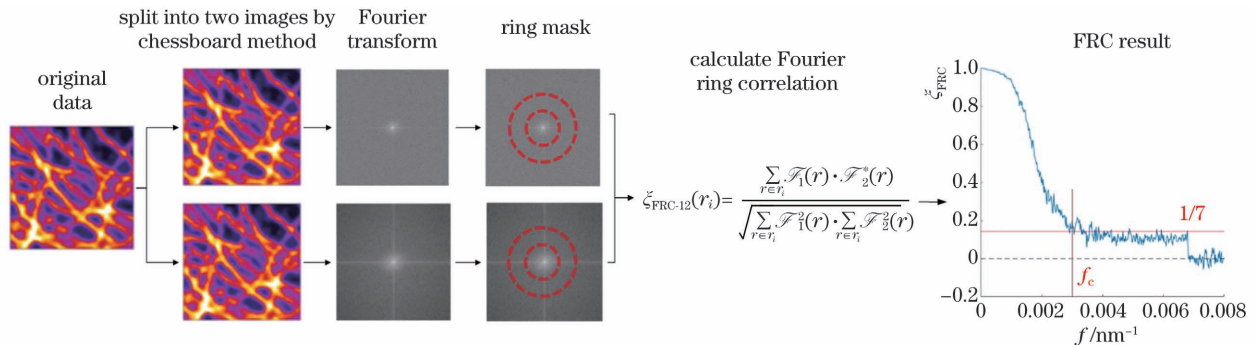


图 1 FRC 分辨率计算流程

Fig.1 Flow chart of FRC resolution calculation

在图 1 所示的 FRC 分辨率计算流程中,采用“棋盘法”获取单输入方式下的两幅图像<sup>[4]</sup>,分别进行快速傅里叶变换得到其频谱图,再利用半径变化的环状掩模版获取对应频率环内的强度值进行相关性计算,直至所有的频率被取完,得出 FRC 随频率变化的曲线,该曲线与 1/7 阈值的交点频率即为测试图像的截止频率,图像分辨率为截止频率的倒数。

### 2.2 sFSC

通过荧光显微成像系统得到的图像分辨率是各向异性的,一般而言单物镜成像下得到的横向分辨率远优于轴向分辨率(数值比为 1/3~1/2)<sup>[29]</sup>,因此

通常使用 FRC 方法<sup>[14-15]</sup>,三维情况下使用 FSC 方法<sup>[16-17]</sup>,它们的定义非常相近,其原理是对两幅具有独立噪声的图像在同一频域区域进行归一化互相关直方图测度计算。FRC/FSC 在频域中的计算过程如下:将两幅图像的空间频谱划分成多个单元,在极化频域图像中产生一系列同心环/壳,计算每个环/壳的互相关值并得到 FRC/FSC 直方图。FRC 分辨率计算流程如图 1 所示,定义式<sup>[14-17]</sup>为

$$\xi_{FRC-12}(r_i) = \frac{\sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_1(r) \cdot \mathcal{F}_2^*(r)}{\sqrt{\sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_1^2(r) \cdot \sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_2^2(r)}}, \quad (1)$$

式中: $\mathcal{F}_1$  和  $\mathcal{F}_2$  为两幅图像的傅里叶变换; $r_i$  为第  $i$  个频率环/壳层; $\xi_{FRC-12}$  为图像在频域内的互相关值; $r$  为计算所取像素点频率值所在的环半径; $\mathcal{F}_2^*(r)$  为  $\mathcal{F}_2$  的共轭。FRC/FSC 的图像分辨率是根据直方图定义的,在该直方图中,将相关值减小到预设阈值以下的频率定义为截止频率,其倒数即为图像分辨率。根据 FRC 曲线计算分辨率的方法是通过一个阈值条件获取截止频率,阈值条件在现有研究中有多种选择,通常采用经验值  $\xi_{FRC} = 1/7$ <sup>[28]</sup>。

将 FRC 简单推广至三维 FSC 分辨率评估并直接应用于荧光成像系统中是不准确的<sup>[3]</sup>。为了解决由三维图像分辨率各向异性带来的问题,必须对横向与轴向所取的壳层模型进行优化和修正,同时对所计算得到的分辨率值进行采样频率折算。

与锥形 FSC 模型<sup>[30]</sup>类似,sFSC 方法是一种基于 FSC 的三维图像分辨率评估方法,计算模型参数示意图<sup>[4]</sup>见图 2(a),其壳层选取模型是对称的双楔形[图 2(b)],单次频域壳层计算过程如图 2(c)所示。双楔形模型绕中心轴以一个固定旋转角度步进式旋转 360°,从而得到各方位角对应的频域壳层相关性结果,计算公式<sup>[4,28]</sup>为

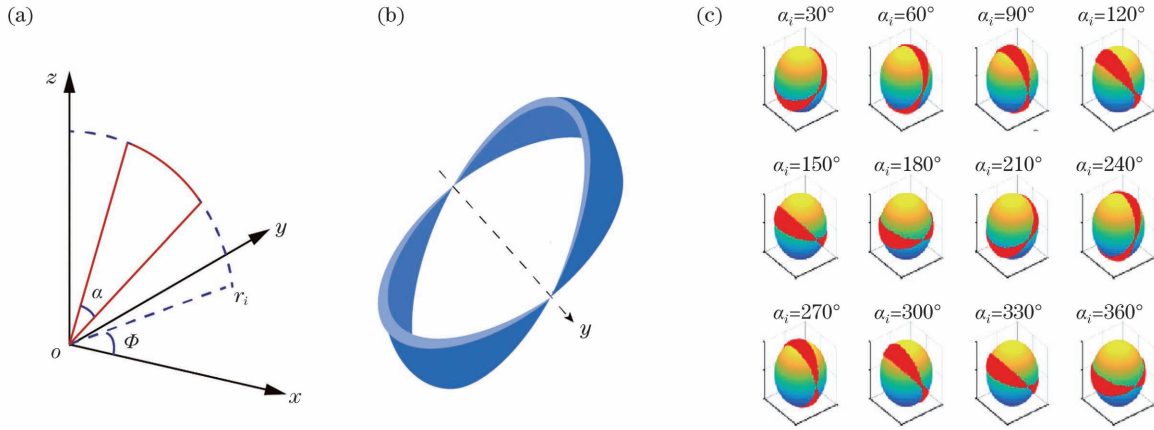


图 2 sFSC 方法壳层选择器工作原理图。(a)模型参数的空间示意图;(b)双楔形对称选取模型;(c)单次频域壳层 sFSC 选择器工作流程仿真图

Fig. 2 Working principle diagram of sFSC method's shell selector. (a) Selector model parameters in spatial diagram; (b) double wedge symmetric selection model; (c) sFSC selector workflow simulation diagram at single frequency shell domain

