

快速宽场三维显微技术研究进展

任婧荣^{1,2†}, 傅相达^{1,2†}, 王孟瑞^{1,2}, 赵天宇^{1,2}, 汪召军^{1,2}, 冯坤^{1,2}, 梁言生^{1,2}, 王少伟^{1,2}, 雷铭^{1,2*}¹教育部物质非平衡合成与调控重点实验室, 陕西 西安 710049;²西安交通大学物理学院, 陕西 西安 710049

摘要 激光扫描显微镜通过扫描高度汇聚的激光焦点可以获得样品的三维图像,而激光扫描显微镜时间分辨率低、光毒性大的缺点限制了其在活体快速三维成像等领域中的应用。近年来具有三维成像能力的宽场显微镜技术逐渐成为三维成像领域的研究热点。聚焦形貌恢复技术、结构光照明显微技术以及深度学习辅助三维成像是三种基于宽场成像的快速三维成像技术,通过硬件提升和软件辅助的方式,提高了宽场显微镜的三维成像能力。分别介绍了它们的原理、优缺点、最新的研究进展与应用,最后对宽场三维显微技术的未来发展进行了总结与展望。

关键词 生物光学; 宽场显微镜; 三维成像; 聚焦形貌恢复; 结构光照明显微; 深度学习

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221303

1 引言

三维成像与测量是目前国内外显微光学领域重要的研究方向,在生物医学和工程科学等诸多领域中都有关的研究与应用。常见的三维显微镜包括激光共聚焦显微镜^[1-2]、多光子显微镜^[3-5]、光片显微镜^[6]和结构光照明显微镜^[7-8]等。其中激光共聚焦显微镜是三维显微成像技术的金标准。其原理是利用探测器前的小孔将成像空间中除焦点以外的信息全部排除,从而实现去除背景模糊并精确地探测出焦点处的荧光信号,可以显著提高轴向分辨率。多光子显微镜则是利用荧光分子的非线性激发能级跃迁产生的荧光信号成像,其激发光大多为近红外光源,可以有效提高成像穿透深度。但是这两种显微技术都是基于激光点扫描的成像模式。激光点扫描成像模式使用高度聚焦的激光束对样品逐点扫描,荧光信号被探测器收集并输送到计算机,通过软件重新组合生成一个三维的像,因此成像速度受限于扫描速度,而长时间的扫描和高强度的激光照明也会给生物样品带来光损伤。光片显微镜可以选择一个成像平面激发荧光实现高通量的成像,常被用于活体样品的三维成像^[9-12]。但是其独特的照明方式需要特殊设计的光路和样品单元,因而给成像系统带来了额外负担。这些典型的三维成像技术都不可避免地需要长时间的扫描或复杂的光机结构,这极大增加了所需的时间成本和硬件成本,不利于快速、高效的三维成像。

随着光学显微技术的不断发展,人们期望能在更短的时间内准确地获得样品的三维信息。宽场成像技术采用面阵图像传感器(如 CCD 相机),可以在一个时间点获得一幅完整的二维图像,比激光点扫描技术的时间分辨率高 2~3 个数量级,且具有图像灰度级高、样品损伤小等优点,适用于活体高速实时的光学显微成像,但是传统的宽场显微受到离焦背景的干扰而不能三维成像。得益于计算机科学和光学技术的快速发展,用于处理宽场图像、提高其轴向分辨率的各种算法和技术被提出,提供了更多三维成像的思路。例如聚焦形貌恢复方法通过处理一系列普通宽场显微镜获得的图像堆栈,可以提取焦面信息。其基本原理是:从轴向扫描的图像堆栈中计算并提取出每个像素点聚焦级最高的深度信息和强度信息,再经过算法重构即可获得整个样品的三维深度图像,这一计算过程称为聚焦形貌恢复(SFF)^[13]。SFF 基于普通的宽场光学显微镜,不需要特别的硬件辅助就可以简单准确地完成样品三维形貌的重建。

结构照明显微(SIM)也是一种宽场显微技术,它具有高分辨的三维层析成像能力。其基本原理是:宽场显微由于显微物镜有一定的景深,因此 CCD 相机得到的图像实际上是像面信息和非像面信息的叠加。其中像面信息为目标,非像面的信息成为了背景。结构照明层析技术使用高空间频率的相移光场照明样品,使用 CCD 相机采集图像,再通过软件解码,可以有效

收稿日期: 2022-10-08; 修回日期: 2022-10-30; 录用日期: 2022-11-02; 网络首发日期: 2022-11-12

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0712500)、国家自然科学基金(62135003, 62005208, 62205267, 62205265)、陕西省创新能力支撑计划(2021TD-57)、陕西省自然科学基金(2022JZ-34, 2020JQ-072, 2022JQ-069, 2022JM-321)

通信作者: *ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

† 共同第一作者

地分离宽场成像中的像面信息和非像面信息,从而得到去除背景样品层析图。SIM 具有成像速度快、光损伤率低、光学兼容性好等优点并已经在活细胞结构的三维成像中得到许多应用。

随着计算机科学的不断发展,深度学习^[14]这一一站式提高图像质量的创新机器学习方法也逐渐被应用于提升显微镜性能。它利用卷积神经网络解决图像形成过程中出现的各种逆问题,已经被用于实现图像重建及超分辨和跨模态图像转化等。深度学习的神经网络模型可以根据所需要的功能进行针对性训练学习,训练完成即可直接输入新的图像数据,从而生成所需结果。如实现宽场与共聚焦之间的模态转换^[15-16]、宽场与 SIM 之间的模态转换^[17]。深度学习的可学习性使其可以与多种成像技术灵活地结合,是一种很有前景的图像处理方法,被用于三维显微成像。

宽场快速三维成像的技术还包括光场显微技术(LFM)^[18-20]、点扩散函数(PSF)工程显微技术^[21-23]等。其中,LFM 通过在图像平面处放置微透镜阵列,可以同时捕捉入射光的 2D 位置和角度以计算合成焦点堆栈、恢复样品三维信息;PSF 工程显微技术则通过测量光学成像系统的点扩散函数,再利用反卷积算法计算恢复深度信息。这些方法都具有较高的时间分辨率,但是应用局限性也比较大。例如 LFM 需要使用的微透镜阵列会降低三维图像的采样率,PSF 工程显微技术需要设计特殊的相位器件且后期的反卷积算法也会延长图像后处理时间。本文分别介绍了聚焦形貌恢复技术、结构光照明显微技术以及深度学习辅助三维成像这三种技术的成像原理,并对其在发展过程中涉及到的各种成像算法和相关应用进行了综述。

2 聚焦形貌恢复技术

聚焦形貌恢复(SFF)是一种被动照明三维成像方

法,由 Nayar 第^[13]在 1989 年提出。具体操作如下:通过拍摄同一场景变换位置后的多个图像,找出场景中物体每个点的深度信息,从而检索空间信息、恢复三维形貌。因其装置简单、测量精确等优点,SFF 已经成为目前常用的三维形貌测量技术。

2.1 聚焦形貌恢复技术的基本原理

理想单透镜成像系统满足高斯公式:

$$1/s + 1/v = 1/f, \quad (1)$$

式中: s 、 v 和 f 分别为物距、像距和焦距。因此物面上的点成像于像平面上一点,形成一一对应的共轭点对。当传感器偏离像平面时,该像点将变为弥散斑,传感器将得到散焦图像 $I_d(x, y)$ 。散焦图像可由像平面的聚焦图像 $I_f(x, y)$ 与点扩散函数(或模糊函数) $h(x, y)$ 的卷积得到,通常用二维高斯函数近似^[24],即

$$\begin{cases} I_d(x, y) = h(x, y) * I_f(x, y) \\ h(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma_h^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma_h^2}\right), \end{cases} \quad (2)$$

式中: σ_h 为高斯参数。

SFF 主要原理是通过轴向改变物体与透镜的距离,得到一组不同聚焦程度的图像序列,再通过评估每一物点在这组图片中最清晰的时刻,计算得到物点之间的相对深度,从而恢复物体的三维结构。如图 1(a)所示,首先选择合适的平面作为参考平面(与物方焦面的距离为 d_f),沿光轴等间距(Δd)移动物体,得到一组图像序列。随着位移台的移动,当目标区域位于物方焦面时,在传感器上成一清晰像,此时位移台与参考平面的距离为 $k\Delta d$ (移动样品的次数 $k=0, 1, 2, \dots$),与 d_f 相减得到目标区域相对位移台的高度。找出物体中每个点的相对高度,恢复出物体三维形貌,此过程中物体成像示意图如图 1(b)所示。

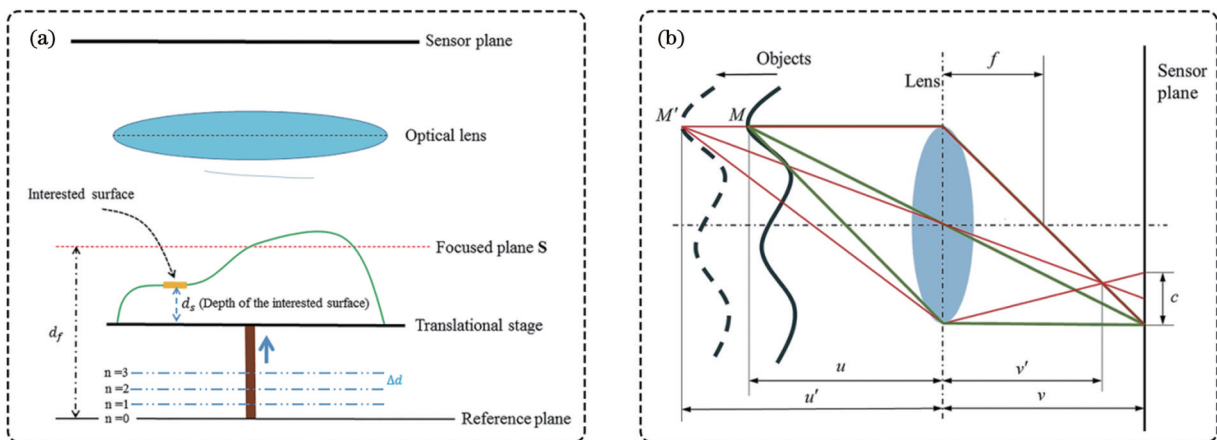


图 1 SFF 的成像原理。(a)SFF 系统示意图^[25];(b)物体移动时透镜的成像模型^[26]