$$\xi_{\text{sFSC-12}}(r_i, \alpha_i) = \frac{\sum_{r \in r_i, \alpha \in \alpha_i} \mathcal{F}_1(r, \alpha, \varphi) \cdot \mathcal{F}_2^*(r, \alpha, \varphi)}{\sqrt{\sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_1^2(r, \alpha, \varphi) \cdot \sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_2^2(r, \alpha, \varphi)}}, \quad (2)$$

式中:  $\alpha$  为楔形壳层选取模型的俯仰角, 决定了壳层选取的厚度;  $\alpha_i$  为壳层与中心轴平面的夹角;  $\varphi$  为旋转中心轴与坐标轴  $x$  的夹角。通常选用  $x$  或  $y$  轴作为中心旋转轴, 当  $\alpha = 2\pi$  时, 利用 sFSC 与 FSC 方法选取的壳层相同。

此外, 需要对 sFSC 曲线中的频率轴进行校正, 即根据由不同俯仰角  $\alpha_i$  计算得到的分辨率进行频率轴修正, 改善三维图像中由采样频率不同带来的分辨率各向异性问题。如果不进行校正, 则利用 sFSC 方法在  $\alpha_i \neq n\pi$  的方位处计算出的分辨率都明显高于理论分辨率值。

修正因子<sup>[4]</sup>定义为

$$K(\alpha_i) = Z \cdot |\sin \alpha_i|, \quad (3)$$

式中:  $Z$  为横向采样率与轴向采样率的比值。

### 2.3 BIBLE 算法

BIBLE 算法是一种专门评价图像模糊程度的图像质量评价算法, 其评价结果和人类主观质量评分具有较高的一致性<sup>[31]</sup>, 在 STED 显微镜图像模糊评价中具有优秀表现<sup>[32]</sup>。BIBLE 算法首先将图像分块, 再计算图像不同阶数的切比雪夫矩。不同阶数的切比雪夫矩代表图像的不同频率成分, 高阶矩的能量越高, 图像高频信息越多, 包含的细节越多, 表示图像更清晰。0 阶矩代表图像的直流分量, 不包含细节或纹理信息, 因此取非 0 阶矩的能量平方

和表征图像所包含的高频信息, 再利用图像块方差和视觉显著图进行加权归一化, 得到图像清晰指数, 具体计算公式<sup>[31]</sup>为

$$S_{\text{BIBLE}} = \frac{\sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^Q W_{ij} \cdot E_{ij}}{\sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^Q W_{ij} \cdot \sigma_{ij}^2}, \quad (4)$$

$$E_{ij} = \sum_{p=0}^m \sum_{q=0}^n (T_{pq})^2 - (T_{00})^2, \quad (5)$$

$$T_{pq} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} t_p(x; M) t_q(y; N) f(x, y), \quad (6)$$

式中:  $S_{\text{BIBLE}}$  为 BIBLE 值;  $P, Q$  为图像块数量;  $E_{ij}$  为非 0 阶切比雪夫矩的能量平方和;  $T_{pq}$  为  $pq$  阶矩;  $m$  和  $n$  为最高阶数;  $T_{00}$  为 0 阶矩;  $t_p(x; M)$  和  $t_q(y; N)$  为归一化切比雪夫核(归一化切比雪夫核<sup>[33]</sup>的计算细节此处不讨论);  $f(x, y)$  表示大小为  $M \times N$  的图像;  $\sigma_{ij}^2$  为图像块方差, 用于消除图像块间的差异;  $W_{ij}$  为图像块显著图, 作为  $E_{ij}$  的权重, 用于模拟人对图像质量的感知过程。  $S_{\text{BIBLE}}$  值越大, 图像越清晰。

## 3 分析与讨论

### 3.1 sFSC 方法有效性分析

为了对 sFSC 方法的有效性进行分析, 现将其与显微光学系统常用的分辨率评估方法——FWHM 方法及系统理论方法计算得到的分辨率进行对比。搭建了一套双光子显微成像系统, 系统采用的激光波长为 800 nm, 物镜为 OLYMPUS 水镜, 倍率为 25 $\times$ , 数值孔径(NA)为 1.05, 根据双光子



系统理论分辨率计算公式<sup>[34]</sup>：

$$R_{xy} = 2\sqrt{\ln 2} \times \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2}NA^{0.91}} (NA > 0.7), \quad (7)$$

$$R_{xz} = 2\sqrt{\ln 2} \times \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[ \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right], \quad (8)$$

本文使用的双光子系统的横向理论分辨率为 0.292 μm, 轴向理论分辨率为 0.979 μm。使用该系

统对 0.1 μm 直径的荧光小球进行三维成像, 使用 ImageJ 软件进行小球剖面强度分析, 结果如图 3(a) 所示; 并使用 MATLAB 软件进行高斯曲线拟合得到其 FWHM 的分辨率结果, 如图 3(b) 所示; 同时截取该小球对应的三维体积空间作为 sFSC 方法的输入, 计算其随中心轴夹角 α<sub>i</sub> 变化的对应截止频率, 得到图 3(c) 所示的分辨率随角向 α<sub>i</sub> 变化的结果。利用两种方法得到的横向与轴向分辨率结果如表 1 所示。

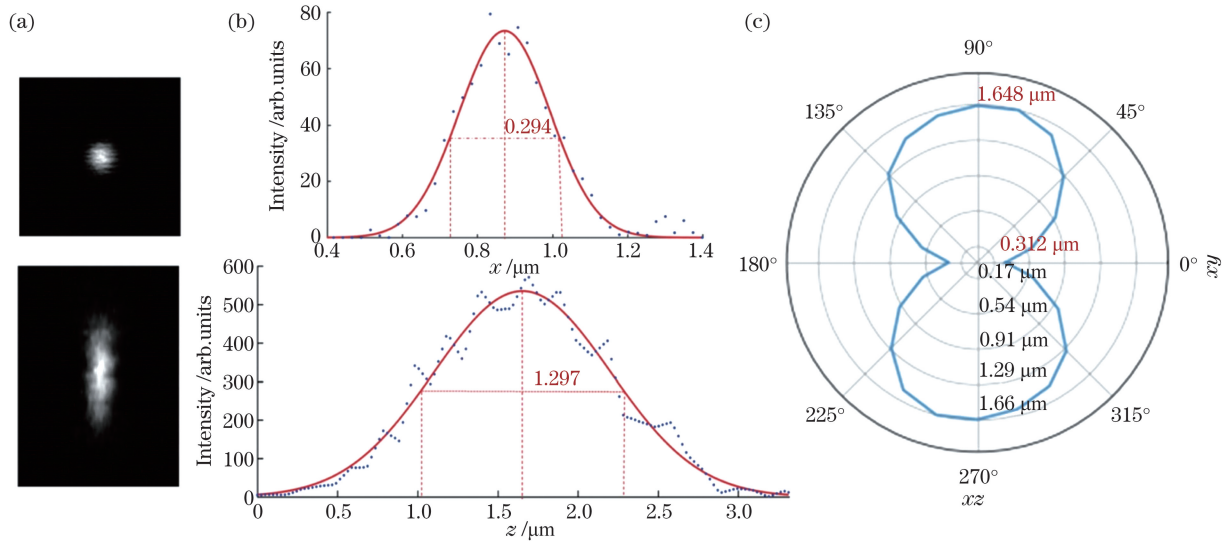


图 3 0.1 μm 直径荧光小球的分辨率评估结果。(a) 荧光小球强度剖面图; (b) FWHM 方法的强度剖面高斯拟合结果; (c) sFSC 方法计算结果(分辨率随角度变化曲线)

Fig. 3 Resolution evaluation results of fluorescent balls with 0.1 μm diameter. (a) Intensity profile of the fluorescent balls; (b) Gaussian fitting results of intensity profile by FWHM method; (c) angle-dependent resolution curve calculated by sFSC method

表 1 理论计算、FWHM 与 sFSC 方法的分辨率评估结果比较

Table 1 Comparison of resolution results among theoretical calculation, FWHM, and sFSC methods unit: μm

Method	Lateral resolution	Axial resolution
Theoretical	0.292	0.979
FWHM	0.294	1.297
sFSC	0.312	1.648

从表 1 可以看出, 利用 sFSC 方法评估的横向分辨率结果与理论计算和 FWHM 方法的结果十分接近, 分别相差 6.8% 和 6.1%, 在可接受误差范围内, 但在轴向分辨率数值上相差较大。分析可知, 理论计算得到的分辨率是完全基于理想情况的, 而 FWHM 方法测量得到的分辨率也仅是小球所在感兴趣区(ROI)进行强度剖面曲线拟合, 所考虑的有效信息有限, 而将小球成像序列整体作为分辨率计算输入时, 荧光小球所处的琼脂糖环境以及成像时存在的系统噪声和轴向错位等都是分辨率测量结

果的重要影响因素, 这些因素也正是显微系统实际成像能力的表征之一, 在实际成像时这些因素均是成像分辨率的关键影响因素, FWHM 方法则忽略了上述客观因素对成像过程的影响, 导致该方法的鲁棒性较差。sFSC 方法是将整个输入图像的所有像素内包含的信息都作为计算依据, 它对上述因素给系统分辨率带来的影响极其敏感。综上所述, sFSC 方法对系统实际成像能力的评估是有效的, sFSC 计算结果可以用于表征成像系统在实际情况下的分辨能力。

### 3.2 sFSC 方法在荧光显微图像反卷积中的应用

反卷积算法的整体思路为: 先对成像系统的 PSF 进行评估, 使其尽量接近真实值; 再利用非盲反卷积的方法对图像进行复原。对显微图像来说, 引起图像降质最严重的因素就是系统物镜衍射, 而系统的 PSF 或者 OTF 则可用于表征图像降质的过程<sup>[35]</sup>。基于 PSF 的计算显微图像复原方法, 是通过人为输入调控系统 PSF, 将得到的初始图像与 PSF

进行解卷积操作,进而从初始图像中恢复出高质量图像<sup>[36]</sup>。因此,要想更好地复原显微图像,对系统实际成像 PSF 的精确估计至关重要,这决定着反卷积算法复原图像的效果。

前文已对 sFSC 方法的分辨率评估能力进行了

有效性验证,因此可以利用 sFSC 方法对系统实际成像图像进行分辨率评估,并基于该计算结果拟合图像的三维高斯 PSF,并将其作为反卷积算法的输入,以实现原始图像的复原并提高图像质量。基于 sFSC 分辨率评估方法的图像复原流程如图 4 所示。