Fig. 1 Imaging principle of SFF. (a) Schematic of SFF system^[25]; (b) lens imaging model when object is moving^[26]

SFF 的关键步骤是找出每一物点对应的聚焦程度最高的图像,这就需要借助聚焦评价(FM)算子来

量化聚焦程度这一指标。聚焦评价算子在数学上就是高通滤波器,通过对聚焦评价算子 $o(x, y)$ 与图像序列

中一幅图像(多为离焦图像)进行卷积计算,得到该幅图像的聚焦程度^[27-28]:

$$r(x, y) = o(x, y) * [h(x, y) * I_f(x, y)], \quad (3)$$

式中: $r(x, y)$ 为散焦图像经过聚焦评价算子 $o(x, y)$ 滤波后得到的图像,代表了该幅散焦图像的聚焦程度。

模糊函数 $h(x, y)$ 为低通滤波器,随着离焦距离的增加,聚焦图像中的高频信息将被衰减,而处于焦面位置物点的聚焦图像中的高频信息将会被保留。再通过 FM 算子进行高通滤波,增加同一物点在不同图像中聚焦程度的区分度,实现聚焦水平的参数化,方便后续比较。

$$\nabla_M^2 I(x, y) = |2I(x, y) - I(x - \Delta x, y) - I(x + \Delta x, y)| + |2I(x, y) - I(x, y - \Delta y) - I(x, y + \Delta y)|, \quad (6)$$

式中: $\Delta x, \Delta y$ 分别为计算过程中在 x 和 y 方向上选取的像素偏移间距。

最终像素点 (x, y) 处的 FM 值为以 (x, y) 为中心的 $(2n + 1) \times (2n + 1)$ 个点处的 ML 运算结果之和,即

$$F(x, y) = \sum_{i=x-n}^{x+n} \sum_{j=y-n}^{y+n} \nabla_M^2 I(i, j), \quad (7)$$

式中: $I(i, j)$ 为计算的图像在点 (i, j) 处的像素灰度值。

在 $(2n + 1) \times (2n + 1)$ 邻域内累加的目的在于减小噪声的影响,邻域的大小也被称为窗口大小。通过计算 $F(x, y)$ 实现了每个像素点在不同图像上的聚焦程度的数值化。

下一步是通过聚焦程度曲线来获得像素点对应的物点的深度信息。以相对参考平面距离 $k\Delta d$ 为横轴坐标,以该点的 FM 值为纵轴坐标,得到聚焦程度曲线。理想的聚焦程度曲线具有无偏性、单峰性等特点,通过高斯拟合或三点法拟合等方法计算出曲线峰值所对应的相对深度 $(d_m)^{[13]}$,同时应用相同的方式处理物体上的全部物点,得到每一像素点的相对深度,进而恢复物体的三维形貌。

2.2 聚焦形貌恢复技术的发展与应用

为了提高 SFF 三维重建的效果,研究人员从聚焦评价算子选取改进、深度图后处理和硬件优化几个角度来提升 SFF 的综合表现,实现更快、更准确、鲁棒性更高的三维成像。

2.2.1 聚焦评价算子

聚焦评价算子对 SFF 的恢复结果起到决定性作用,除 Laplacian 算子外,还包括梯度算子^[29]、统计值类算子^[30-31]等空域算子以及基于离散小波变换^[32]和离散余弦变换^[33-35]等的频域算子^[36-37]。各类算子都可以实现图像的高通滤波,但由于各类算子基本原理的差异,不同算子在鲁棒性、准确性和计算速度等方面水平不一。同时处理不同纹理或不同表面情况的物体时,FM 算子的表现也会呈现很大差异。所以,需要针对不同的应用需求选取不同的算子。

Laplacian 算子为 SFF 常用的算子之一,作为高通滤波算子,Laplacian 算子的处理方式是对图像求二阶导数,即

$$\nabla^2 I = \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I}{\partial y^2}, \quad (4)$$

式中: I 为所处理的图像。

为了避免对称性带来的错误计算^[24],可以对传统 Laplacian 算子进行改进,即修正拉普拉斯算子(ML)表达式为

$$\nabla_M^2 I = \left| \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} \right| + \left| \frac{\partial^2 I}{\partial y^2} \right|. \quad (5)$$

对图像进行 ML 运算,得到

影响聚焦评价算子效能的因素主要包括窗口尺寸(邻域像素数量)、噪声等。

在窗口尺寸方面,大部分 FM 算子的窗口尺寸直接影响了图像的纹理数量和图像信息。当窗口尺寸过小时,容易出现纹理缺失的情况,不利于重建,而且计算结果对噪声敏感度大。而当窗口尺寸过大时,平滑过度会导致深度估计的不准确,三维重建结果的分辨率降低^[38-39]。基于此,Malik 等^[40]通过考虑照明不均对焦点检测准确性的影响,比较了不同窗口尺寸下的重建效果,从实验的角度提出了 SFF 的最优窗口尺寸为 $3 \text{ pixel} \times 3 \text{ pixel}$ 及 $5 \text{ pixel} \times 5 \text{ pixel}$ 。此外,Jang 等^[25]以灰度值方差作为标准,提出了基于灰度值方差(GLV)算子的窗口大小自动选择的算法,理论上实现了窗口尺寸的最优化。利用相对质量度量 and 通用质量指数来量化成像效果,Pertuz 等^[36]分析了各类算子在不同影响因素水平下呈现出的稳定性和准确性。在噪声水平方面,统计类算子对噪声的鲁棒性最高,其中低阶统计矩和噪声高频组成部分的相关性很低。因此根据随机变量的线性函数属性^[41],基于方差的算子可准确地检测到焦点。同样,基于特征值的运算符在噪声能量低于像素附近数据的总能量的情况下,对噪声鲁棒性较强。在传统算法的基础上,研究人员将新型的高通滤波算子应用到 SFF 技术中,例如以非下采样剪切波变换(NSST)作为聚焦评价算子,也取得了理想的效果^[42]。并通过凹陷平面和硬币的成像,验证了算子的有效性,具体成像结果如图 2(a)、(b)所示,每张图像像素都为 $1024 \text{ pixel} \times 1024 \text{ pixel}$,轴向位移间隔约为 $1 \mu\text{m}$,轴向采样 100 层,凹陷平面和硬币的成像时间分别为 318.07 s 和 317.15 s。

在运算时间方面,不同的算子由于其自身的运算复杂度不同,因此处理时间有很大差异,Pertuz 等^[36]总结了各类主流算子在处理一张 $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$ 图片时所花费的时间,其中计算较为简单的梯度类算子只需要毫秒级的计算时间,而一些较为复杂的算子,如

基于离散余弦变化的频域算子和基于绝对中心矩的算子则需要秒级的计算时间。

2.2.2 聚焦形貌恢复算法优化

通过 SFF 得到样品的深度图像后,还需要进行后处理来实现对形貌恢复结果的优化。后处理主要是指考虑成像物体的连续性,通过一系列技术对已获得的深度图进行改进。其中最具代表性的便是 Subbarao 等^[43]提出并优化的聚焦图像表面(FIS),具体定义为相机镜头聚焦下物体的表面。为了获得弯曲物体更加准确的形状恢复信息,通过使用传统 SFF 估计近似的 FIS,然后在 FIS 上计算 FM 值,而不是在图像序列中计算,恢复结果优于传统的 SFF,但是计算成本显著增高。在此基础上,他们进一步提出了曲面窗口聚焦测量(CWFM),在 FIS 中利用二阶拉格朗日多项式插值进行分段曲面近似以代替分段平面近似^[44],进一步提高了成像结果的准确度。

FIS 的提出是 SFF 发展过程中的重要成果,大幅

度提高了形貌恢复的准确性,Choi 课题组开展了大量的工作以提高 FIS 的性能。Asif 等^[45]引入了神经网络,优化了小型三维窗口的聚焦测量过程,提高了 FIS 测量的准确性,进而对焦点测量后得到的深度图结果实现了表面的拟合。Ahmad 等^[46-47]提出使用动态规划(DP)来处理 FIS 的复杂性,利用贝尔曼最优性原理结合三维数据的实际情况,提出了一种基于 DP 的模型,降低了计算成本,提高了 FIS-SFF 的成像速度。Shim 等^[48]提出了一种局部搜索算法,在初始估计深度图最佳聚焦图像帧前、后创建临时图像体积,在临时体积内利用 FM 算子更新深度图,进行三次迭代得到最终深度图像。相较于 SFF-FIS 和 SFF-DP,该算法在准确性方面得到显著提高,通过对薄膜晶体管液晶显示器(TFT-LCD)的彩色滤光片进行成像,证明了 SFF 局部搜索(LS)可实现更加平滑准确的形状恢复,成像结果如图 2(c)~(e)所示(使用 500×物镜,轴向扫描间隔为 0.1 μm)。