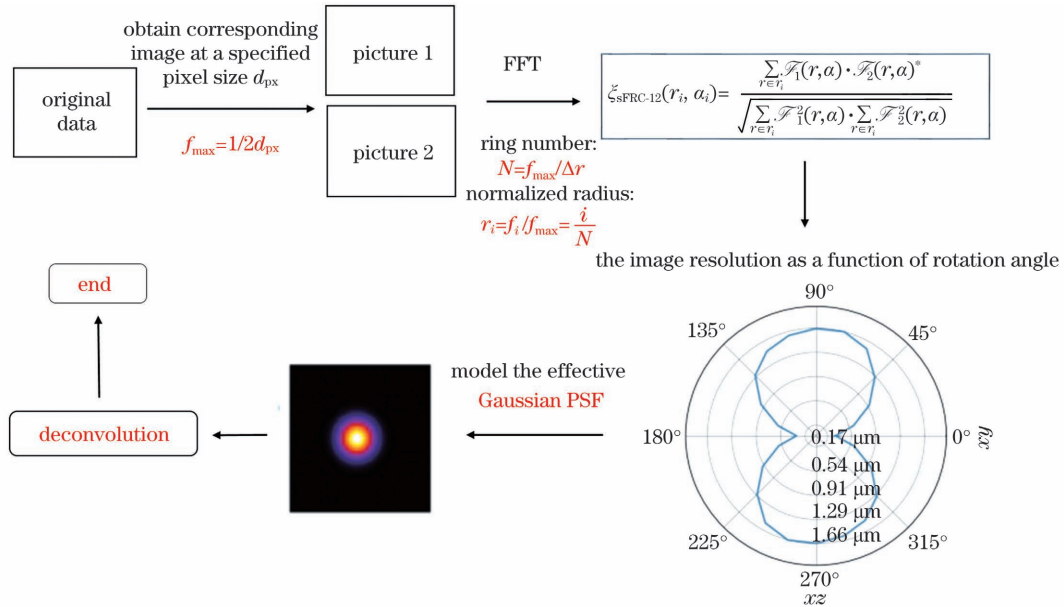


图 4 基于 sFSC 分辨率评估方法的图像复原流程图

Fig. 4 Flow chart of image restoration based on sFSC resolution evaluation method

首先,利用 sFSC 方法[ZEISS 商业共聚焦系统 ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ,  $63\times$ ,  $NA = 1.46$ ,  $1.01 \text{ AU}$ , 其中 AU 为理论计算所得的艾里斑大小)]对小鼠肾标准片进行成像并评估其分辨率,结果如图 5(a)的左图所示;然后,将计算得到的分辨率结果拟合成三维高斯 PSF(横向分辨率为  $0.1984 \mu\text{m}$ ,轴向分辨率为  $0.6792 \mu\text{m}$ ),并作为 PSF 输入对原图像进行维纳滤

波反卷积图像复原,复原前、后的结果对比如图 5(b)所示,复原后利用 sFSC 方法得到的分辨率评估结果如图 5(a)右图所示。图 5(c)所示为图 5(b)中方框区域放大图内虚线的强度剖面曲线拟合结果。可以看出,经过复原后图像的可分辨细节更加丰富了,图像分辨率与图像质量都得到了提升。

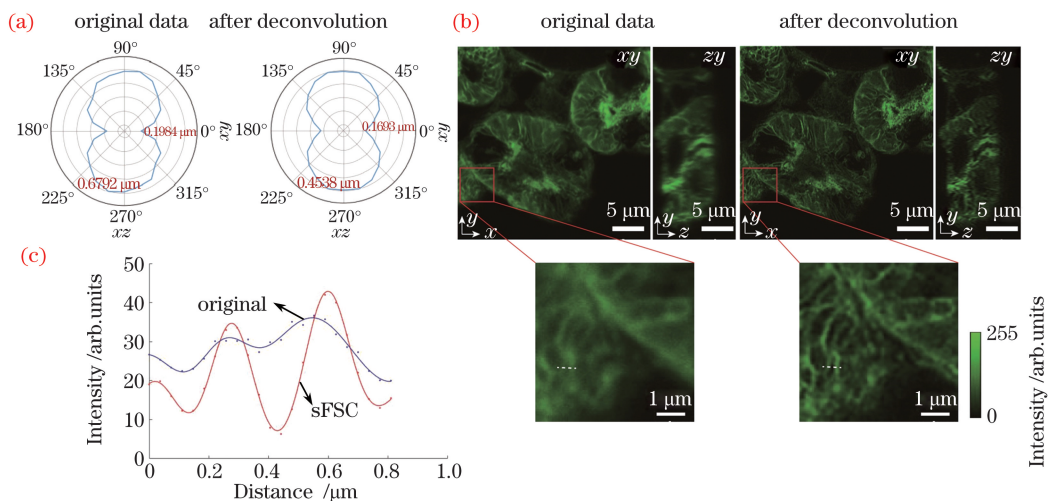


图 5 复原前、后分辨率及图像质量对比。(a) sFSC 方法计算得到的分辨率曲线;(b) 维纳滤波反卷积复原前、后对比;(c) 图 5(b)中 ROI 的强度值拟合曲线

Fig. 5 Comparison of resolution and image quality before and after restoration. (a) Resolution curves using sFSC method; (b) image comparison before and after Wiener deconvolution; (c) intensity profile curves of ROI in Fig. 5(b)

为了进一步验证 sFSC 方法应用于生物显微图像复原时的有效性和鲁棒性,对比了利用 sFSC 方法拟合的 PSF(简称为 sFSC-PSF)与系统理论计算 PSF(简称为 T-PSF)和实测小球计算 FWHM 方法拟合的 PSF(简称为 O-PSF)在反卷积算法中的图像复原效果——分别将相应的 PSF 作为反卷积算法的输入,以对比复原图像的质量。为了保

证实验结果的可靠性,随机生成了几组不同尺寸的 PSF(简称为 R-PSF)反卷积输入作为对照实验组,并使用 BIBLE 算法对各类方法的复原结果进行评分。图 6 所示为对应 PSF 输入维纳滤波反卷积复原后三维图像结果对比,表 2 为对应 PSF 输入图像复原后最大值投影图的 BIBLE 算法评分结果。

表 2 不同 PSF 大小维纳滤波反卷积复原结果的最大值投影图 BIBLE 评分

Table 2 BIBLE score of the maximum projection images reconstructed by Wiener deconvolution on different PSF size

PSF	Original data	T-PSF	R-PSF1	R-PSF2	O-PSF	sFSC-PSF
Size /( $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ )		0.204×0.458	0.18×0.55	0.22×0.60	0.25×0.60	0.198×0.679
Score	4.04	4.94	5.33	5.09	4.82	<b>5.40</b>

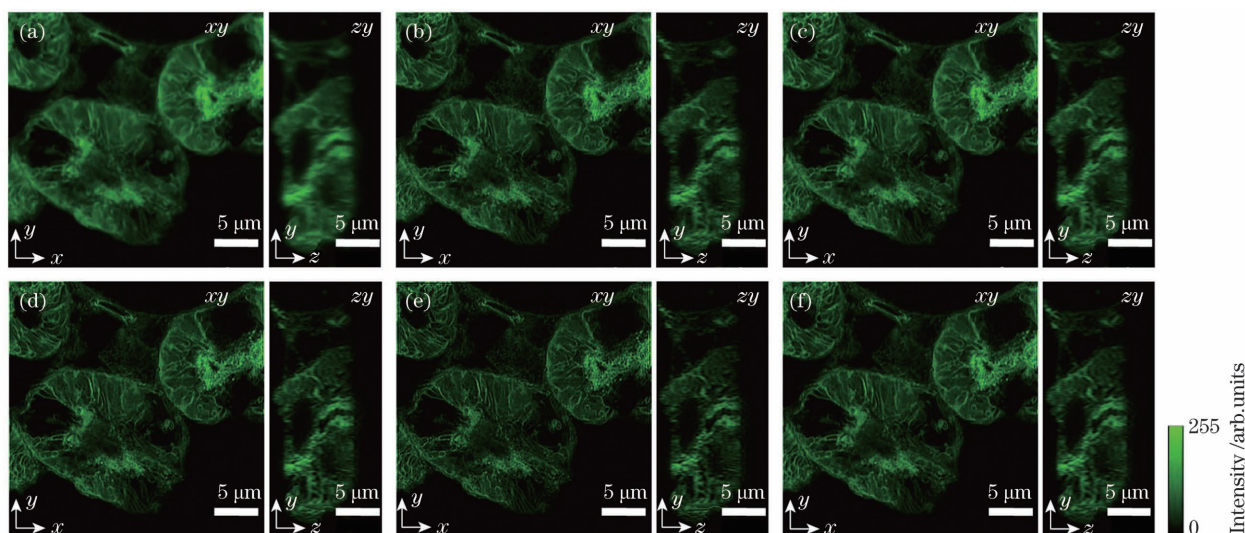


图 6 不同 PSF 的维纳反卷积复原结果对比。(a)Original data;(b)T-PSF;(c)R-PSF1;(d)R-PSF2;(e)O-PSF;(f)sFSC-PSF

Fig. 6 Comparison of images reconstructed by Wiener deconvolution under different PSF. (a) Original data; (b) T-PSF; (c) R-PSF1; (d) R-PSF2; (e) O-PSF; (f) sFSC-PSF

由表 2 的评分结果可知:将 sFSC-PSF 作为输入的维纳滤波反卷积复原效果最优,其次为 R-PSF (0.18×0.55)输入的复原效果;PSF 的横向、轴向分辨率越接近 sFSC 方法分辨率评估结果,其复原效果越好,而将理论计算和实际小球测量 FWHM 所得 PSF 作为输入时复原效果并不理想,但相较于原图像质量仍有所提高。

此外,将这些复原结果用 sFSC 方法进行分辨

表 3 不同 PSF 大小维纳滤波反卷积结果的 sFSC 方法分辨率评估结果

Table 3 sFSC resolution evaluation results of images reconstructed with Wiener deconvolution on different PSF size

PSF	Original data	T-PSF	R-PSF1	R-PSF2	O-PSF	sFSC-PSF
Size /( $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ )		0.204×0.458	0.18×0.55	0.22×0.60	0.25×0.60	0.198×0.679
Lateral resolution / $\mu\text{m}$	0.1984	0.1737	0.1707	0.1763	0.1814	<b>0.1693</b>
Axial resolution / $\mu\text{m}$	0.6792	0.4591	0.4610	0.4657	0.5167	<b>0.4538</b>

率评估,结果如表 3 所示。由分辨率结果可知:sFSC-PSF 作为反卷积算法输入时,其横向、轴向分辨率最优,其次为 R-PSF(0.18×0.55)输入的分辨率结果;sFSC 方法的分辨率评估结果与 BIBLE 图像质量评分结果一致,说明将 sFSC 方法拟合 PSF 作为反卷积输入能有效提升图像复原质量和分辨率,与原始图像相比,其 BIBLE 评分提升了 33.7%,横向分辨率提升了 14.5%,轴向分辨率提升了 33.2%。



为了充分说明 sFSC-PSF 在反卷积图像复原算法中的效果,对其他反卷积算法,如 Richardson-Lucy (RL)、非负约束最小二乘法 (NNLS)、Landweber (LW)和 Tikhonov 正则化 (TRIF)也采

用了上述步骤,同一反卷积复原算法中除 PSF 输入外的其他参数相同,其反卷积复原结果沿  $z$  向的最大值投影如图 7 所示,相应的 BIBLE 评价分数和 sFSC 分辨率评估结果如表 4 和表 5 所示。