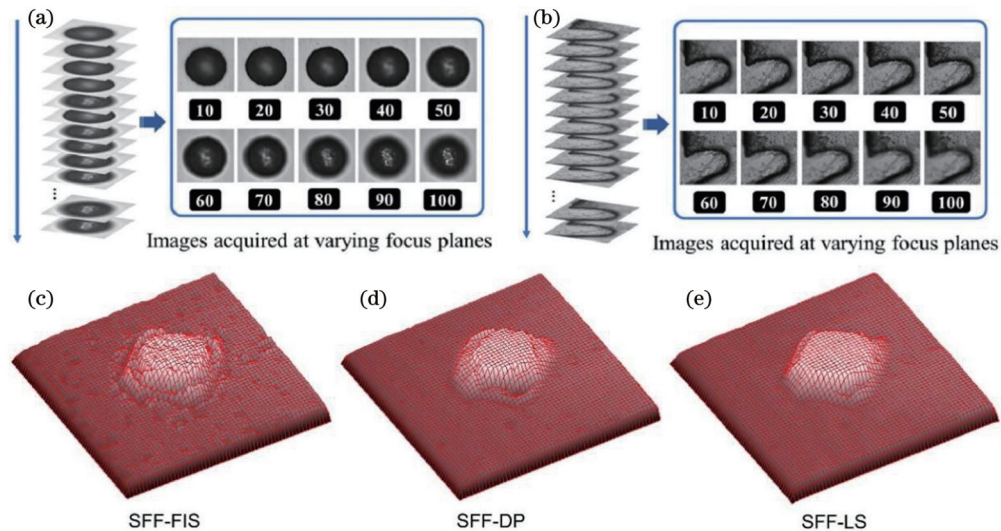


图 2 SFF 的成像结果。(a)应用 NSST 凹陷平面的图像序列^[42]; (b)硬币的图像序列^[42]; (c)~(e) TFT-LCD 彩色滤光片上的 SFF 结果比较^[48]

Fig. 2 Imaging results of SFF. (a) Image sequence of sunken plane with NSST^[42]; (b) image sequence of coins^[42]; (c)~(e) comparison of SFF results on TFT-LCD color filter^[48]

在轴向采样精度方面,也可以通过后处理实现优化。面对成像设备与采样精度之间存在的差距,Choi 课题组的 Muhammad 等^[49]使用高斯光束近似光线的聚焦,结合奈奎斯特采样定理,得到了聚焦程度曲线的拟合函数,实现了在保证成像精度的前提下最小化采样数,提高了成像速率;在使用 FM 算子计算中心像素焦点值并绘制聚焦程度曲线时,连续的图像帧之间会出现信息的丢失,Jang 等^[50]利用局部回归进行了聚焦曲线的拟合,在精度和计算量方面相较于三点法等拟合方法有了较大提升。后处理还包括通过对图像进行滤波实现降噪等处理。Mahmood 等^[51]提出了 3-D ANDF 的方法,使用非线性扩散滤波(ANDF)来处理焦点测量中的噪声,代替传统 SFF 在矩形窗口中进行

平均处理这一线性滤波方式,保留了图像边缘,提高了图像聚焦程度测量的准确性。

2.2.3 聚焦形貌恢复的硬件优化

除了从算法角度进行优化外,更快速的调焦硬件也可以显著提升 SFF 的效果。SFF 是通过多次轴向移动位移台来获取初始图像,但大多数的电动位移台移动速度较慢,而且系统相对复杂。鉴于此,电控液体透镜(ETL)被引入到显微成像领域^[52],可通过改变经过 ETL 的电流来改变 ETL 的聚焦程度,实现轴向的扫描,从而避免物体或传感器的机械移动。Jabbour 等^[53]通过 ETL 实现了共聚焦的轴向和横向扫描,并对上皮组织细胞进行了成像。Philipp 等^[54]又将 ETL 应用在 Hilo 显微镜中,实现了分辨率为 4 μm 的轴向扫描。余

洪斌课题组使用 ETL 搭建了 SFF 成像系统并进行了成像实验,与传统的 SFF 系统相比,响应速度提升,可实现动态物体的捕捉,但在成像精度上还有待提升^[55]。

2.3 小结

SFF 通过选用合适的 FM 算子和后处理方式,可恢复样品的三维形貌,并且可以得出深度的测量值,方便三维数字化建模。另外,SFF 技术只需要在每层上采集一张图像便可实现深度的测量,原始数据量小,成像速度较快;硬件方面,SFF 成像装置简易,仅需要在普通显微镜的基础上增加轴向位移模块,即可实现 SFF 成像。

但是,SFF 技术目前还有诸多方面有待提高。受到物镜点扩散函数的影响,SFF 技术的空间分辨率低于激光共聚焦显微镜。不同种类 FM 算子在面对不同成像场景时表现不稳定。焦点测量和后处理的效率即成像速度还可通过优化算法来进一步提高。SFF 的三维成像效果依赖于样品表面纹理的丰富度,即使 Minhas 等^[56]在 SFF 中使用方向可控的滤波器来识别各个方向的边缘,拓宽了 SFF 适用的纹理场景,但对于纹理较少的物体,成像效果依旧较差。SFF 大多应用在样品的表面成像方面,与之相比,共聚焦显微镜和同为宽场成像技术的结构光照明显微技术都可以实现样品的深层成像,SFF 的应用范围比较局限。

3 结构光照明显微技术

结构光照明显微是一种宽场成像技术(即一次性对全视场成像),它使用 CCD 或者 CMOS 相机成像,可以实现超分辨成像以及三维光切片成像。结构光照明显微技术一般可分为超分辨 SIM^[57]和光切片 SIM^[7]两类。超分辨 SIM 是美国科学家 Gustafsson 提出的,该技术基于两个高空间频率的图案重叠可以形成低频莫尔条纹的原理,通过软件解码,可以从莫尔条纹中提取出样品的超分辨率信息,从而重组出样品的超分辨率图像。从空间频域来看,超分辨 SIM 能将物镜收集到的最大空间频率提高一倍,因此超分辨 SIM 可以将光学显微系统的空间分辨率提高一倍^[57]。如果采用非线性饱和结构光照明显微技术(SSIM),利用激发光

与特殊荧光蛋白之间的非线性效应,可以进一步提高超分辨 SIM 的空间分辨率^[58-59]。光切片 SIM 由 Neil 等^[7]提出,其基本原理是:宽场显微由于显微物镜有一定的景深,CCD 相机得到的图像实际上是像面信息和非像面信息的叠加。光切片 SIM 利用高空间频率的条纹结构光场照明样品,使用 CCD 相机采集两幅或三幅不同相位的图像,再通过特定的均方根(RMS)算法^[7]、频谱滤波(Hilo)算法^[60]或希尔伯特(SHT)算法^[61],可以有效地分离图像中的焦面信息和离焦背景信息,从而得到去除背景的样品光切片图。本文主要讨论光切片 SIM。

3.1 光切片 SIM 的理论基础

三维成像技术的核心是将图像的焦面信息和离焦背景进行分离。SIM 技术对同一位置处的样品进行三次固定相位差的结构光(正弦光)照明,通过均方根等算法,去除离焦背景,实现焦面信息的提取。1997 年,Neil 等^[7]提出了结构光照明显微成像技术,并实验验证了其三维成像能力。当用显微物镜进行成像时,样品会在焦面形成最清晰的像,随着离焦距离的增加,图像的高频信息会丢失,所以当将高频的结构光投影到物体表面上时,只有焦面会被结构光调制,而离焦区域的高频条纹会迅速衰减^[62]。由于 SIM 是一种编码成像技术,因此需要通过特定的解码算法从结构光编码的图像中提取出焦面信息。Neil 等^[7]在提出光切片 SIM 技术之初,便引入了均方根算法。此后 Hilo 算法和基于希尔伯特变换的快速光切片算法相继被提出^[60-61,63]。下面以最常用的 RMS 算法为例,讲述其解码过程。当使用高频正弦结构光照明时,结构光的强度分布为

$$I_{SI}(x, y) = 1 + m \cdot \cos(2\pi\rho x + \varphi_0), \quad (8)$$

式中: $I_{SI}(x, y)$ 为结构光的光强分布; m 为调制度; ρ 为空间频率; φ_0 为初相位。获得的原始图像可认为是由被编码的焦平面和均匀照明的离焦背景两部分组成,即

$$I(x, y) = I_{in}(x, y) \cdot I_{SI}(x, y) + I_{out}(x, y), \quad (9)$$

式中: $I_{in}(x, y)$ 为图像的焦面信息; $I_{out}(x, y)$ 为图像的离焦背景。结构光只对焦面信息进行编码。使用三幅相移差为 $2\pi/3$ 的结构光照明得到三幅初始图像:

$$\begin{cases} I_0(x, y) = I_{in}(x, y) [1 + m \cdot \cos(2\pi\rho x + \varphi_0)] + I_{out}(x, y) \\ I_{2\pi/3}(x, y) = I_{in}(x, y) [1 + m \cdot \cos(2\pi\rho x + \varphi_0 + 2\pi/3)] + I_{out}(x, y) \\ I_{4\pi/3}(x, y) = I_{in}(x, y) [1 + m \cdot \cos(2\pi\rho x + \varphi_0 + 4\pi/3)] + I_{out}(x, y) \end{cases} \quad (10)$$

将三幅图像两两相减除去相同的离焦背景,得到

$$\begin{cases} I_{0-2\pi/3}(x, y) = I_0 - I_{2\pi/3} = m \cdot I_{in}(x, y) \left[\frac{3}{2} \cos(2\pi\rho x + \varphi_0) + \frac{\sqrt{3}}{2} \sin(2\pi\rho x + \varphi_0) \right] \\ I_{2\pi/3-4\pi/3}(x, y) = I_{2\pi/3} - I_{4\pi/3} = -\sqrt{3} m \cdot I_{in}(x, y) \sin(2\pi\rho x + \varphi_0) \\ I_{4\pi/3-0}(x, y) = I_{4\pi/3} - I_0 = -m \cdot I_{in}(x, y) \left[\frac{3}{2} \cos(2\pi\rho x + \varphi_0) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin(2\pi\rho x + \varphi_0) \right] \end{cases} \quad (11)$$

对式(11)进行平方求和处理,去除三角函数项,得到未被编码的焦面信息:

$$I_m(x, y) = \frac{2\sqrt{3}}{3m} \times \sqrt{I_{0-2\pi/3}^2(x, y) + I_{2\pi/3-4\pi/3}^2(x, y) + I_{4\pi/3-0}^2(x, y)}. \quad (12)$$

以固定间距进行轴向扫描,解码后将不同深度的焦面信息叠加,即可得到样品的三维图像。

3.2 光切片 SIM 的发展与应用

Neil 等^[7]在 1997 年提出结构光照明光切片显微成像技术,并引入均方根算法进行焦面图像的解码。自此之后,为了满足彩色、高速、高分辨等成像需求,研究人员从硬件和算法两个方向不断提高光切片 SIM 的成像水平。

3.2.1 三维快速成像

光切片 SIM 主要是利用投影法产生结构光。投

影法是使用非相干光作为照明光,将光栅类器件置于样品焦面的共轭面处,将该器件的振幅分布图案微缩投影至样品的表面。Neil 等^[7]在实验中使用正弦强度光栅,得到结构光场,并且实现了花粉的三维成像,但是实验中需要使用压电位移台移动光栅从而实现正弦条纹的相移,因此系统的速度、稳定性和灵活性受到很大限制。2006 年 Monneret 等^[64]使用振幅型液晶空间光调制器产生结构光,提高了相移的稳定性,但振幅型液晶空间光调制器的刷新频率较低。2013 年雷铭、姚保利团队提出一种使用数字微镜器件(DMD)调制和发光二极管(LED)照明的 SIM 技术,实现了最高可达 22 kHz 的转换频率,大幅增加了条纹相移速度和准确性^[65],系统示意图如图 3 所示。目前,以 DMD 作为结构光产生器的 SIM 系统实现了 1.6×10^7 pixel/s 的成像速度及多种生物和非生物样品的高分辨三维成像^[65-67]。

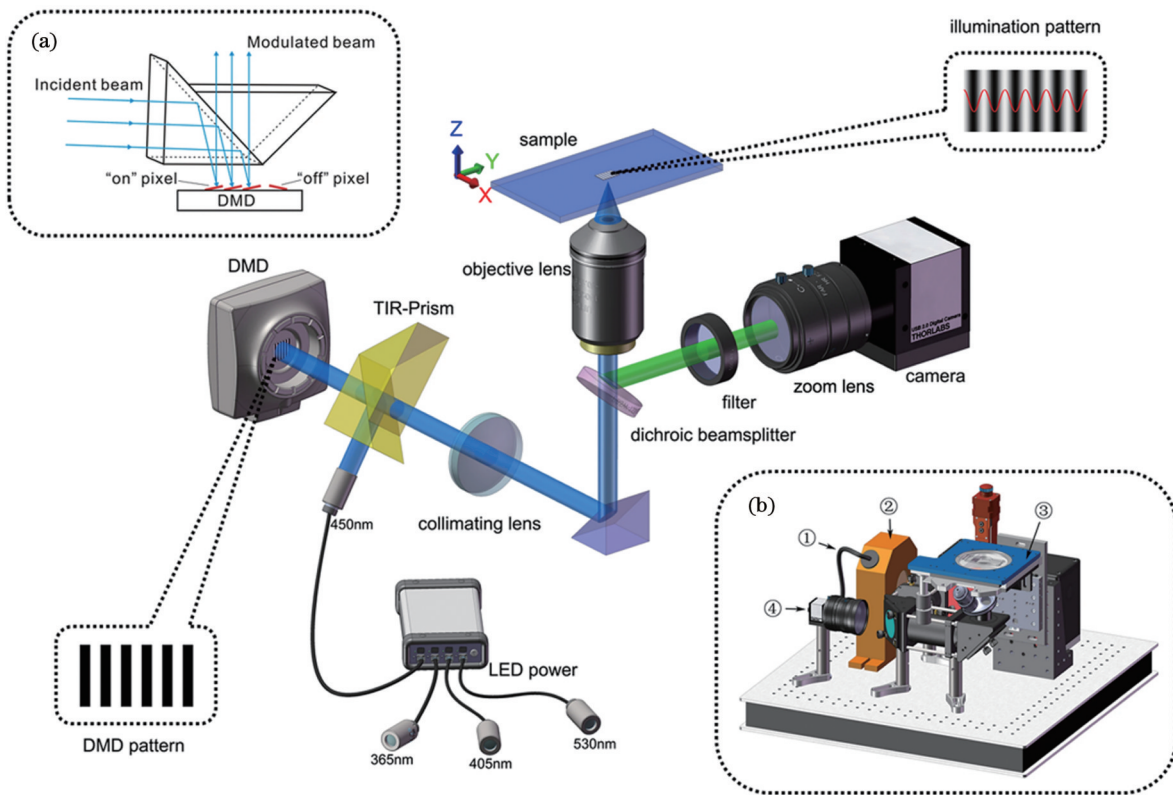


图 3 基于 DMD 投影和 LED 照明的 SIM 系统示意图^[65]。(a) TIR 棱镜的原理图;(b)系统的结构,其中①为 LED 光导,②为 DMD,③为样品台,④为 CCD 相机

Fig. 3 Schematics of SIM system based on DMD projection and LED lighting^[65]. (a) Schematic of TIR prism; (b) structure of system, in which ① is LED light guide, ② is DMD, ③ is sample stage, and ④ is CCD camera

在解码算法方面,由于传统的均方根算法需要三幅固定相位差的图像,为了减少图像采集量、提高运算速度和鲁棒性,各类快速解码算法相继被提出。Ford 等^[60,63]于 2008 年提出了 HiLo 算法,仅采集一幅宽场图像以得到低频信息,采集一张散斑照明图像以得到高频信息,实现了花粉光切片图像的重构,其中散斑照明可以使用正弦条纹照明等其他结构光场替代。

Heintzmann 团队利用偏振编码,在单次曝光中采集三幅不同相移的初始图像,提高了光切片重构速度^[68]。2014 年,Paturski 等^[69]将希尔伯特变换应用到结构光照明光切片显微成像技术中,提出了基于希尔伯特-黄变换的 FABEMD-HS 算法。该算法只需要两幅不同相位的结构光图像,通过模态分解差值图像,再选取二位本征模态图像进行重组,最后进行希尔伯特涡旋变

换,实现振幅解调,得到光切片图像,但模态分解时很难准确分离,会导致图像信息丢失,影响成像分辨率。雷铭、姚保利团队在 2015 年提出基于序列希尔伯特变换(SHT)的快速光切片算法,使用两幅任意相差的结构光照明图像,便可重构出光切片图像,从根本上解决了相移误差导致的图像伪影问题,且成像速度远高于使用 FABEMD-HS 算法、RMS 算法等光切片重构算法的三维成像技术^[61]。以使用 Matlab 软件计算一张 2048 pixel×2048 pixel 的光切片图像为例, FABEMD-HS 算法、RMS 算法和 SHT 算法分别需要 15.008、0.044、0.151 s(使用 Intel Core i7-3630QM 2.4 GHz 处理器和 8 GB 内存)。SHT 算法的处理速度虽然慢于 RMS 算法,但是由于 RMS 算法需要三次相移以采集三张原始图像,而 SHT 算法只需要两张,考虑到相机曝光时间和 DMD 切换时间,在进行多视场大样品拍摄时, SHT 算法在采集时间方面较有优势,最终成像速率高于基于 RMS 算法的光切片 SIM 技术。

3.2.2 三维彩色成像

物体表面的不同色相、饱和度和明度等色彩性质在宏观尺度反映了其微观结构的差异。以激光共聚焦扫描显微镜为代表的点扫描显微成像技术虽然具有三维成像能力,通过结合多通道融合技术也可以获得伪

彩图像,然而颜色通道有限,无法得到自然光照明下的真实三维彩色图像。2016 年,骆清铭团队将结构光照明光切片与物理切片结合,虽然实现了鼠脑的多色三维成像,但是仍旧是依靠多通道融合技术得到的伪彩图像^[70]。雷铭、姚保利团队在 2015 年提出白光照明的高速彩色三维结构光照明显微技术,通过使用基于 HSV 彩色空间的全彩色光切片算法(HSV-RMS),实现了全彩色三维成像^[66]。雷铭、姚保利团队实现了彩色昆虫标本等厘米量级样品的高分辨三维成像^[71]。2020 年,该团队又提出了基于希尔伯特变换结构光照明的快速三维彩色显微成像(HT-COS)技术,只需要两张任意相位差的彩色图像,便可重构出彩色光切片图像,进一步提升了重构速度,且对图像噪声具有更高的鲁棒性^[72]。2021 年彩色 SIM 被用于琥珀及月球陨石等珍贵样品的三维成像,扩展了 SIM 在三维成像方面的应用范围^[73-74]。成像结果如图 4(a)、(b)所示,系统的示意图如图 4(c)、(d)所示。其中,月球陨石成像使用数值孔径(NA)为 0.2 的 4×物镜,位移台扫描间隔为 15 μm,采集层数为 293 层,图像采集的时间为 296 s;琥珀成像使用数值孔径为 0.45 的 10×物镜,位移台的扫描间隔为 3 μm,采集层数为 237 层,图像采集的时间为 299 s。