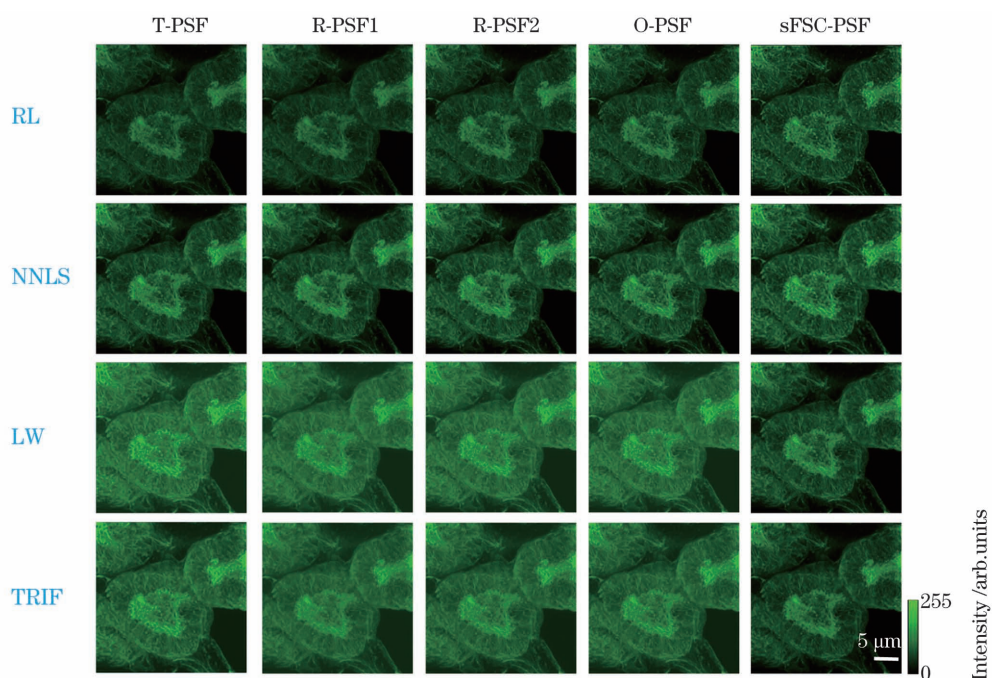


图 7 不同 PSF 大小在不同反卷积算法中的复原结果沿  $z$  方向的最大值投影图

Fig. 7 Maximum projection images reconstructed by different deconvolution methods on different PSF size

从图 7 可以看到,在不同反卷积算法下,将使用 sFSC 方法评估原图分辨率拟合生成的三维有效 PSF 作为输入时,其  $z$  向最大值投影图的对比度以

及整体亮度视觉效果都优于其他 PSF 作为输入的复原结果。通过视觉直观评价可以发现,使用 RL 算法进行图像反卷积复原时的投影效果最佳。

表 4 不同 PSF 在不同反卷积算法中复原结果的最大值投影图 BIBLE 评分

Table 4 BIBLE score of the maximum projection images reconstructed by different deconvolution methods on different PSF

PSF	T-PSF	R-PSF1	R-PSF2	O-PSF	sFSC-PSF
Size / ( $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ )	0.204 × 0.458	0.18 × 0.55	0.22 × 0.60	0.25 × 0.60	0.198 × 0.679
BIBLE score					
RL	3.94	4.18	3.78	3.56	<b>4.38</b>
NNLS	2.85	2.95	2.68	2.50	<b>3.22</b>
LW	2.86	3.19	2.83	2.66	<b>3.38</b>
TRIF	2.94	3.36	2.93	2.70	<b>3.51</b>

表 5 不同 PSF 在不同反卷积复原结果的 sFSC 方法分辨率评估结果

Table 5 sFSC resolution evaluation results of images reconstructed by different deconvolution methods on different PSF

PSF	T-PSF	R-PSF1	R-PSF2	O-PSF	sFSC-PSF
Size / ( $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ )	0.204 × 0.458	0.18 × 0.55	0.22 × 0.60	0.25 × 0.60	0.198 × 0.679
Lateral resolution / $\mu\text{m}$					
RL	0.1941	0.1820	0.1986	0.2047	0.1725
NNLS	0.1912	0.1851	0.1969	0.2126	0.1833
LW	0.1813	0.1705	0.1904	0.2097	0.1824
TRIF	0.1823	0.1665	0.1916	0.2125	0.1665
Axial resolution / $\mu\text{m}$					
RL	0.6229	0.6178	0.6355	0.6409	0.6160
NNLS	0.5362	0.5329	0.5283	0.5337	0.5307
LW	0.5309	0.4999	0.5269	0.5381	0.5013
TRIF	0.5265	0.5035	0.5208	0.5347	0.5011

从表 4 和表 5(加粗数据皆为该行的最优结果)不难发现:使用 BIBLE 方法和 sFSC 方法对复原结果进行评价的结果与人眼主观感受基本一致;且在不同的反卷积算法中,评分结果表现趋势与分辨率评估结果的变化趋势一致,与此前利用维纳滤波反卷积复原得到的结论完全吻合。

观察表 5 所示的数据可以发现,在使用 LW 算法进行图像复原后,其分辨率评估结果出现了一组“反趋势”数据,即 R-PSF( $0.18 \mu\text{m} \times 0.55 \mu\text{m}$ )作为输入时的横向、轴向分辨率结果均优于 sFSC-PSF 作为输入时的结果。针对这个现象,分别对这

两个 PSF 作为 LW 反卷积算法输入时的图像复原结果进行基于 sFSC 方法的分辨率计算并对其结果曲线进行对比,如图 8 所示。不难发现,在 R-PSF( $0.18 \mu\text{m} \times 0.55 \mu\text{m}$ )的复原结果中,其  $z$  向分辨率曲线发生非光滑骤减,这可能是由于:根据 sFSC 方法计算的原图像分辨率为  $0.198 \mu\text{m} \times 0.679 \mu\text{m}$ ,当拟合输入的 PSF 数值远小于实际图像的分辨率结果时,会出现过度锐化、伪影等现象,这会引起其分辨率的非光滑骤变,再次印证了成像系统 PSF 的拟合准确程度对反卷积图像复原效果有着显著且直接的影响。