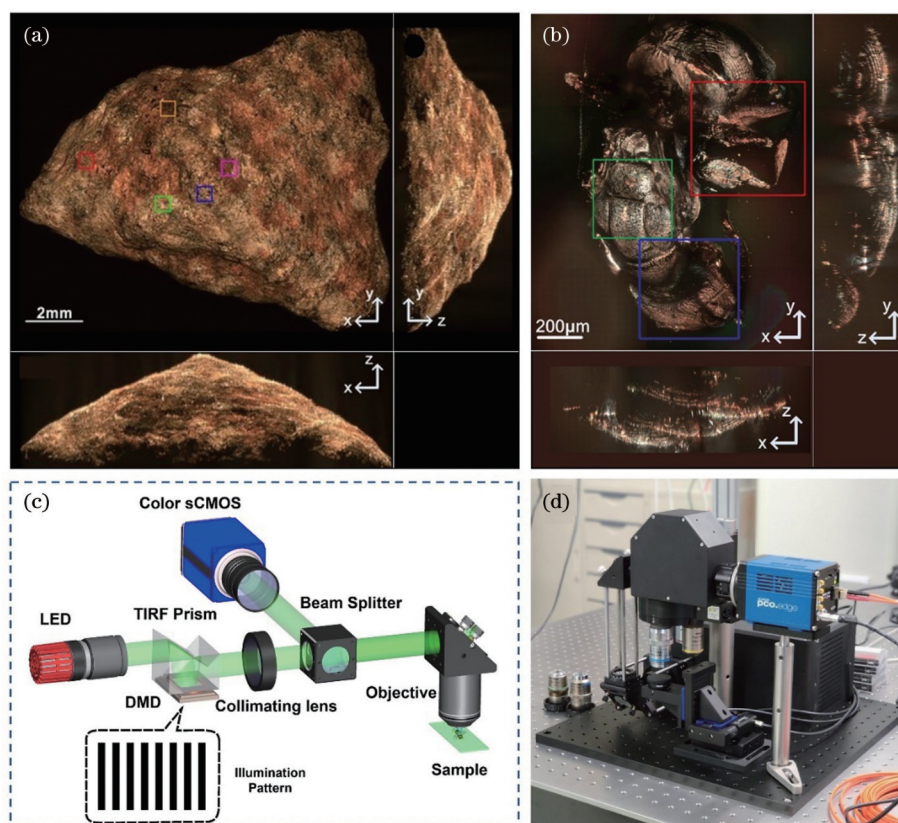


图 4 光切片 SIM 成像结果及成像装置。(a) 月球陨石的三维成像结果^[74]; (b) 琥珀的三维成像结果^[73]; (c) 成像系统示意图^[73]; (d) 成像装置实物图^[73]

Fig. 4 Optical sectioning SIM imaging results and imaging devices. (a) 3D imaging results of lunar meteorite^[74]; (b) 3D imaging results of amber^[73]; (c) schematic of imaging system^[73]; (d) physical picture of imaging device^[73]

此外,轴向分辨率远劣于横向分辨率一直是困扰三维光学显微的问题。SFF 通过对均匀照明下的像素点进行聚焦评价并拟合聚焦程度曲线,提取出点的深度信息,从而实现三维重建,其轴向分辨率受限于物镜的景深。与之相比,光切片 SIM 技术的轴向分辨率同时受到物镜景深和结构光空间频率的影响,可以达到衍射极限,与激光共聚焦显微相当^[75],提高了三维成像的轴向分辨率。2022 年,雷铭团队将 SIM 技术与 SFF 结合,提出了一种聚焦程度相关(FLC)算

法,进一步提升了光切片 SIM 三维成像的轴向分辨率,将其应用到彩色半透明复杂三维表面结构的形貌测量中,系统的光切片成像速度可达 100 frame/s (@1024 pixel×1024 pixel),测量精度优于 30 nm^[76]。该算法通过图形处理器(GPU)加速,解码速度也得到大幅提高,通过自然色彩丰富的蓝铜矿(由深蓝色铜盐结晶、白色水晶和绿色孔雀石组成)成像,验证了 FLC 算法超强的色彩还原能力,成像结果如图 5 所示。

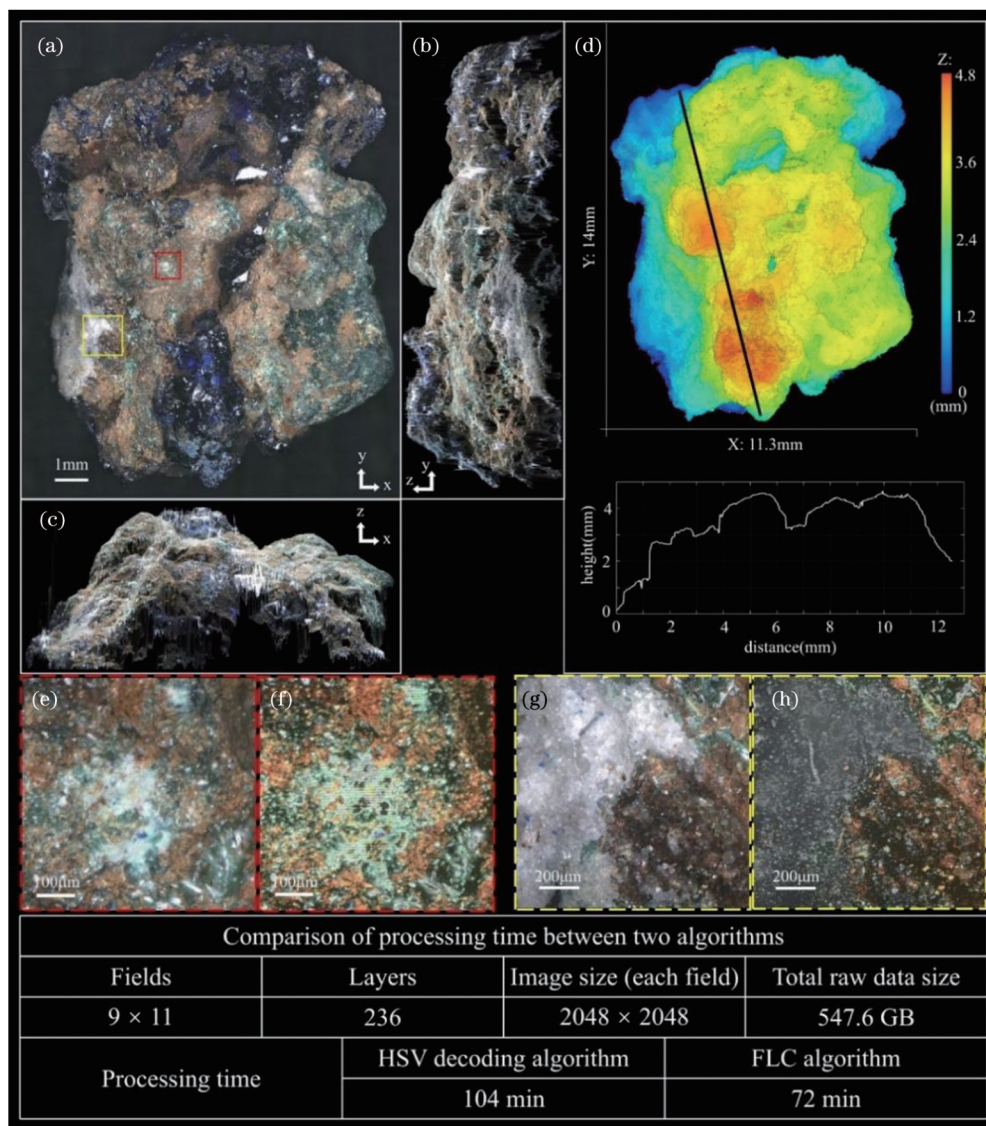


图 5 蓝铜矿的成像结果^[76]。(a)~(c)蓝铜矿的三视图最大值投影图像;(d)图 5(a)的三维高度分布和黑色线段上的高度起伏分布;(e)孔雀石细节图像;(f)通过 HSV 解码算法还原的孔雀石图像;(g)白水晶细节图像;(h)通过 HSV 解码算法还原的白水晶图像
Fig. 5 Imaging results of azurite^[76]. (a)~(c) Three-view maximum projection images of azurite; (d) 3D height map of Fig. 5 (a) and height fluctuation distribution on black line segment; (e) detail image on malachite; (f) image of malachite restored by HSV decoding algorithm; (g) detail image on white crystal; (h) image of white crystal restored by HSV decoding algorithm

3.3 小结

光切片 SIM 具有成像速度快、分辨率高、光毒性小和适用范围广等优点,可满足生物学、材料学以及工业检测等各个学科的应用需求。相较于其他技术,光切片 SIM 技术可以获得样品各深度的切片图,满足了

科研人员对样品不同深度处表面形貌的研究需求。

目前,光切片 SIM 的主要缺点在于:结构光产生器液晶空间光调制器(LC-SLM)和 DMD 的透过率较低,有可能导致照射到样品上的光功率不足,对于一些吸收强或荧光效率低的样品,需要增加曝光时间,可在

算法、硬件、探针等方面进行改进以缩短曝光时间,提升三维重建的速度和质量;另一方面,光切片 SIM 至少需要两张原始图像才能实现层切,原始数据量还有减小的空间。

4 深度学习辅助三维显微成像

近些年来,深度学习被认为是一种用来处理图像复杂数据的很有前景的方法,它是一种利用多层人工神经网络对信号或数据进行自动分析的机器学习技术^[77-78]。相较于 SFF 等图像处理技术,深度学习的关键优势之一就在于其模型特征层并不是由人类设计的,而是使用一个通用的程序从大量图像数据中学习提取出来的,不需要复杂的手工计算就能实现端到端的学习^[79]。伴随着硬件和软件的不革新,计算机处理图像数据的能力和速度得到了大幅度的提升,深度学习在显微图像处理领域也得以快速发展和应用^[80]。各种训练完成的神经网络已经被用于提高显微镜的横向分辨率^[81-82]和轴向分辨率^[17,83]以及增强^[84]和重建^[85]图像等。这些基于深度学习的图像处理方法需要长时间的训练,然而这个训练过程是一次性的。每个新的样本数据都可以通过训练完成的神经网络快速重建目标图像,而不需要任何迭代或超参数,这也是深度学习用于快速三维重建的关键优势^[86]。

4.1 深度学习网络的基本原理

深度神经网络可以视为一个特征提取器,它将输入的原始数据(如图像的像素值)转换为合适的内部表征或特征向量以表示所需的发现^[77],通常由多层人工神经网络堆叠而成,“深度”也由此而来。这些人工神经层是一

些非线性变化模块,将输入的原始数据转变为更高、更抽象层次的表示。只要有足够多的转换,整个网络就可以表示输入图像与目标图像之间复杂的转换函数,这也意味着深度学习可以灵活地从图像数据中直接提取特征而不需要预先知道成像模型。神经网络的转换层次越多则表示它的学习能力越强,现代神经网络的架构也逐渐向更深层次和更复杂连接的方向发展。

常见的用于深度学习的神经网络有卷积神经网络(CNN)、循环神经网络(RNN)、生成对抗网络(GAN)等。其中,CNN卷积神经网络就是一种典型的深度学习网络。它的结构通常为输入层、卷积(Conv)层,ReLU激活层、池化(Pool)层和全连接(FC)层,这些变化层按照一定的顺序叠加,就可以构建一个完整的卷积神经网络。通常卷积层与ReLU激活层统称作卷积层。卷积核的参数是随机初始化的,训练过程中通过反向传播算法计算和输出误差,并相应地调整权重,直到目标函数的平均值停止减少训练完成。除了传统的卷积网络之外,2014年Goodfellow等^[87]提出的生成对抗网络也成为了当下极有前景的显微图像重建模型之一。生成对抗网络由生成器网络和鉴别器网络两个网络组成,整体架构如图6所示^[88]。生成器网络一般是U-Net网络用于生成图像的,鉴别器网络一般是CNN用来区分生成的图像是真实的还是虚假的。两个网络相互对抗,直到系统达到平衡,即生成器输出一幅鉴别器无法分辨的图像,则训练完成。调整网络深度和卷积层内核大小等可以改变其性能和训练速度,通常使用监督学习来训练神经网络执行指定的图像任务。

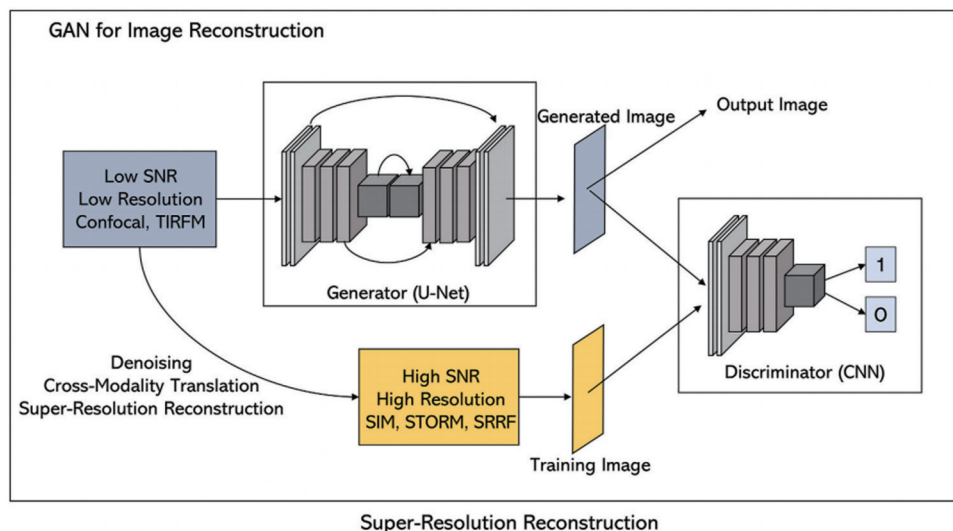


图6 用于显微镜图像重建的GANs^[88]

Fig. 6 GANs for image reconstruction in microscopy^[88]

4.2 深度学习网络辅助三维成像的发展与应用

深度学习网络辅助宽场显微镜可以使其拥有与激光共聚焦显微镜一样的三维成像能力。2019年,Wu等^[15]提出了基于GAN的Deep-Z网络,用于减少宽场

轴向扫描次数,实现三维虚拟重聚焦。该框架只需要输入一张宽场荧光图像,不需要任何机械扫描就可以生成样本内其他轴向位置处的聚焦宽场图像。利用Deep-Z对秀丽隐杆虫的头部神经元核进行成像,结果

如图 7 所示。该框架提高了成像速度,但是生成的宽场图像结果中离焦背景并未去除,需要选取合适的点扩散函数,对获得的图像堆栈作反卷积计算以实现三维成像。他们进一步升级 Deep-Z 网络为 Deep-Z+, 用于

实现宽场和共聚焦之间的跨模态虚拟重聚焦,利用宽场与共聚焦这两种不同荧光显微成像模式获得的标准标签数据进行训练。与 Deep-Z 相比,Deep-Z+生成的是同一平面内与宽场图像相匹配的共聚焦图像结果。

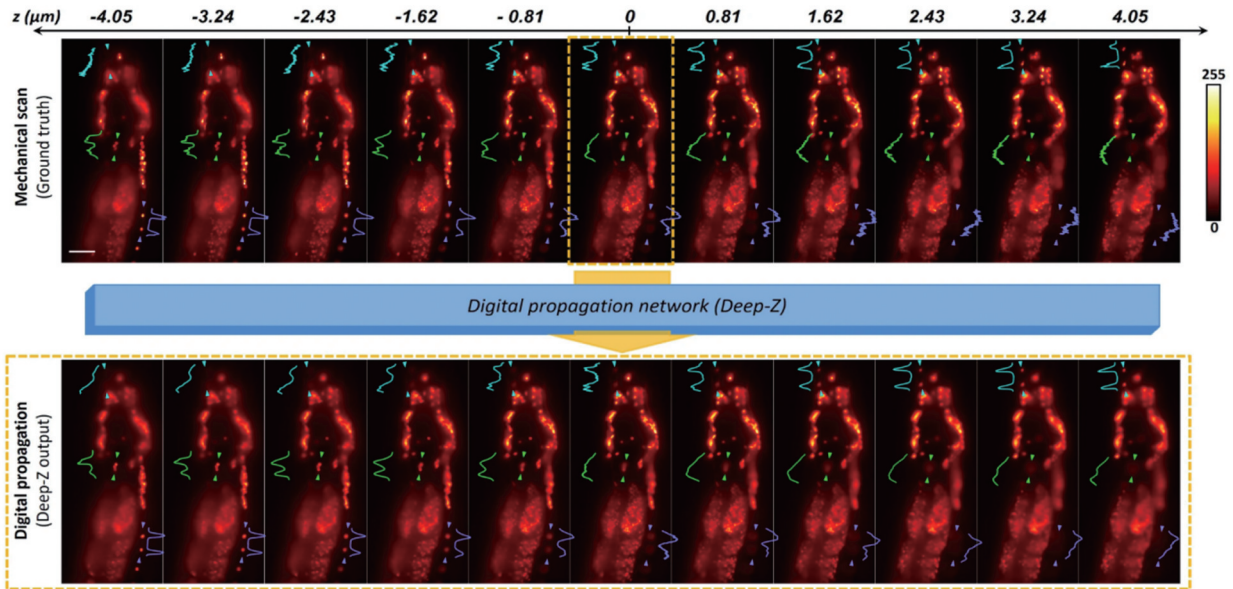


图 7 使用 Deep-Z 得到的秀丽隐杆线虫头部神经元核的三维成像^[15]

Fig. 7 3D imaging of caenorhabditis elegans head neuron nuclei obtained using Deep-Z^[15]

Deep-Z 网络输入的单张宽场图像只能够在显微镜的景深范围内生成虚拟重聚焦图像,这限制了宽场显微镜的三维成像深度。于是该团队的 Huang 等^[16]在

2020 年进一步提出了基于递归神经网络(RNN)的体成像显微系统(称为 Recurrent-MZ),其成像框架如图 8 所示。相较于 Deep-Z,Recurrent MZ 使用了更多张稀

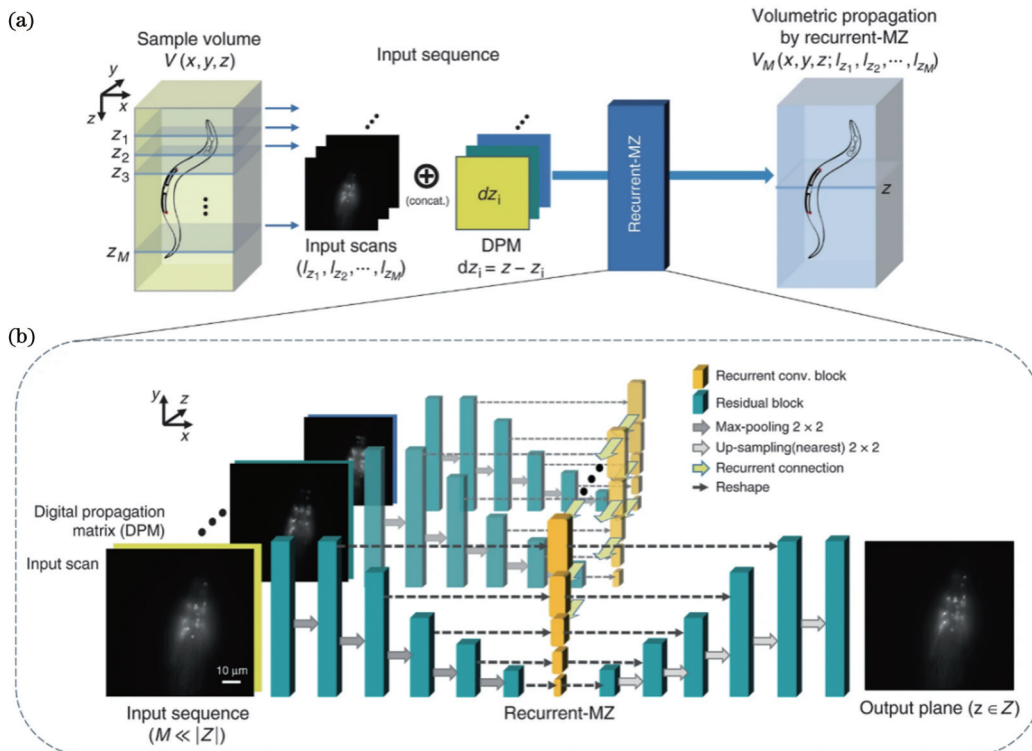


图 8 基于 Recurrent-MZ 的体积成像^[16]。(a)Recurrent-MZ 体积成像框架;(b)Recurrent-MZ 网络结构

Fig. 8 Volumetric imaging based on Recurrent-MZ^[16]. (a) Recurrent-MZ volumetric imaging framework; (b) Recurrent-MZ network structure