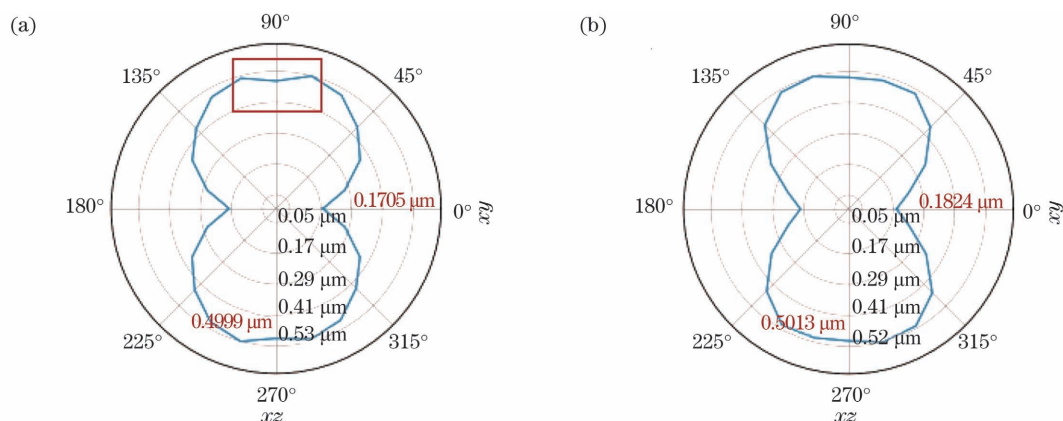


图 8 R-PSF 和 sFSC-PSF 在 LW 反卷积复原结果的 sFSC 分辨率曲线。(a)R-PSF( $0.18 \mu\text{m} \times 0.55 \mu\text{m}$ );(b)sFSC-PSF( $0.198 \mu\text{m} \times 0.679 \mu\text{m}$ )

Fig. 8 sFSC resolution curves of LW deconvolution with R-PSF and sFSC-PSF input. (a) R-PSF ( $0.18 \mu\text{m} \times 0.55 \mu\text{m}$ ); (b) sFSC-PSF ( $0.198 \mu\text{m} \times 0.679 \mu\text{m}$ )

## 4 结 论

采用基于 sFSC 的方法来评估三维显微图像的分辨率,且通过在自行搭建的双光子显微成像系统上对直径为  $0.1 \mu\text{m}$  的荧光小球进行成像,对比 sFSC 方法与显微光学系统理论计算方法以及常用的分辨率评估方法——FWHM 方法的评估结果,验证了基于 sFSC 的分辨率评估方法的有效性。在图像复原工作中,对系统 PSF 的估计准确程度是反卷积图像复原质量的关键影响因素,通过实验证明,相较于其他传统 PSF 估计方法,基于 sFSC 分辨率计算方法拟合的三维 PSF 对不同反卷积算法的图像复原后图像质量和三维分辨率均有一定提升,在三维显微图像复原方面具有良好的应用前景。但是,仅对 PSF 的估计优化对反卷积算法的复原图像质量提升有限,且在不同反卷积算法中图像复原效果仍不完全相同,如维纳滤波反卷积复原分辨率及图像质量最优,但存在严重的振铃效应,因此需要对反卷积算法进行进一步研究,使得针对三维显微图

像的复原效果达到最优。

## 参 考 文 献

- [1] Tortarolo G, Castello M, Diaspro A, et al. Evaluating image resolution in stimulated emission depletion microscopy[J]. *Optica*, 2018, 5(1): 32-35.
- [2] Nieuwenhuizen R P J, Lidke K A, Bates M, et al. Measuring image resolution in optical nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(6): 557-562.
- [3] Banterle N, Bui K H, Lemke E A, et al. Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy [J]. *Journal of Structural Biology*, 2013, 183(3): 363-367.
- [4] Koho S, Tortarolo G, Castello M, et al. Fourier ring correlation simplifies image restoration in fluorescence microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3103-3112.
- [5] Barentine A E S, Schroeder L K, Graff M, et al. Simultaneously measuring image features and resolution in live-cell STED images[J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(6): 951-956.



- [6] Sheppard C J, Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscope[J]. *Journal of Microscopy*, 1981, 124(2): 107-117.
- [7] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [8] Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy [J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1332-1336.
- [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] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (10): 793-796.
- [12] 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.  
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.
- [13] Li Y Z, Li C K, Hao X, et al. Review and prospect for single molecule localization microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(24): 240002.  
李雨竹, 李传康, 郝翔, 等. 基于单分子定位成像技术的研究及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(24): 240002.
- [14] van Heel M, Keegstra W, Schutter W, et al. Arthropod hemocyanin structures studied by image analysis[J]. *Life Chemistry Reports*, 1982(s1): 69-73.
- [15] Saxton W O, Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein[J]. *Journal of Microscopy*, 1982, 127(2): 127-138.
- [16] Harauz G, van Heel M. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction [J]. *Optik*, 1986, 73: 146-156.
- [17] van Heel M. Similarity measures between images [J]. *Ultramicroscopy*, 1987, 21(1): 95-100.
- [18] Nieuwenhuizen R, Lidke K A, Bates M, et al. Measuring image resolution in optical nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(6):557-567.
- [19] Wiener N. Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series[M]. Cambridge: The MIT Press, 1949.
- [20] Lucy L B. An iterative technique for the rectification of observed distributions [J]. *The Astronomical Journal*, 1974, 79: 745-754.
- [21] Holmes T J, Liu Y H. Richardson-Lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing[J]. *Applied Optics*, 1989, 28(22): 4930-4938.
- [22] Landweber L. An iteration formula for fredholm integral equations of the first kind [J]. *American Journal of Mathematics*, 1951, 73(3): 615-624.
- [23] Wu S F. Equivalent sources using HELS[M]//The helmholtz equation least squares method. *Modern acoustics and signal processing*. New York: Springer, 2014: 145-162.
- [24] Dines K, Kak A. Constrained least squares filtering [J]. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 1977, 25(4): 346-350.
- [25] Tikhonov A N. Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method [J]. *Observatory*, 1962, 21: 168-170.
- [26] Sage D, Donati L, Soulez F, et al. DeconvolutionLab 2: an open-source software for deconvolution microscopy [J]. *Methods*, 2017, 115: 28-41.
- [27] Li L D, Lin W S, Wang X S, et al. No-reference image blur assessment based on discrete orthogonal moments [J]. *IEEE Transactions on Cybernetics*, 2016, 46(1): 39-50.
- [28] van Heel M, Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria[J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 151(3): 250-262.
- [29] Wang X, Tu S J, Liu X, et al. Advance and prospect for three-dimensional super-resolution microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58 (22): 2200001.  
王潇, 涂世杰, 刘鑫, 等. 三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2200001
- [30] Diebolder C A, Faas F G A, Koster A J, et al. Conical Fourier shell correlation applied to electron tomograms[J]. *Journal of Structural Biology*, 2015, 190(2): 215-223.
- [31] Mittal A, Moorthy A K, Bovik A C. No-reference image quality assessment in the spatial domain[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2012, 21 (12): 4695-4708.
- [32] Koho S, Fazeli E, Eriksson J E, et al. Image quality ranking method for microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28962.
- [33] Mukundan R. Some computational aspects of discrete