疏的宽场图像作为输入,进一步增大了深度神经网络的成像深度,将宽场三维成像所需的机械扫描次数减少为原来的 1/30。重要的是,现有的基于深度学习的图像处理方法,大多是针对单次拍摄的结果进行优化,而 Recurrent MZ 展示了循环神经网络在处理序列图像数据时能够挖掘隐藏在其中的大量样本三维信息分布的潜力。同样的该框架也升级为 Recurrent MZ+ 用于实现宽场共聚焦之间的跨模态转换。2021 年,季向

阳团队受 Deep-Z 的启发,提出了基于 3D GAN 的 WFCON-Net 架构,用于实现宽场和共聚焦图像之间的跨模态转换,获得厚散射样品 40 μm 的成像深度,该结果比已有的三维成像技术提高了 5 倍^[89]。厚散射组织样品的不同层间有较强的串扰,所以研究者利用三维卷积网络来探索这种层间关系,该网络基于宽场显微镜实现了高分辨率、高对比度的厚散射样本的 3D 重建,模型结构如图 9 所示。

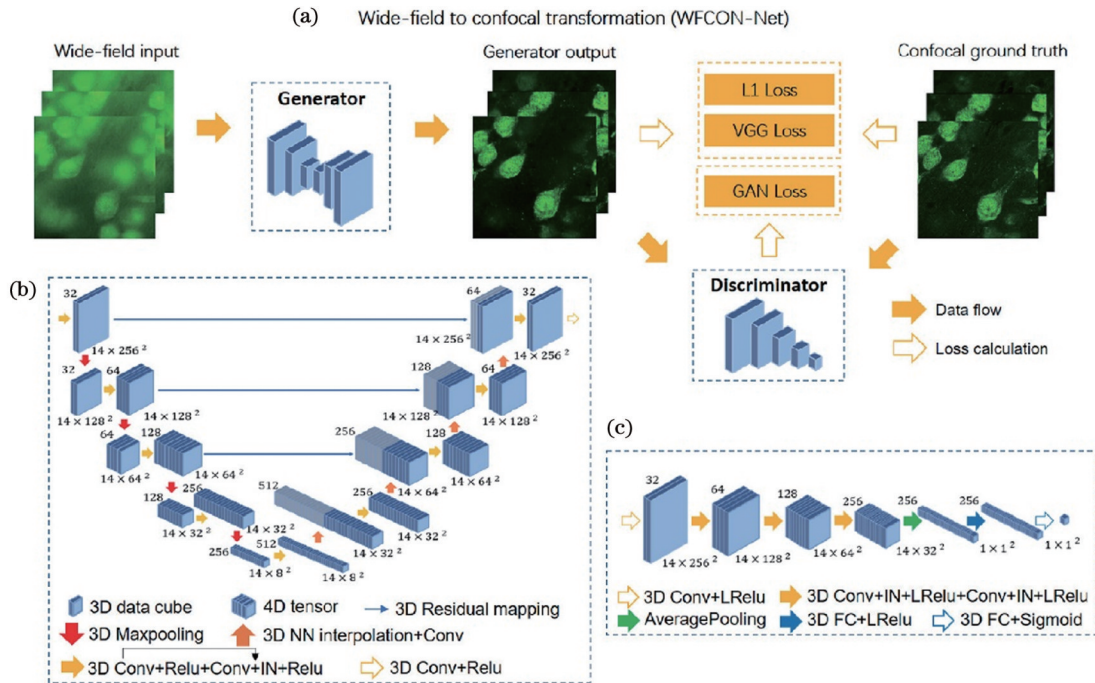


图 9 WFCON-Net 体系结构^[89]。(a)基于三维 GAN 的 WFCON-Net; (b)生成器的网络结构; (c)鉴别器的网络结构
Fig. 9 Overview of WFCON-Net architecture^[89]. (a) WFCON-Net based on 3D GAN; (b) network architecture of generator; (c) network architecture of discriminator

对于上述用于实现宽场与共聚焦之间模态转换的几种深度学习网络,它们的训练数据来自两个完全不同的成像显微镜,并且需要对齐和配准,所以实验数据不容易获取。然而,结构照明显微镜可以通过控制结构光生成元件的开关,实现宽场和光切片两种成像模式。当深度学习用于实现宽场与 SIM 之间的跨模态转化时,训练数据的获取就变得十分简单,而且不需要额外对齐和配准。SIM 作为一种宽场三维成像技术,需要多张原始图像才能实现层切,而深度学习可以将普通宽场显微镜拍摄的单张宽场图像转换为高质量的光学切片图像,提高了宽场显微镜的三维成像能力。2018 年,Zhang 等^[17]首次提出基于 CNN 模型对成对的宽场与光切片 SIM 图像进行训练,该方法生成图像的分辨率和背景信息去除效果与传统的光学切片方法相似,且拥有更低的噪声水平和更高的成像深度。一幅 1600 pixel \times 1600 pixel 图像的重建频率达到了 14 Hz,这种经济有效的方法使得高通量的光学切片技术得以发展。但是 CNN 在处理训练集中未曾出现过的图像特征光切片时重建效果并不好,该团队在 2020 年进一

步开发了一个类似于 U-Net 结构的 CNN,用于小鼠脑神经数据中复杂特征的学习和提取^[90]。该网络在恢复小鼠脑神经中不同标记的图像特征时取得了较好的结果,网络的泛化能力得到了提升。在 1.5 d 内完成了体积为 0.32 μm \times 0.32 μm \times 2.00 μm 的小鼠全脑的定位,成像结果如图 10(a)~(d) 所示。深度学习带来的另一个好处就是能够抑制噪声和去除伪影。2021 年,Zhuge 等^[91]通过图像翻译的条件生成对抗网络(cGAN),进一步展示了 GAN 从宽视场图像堆栈中恢复三维光学切片体积的潜力。图 10(e) 为 cGAN 模型在根治性前列腺切除术中的应用。后续通过对比 Zhang 等^[17]提出的 CNN,证实他们提出的 GAN 能够恢复出更真实的光切片图像。

在彩色三维成像领域,姚保利团队在 2020 年提出了一种基于宽视场显微镜通过深度学习实现全彩色光学切片的成像方法(FC-WFM-Deep)^[92]。图 11 为 FC-WFM-Deep 成像系统原理图。它可以代替全彩 SIM(FC-SIM)方法直接从全彩宽场图像中重建高质量的全彩三维切片图像,重建结果称为景深范围内的光切

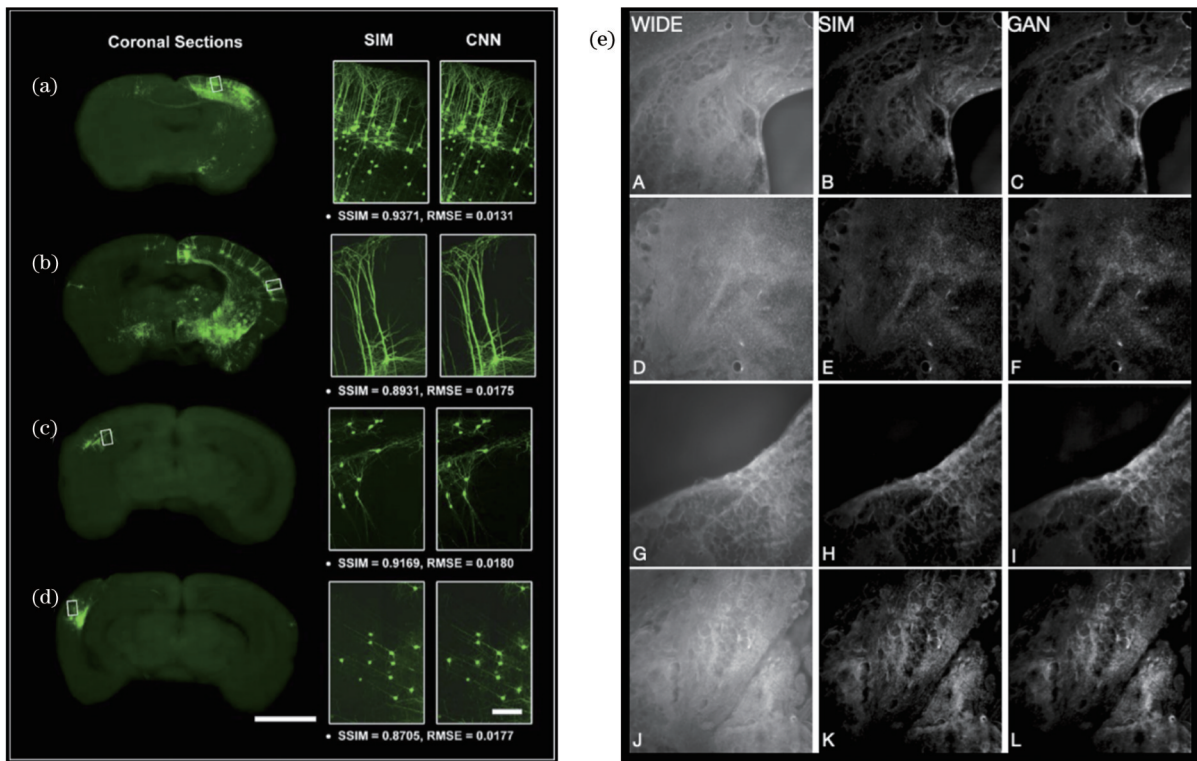


图 10 深度学习模型的图像处理结果。(a)~(d) 四只小鼠大脑的典型冠状最大强度投影(MIPs)^[90]; (e) cGAN 模型在根治性前列腺切除术中的应用^[91]
 Fig. 10 Image processing results of deep learning model. (a)–(d) Typical coronal maximum intensity projections of four mouse brains^[90]; (e) application of cGAN model in radical prostatectomy^[91]