- orthonormal moments [J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2004, 13(8): 1055-1059.
- [34] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [35] Liu Y. The research of the deconvolution algorithm based on 3D Gauss PSF in COSM [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.
- 刘莹. COSM 中基于三维高斯点扩展函数的解卷积算法的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [36] Liu X, Kuang C F, Liu X, et al. Research progress of computational microscopy imaging based on point spread function engineering [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(18): 1811008.
- 刘鑫, 匡翠方, 刘旭, 等. 基于点扩散函数工程的计算显微成像研究进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(18): 1811008.

## Resolution Evaluation Method and Applications of 3D Microscopic Images

Luo Xiliang<sup>1,2</sup>, Zhou Zhou<sup>1,2</sup>, Huang Jiangfeng<sup>1,2</sup>, Dong Xiangjiang<sup>1,2</sup>,  
Zheng Gang<sup>3\*</sup>, Fu Ling<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;

<sup>2</sup> MoE Key Laboratory for Biomedical Photonics, School of Engineering Sciences, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;

<sup>3</sup> School of Electronic Information and Communications, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

### Abstract

**Objective** Selecting an appropriate method to analyze images obtained with similar imaging systems and with similar image resolution values but clearly different image quality is challenging. Traditional resolution evaluation methods, such as Rayleigh criterion, Abbe criterion, and FWHM, are not sufficiently reproducible to evaluate the resolution of an actual image and are not universal among different systems. Theoretically, the point spread function (PSF) size of laser scanning confocal and two-photon microscopes is fixed; however, the actual imaging resolution is affected by many other factors. SRM systems, such as SIM, STED, PALM, and STORM, achieve super-resolution by PSF modulation technology or single molecule positioning technology. However, the theoretical resolution of these systems is only related to the limited experimental conditions that can be achieved in practice, such as photobleaching, phototoxicity, and molecular positioning accuracy. Thus, there is no fixed resolution. Therefore, traditional resolution evaluation methods cannot be applied to all systems simultaneously. Here, we adopt a resolution evaluation method based on sectioned Fourier shell correlation (sFSC), which is an image-based method that does not require any *a priori* information and can be directly used to calculate the resolution of a given image. We expect that this method will be used to evaluate and compare the imaging capabilities of different imaging systems and can be applied to optimize image restoration.

**Methods** We adopt a resolution evaluation method based on frequency domain correlation. First of all, we use the checkerboard method to divide the original image by pixel into two groups that have the same details but uncorrelated noise. Then, we apply a Fourier transform to obtain the spectrum diagram of all the images. After that, the corresponding strength values in the wedge shell selector are substituted to a correlation calculation formula until all frequency shells and azimuths are completed. In the next step, the cutoff frequency of each azimuth angle is calculated. Here, the cutoff frequency is defined as the frequency when the correlation value drops to 1/7. Finally, the resolution result is calculated according to the reciprocal of the cutoff frequency under each azimuth angle. Then, the sFSC resolution curve, which is azimuth angle dependent, is plotted. In addition, for image restoration, 3D effective PSF can be modeled with the sFSC resolution result as the input to a deconvolution algorithm (Fig. 4).

**Results and Discussions** As a resolution evaluation method, sFSC is very sensitive to the image signal-to-noise (SNR) as well as all sample and system dependent factors; consequently, sFSC can accurately calculate the actual imaging resolution of the system. Compared with the results of FWHM, a commonly used resolution measurement

method, the resolution results calculated by the proposed sFSC method can better reflect the overall quality of the image input, not just the ROI quality (Fig. 3). To obtain better microscopic image restoration, it is very important to accurately model the imaging PSF of the target system. Given the sensitivity of the sFSC method to image resolution, theoretically the PSF fitted according to its resolution results will be closer to the system imaging PSF. In Wiener filtering deconvolution image restoration, the lateral and the axial resolution of the reconstructed image are improved by 14.5% and 33.2%, respectively (Fig. 5, Tables 2 and 3). Compared with the PSF deconvolution results obtained by FWHM measurement and theoretical resolution calculation, the PSF based on sFSC fitting can better recover image details and improve image signal-to-noise ratio when used as the input to the deconvolution algorithm (Figs. 6 and 7). According to the evaluation results of a blind image blur evaluation algorithm and the proposed sFSC method on a reconstructed image, we find that, compared with traditional PSF fitting methods, after sFSC-based deconvolution restoration both the image quality and resolution have improved (Tables 4 and 5).

**Conclusions** Considering a two-photon imaging system as an example, this paper verifies the effectiveness of the sFSC-based 3D image resolution evaluation method by comparing the results of the sFSC method with the theoretical calculation method and FWHM. Regarding image restoration, considering a confocal microscopic system as an example, the 3D PSF model obtained using sFSC results can be used for deconvolution image restoration. This restoration process can effectively retain the texture details and improve the 3D resolution. In Wiener filtering deconvolution image restoration, the lateral and the axial resolution of the reconstructed image are improved by 14.5% and 33.2%, respectively.

**Key words** biotechnology; non-reference 3D image resolution evaluation; sectioned Fourier shell correlation; 3D microscopic image restoration; deconvolution