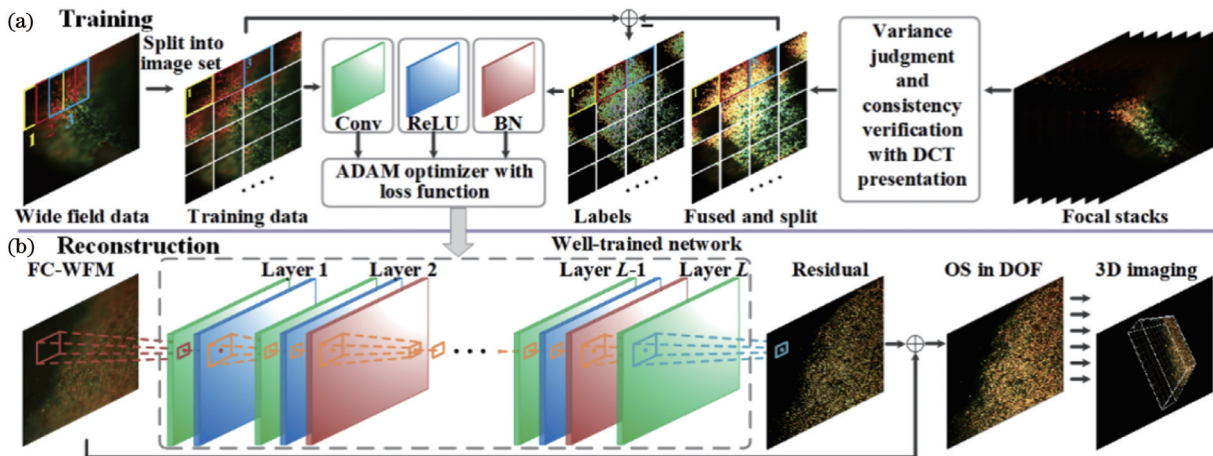


图 11 FC-WFM-Deep 成像系统原理图^[92]。(a) 使用宽场(WF)图像和相应的合成光切片(OS)参考图像训练网络; (b) 使用训练过的网络重建出由 OS in DOF 组成的高质量输出图像
 Fig. 11 Schematics of FC-WFM-Deep imaging system^[92]. (a) Training network using wide field (WF) image and corresponding composite optical sectioning (OS) reference image; (b) reconstructing high-quality output image consisting of OS in DOF using trained network

片(OS in DOF)。该方法在保证成像质量的同时,成像数据量减少为 FC-SIM 的 1/21,极大地减轻了重建数据的采集负荷。

深度学习能够使普通宽场显微镜生成与共聚焦显微镜和 SIM 一样的图像结果,还可以提升其他类别显微镜的性能。例如, Ling 等^[93] 利用深度学习,使用三张原始的 SIM 图像重建了一幅超分辨率图像。Jin 等^[94] 使用 U-Net 网络将重建所需的原始 SIM 图像数量

减少为原来的 1/5,还展示了深度学习从低质量的输入图像中重建光切片的能力。这些技术虽然是以结构光照明显微镜的拍摄结果作为模型的初始输入,但都展现了深度学习强大的数据处理和挖掘能力以及与多种显微成像技术相结合的灵活性。

4.3 小结

深度学习网络辅助宽场成像不需要任何硬件修改,就能够提高宽场显微镜的性能以实现样品的三维

恢复和重建。该技术降低了硬件成本,显著提高了三维成像速度。而且现有的深度学习框架经过适当的训练后,可以与其他先进光学显微成像技术结合,完成各种类型的成像实验,灵活性强,用途广泛。

深度学习网络也有一定的局限性。例如深度学习模型需要大量的用于训练的标签数据。如进行跨模态图像转换时,需要使用不同的成像显微镜对样品同一区域进行成像并配准,这样才可获得一对标签数据。用于训练的数据太少会导致生成模型的泛化性较差,对于未出现在训练集中的图像特征,处理结果不理想。通过图像增强能够增加训练数据量,有助于提升模型的数据处理能力。

5 总结与展望

三维成像是现代显微成像的一个重要研究领域,而传统的三维显微成像技术受限于复杂的成像装置和扫描模式,无法高效地完成大体积样品的三维成像。宽场显微镜具有装置简单、成像速度快等优点。尤其是在生命医学成像应用的领域,宽场成像方式可以减少扫描时间过长或激光功率太高带来的光毒性和光漂白。概述了三种与计算机科学相结合的三维宽场成像技术,即聚焦形貌恢复技术、结构光照明成像技术和深度学习技术,分别介绍了它们的成像原理以及研究发展过程,并进行了讨论与评价。无论是改变光路的硬件设计,还是利用算法对图像进行处理,这些宽场三维成像技术在去除离焦信息干扰的同时都得到了较好的结果。然而这些技术也不是完美的:SFH 的硬件系统简单,多应用于样品表面形貌测量,可以进一步结合深度学习技术,拓展其在深层样品成像领域的应用;SIM 技术的成像数据量是普通宽场显微镜的 2~3 倍,成像速度仍有提升的空间;而深度学习生成的图像质量会受网络设计和训练数据量等的影响,需要不断积累有效数据量以及通过图像增强帮助网络训练以提升网络的有效性和泛化性,现有网络的训练速度都很慢,有待加快。深度学习的灵活性允许其与 SFH 和 SIM 等技术相结合,这样可进一步扩展它们的应用范围,推进宽场三维显微成像领域的不断发展。

宽场显微镜与计算机科学相结合是近些年光学成像发展的一个趋势,随着计算机科学的不断发展以及各种算法的不断改进,图像数据的处理能力得到了很大的提升,这使得显微镜拥有了更多突破传统局限的能力。相信在不久的将来,这些基于宽场成像的快速三维显微镜定会在生物医学、材料科学以及精密制造等诸多领域中取得长足发展,更好地助力相关科学问题的研究。

参 考 文 献

- [1] Wilson T, Masters B R. Confocal microscopy[J]. Applied Optics, 1994, 33(4): 565-566.
- [2] Dinsmore A D, Weeks E R, Prasad V, et al. Three-dimensional confocal microscopy of colloids[J]. Applied Optics, 2001, 40(24): 4152-4159.
- [3] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.
- [4] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.
- [5] Park J H, Sun W, Cui M. High-resolution *in vivo* imaging of mouse brain through the intact skull[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(30): 9236-9241.
- [6] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. Science, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [7] Neil M A A, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope[J]. Optics Letters, 1997, 22(24): 1905-1907.
- [8] 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.
- [9] Huisken J, Swoger J, del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. Science, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [10] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 417-423.
- [11] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. Science, 2014, 346(6208): 1257998.
- [12] Mahou P, Vermot J, Beaurepaire E, et al. Multicolor two-photon light-sheet microscopy[J]. Nature Methods, 2014, 11(6): 600-601.
- [13] Nayar S K, Nakagawa Y. Shape from focus[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1994, 16(8): 824-831.
- [14] Zuo C, Qian J M, Feng S J, et al. Deep learning in optical metrology: a review[J]. Light: Science & Applications, 2022, 11: 39.
- [15] Wu Y C, Rivenson Y, Wang H D, et al. Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning[J]. Nature Methods, 2019, 16(12): 1323-1331.
- [16] Huang L Z, Chen H L, Luo Y L, et al. Recurrent neural network-based volumetric fluorescence microscopy[J]. Light: Science & Applications, 2021, 10: 62.
- [17] Zhang X Y, Chen Y F, Ning K F, et al. Deep learning optical-sectioning method[J]. Optics Express, 2018, 26(23): 30762-30772.
- [18] Prevedel R, Yoon Y G, Hoffmann M, et al. Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy[J]. Nature Methods, 2014, 11(7): 727-730.
- [19] Li H, Guo C, Kim-Holzappel D, et al. Fast, volumetric live-cell imaging using high-resolution light-field microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 10(1): 29-49.
- [20] Kim H M, Yoo Y J, Lee J M, et al. A wide field-of-view light-field camera with adjustable multiplicity for practical applications[J]. Sensors, 2022, 22(9): 3455.
- [21] Wang Z J, Cai Y N, Liang Y S, et al. Single shot, three-dimensional fluorescence microscopy with a spatially rotating point spread function[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(12): 5493-5506.
- [22] Wang Z J, Cai Y N, Qian J, et al. Hybrid multifocal structured illumination microscopy with enhanced lateral resolution and axial localization capability[J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(6): 3058-3070.
- [23] 曹博, 曹慧群, 林丹樱, 等. 双螺旋点扩散函数技术及应用研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(18): 1800001.
- [24] Cao B, Cao H Q, Lin D Y, et al. Research progress of double-helix point spread function engineering and its application[J].

- Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(18): 1800001.
- [24] Stokseth P A. Properties of a defocused optical system[J]. Journal of the Optical Society of America, 1969, 59(10): 1314-1321.
- [25] Jang H S, Yun G, Mutahira H, et al. A new focus measure operator for enhancing image focus in 3D shape recovery[J]. Microscopy Research and Technique, 2021, 84(10): 2483-2493.
- [26] Zhang Z Q, Liu F, Zhou Z J, et al. Roughness measurement of leaf surface based on shape from focus[J]. Plant Methods, 2021, 17(1): 72.
- [27] Pertuz S, Garcia M A, Puig D, et al. A closed-form focus profile model for conventional digital cameras[J]. International Journal of Computer Vision, 2017, 124(3): 273-286.
- [28] Sahay R R, Rajagopalan A N. A model-based approach to shape from focus[C] // Third International Conference on Computer Vision Theory & Applications DBLP, January 22-25, 2008, Funchal, Madeira, Portugal. Rheinhausen: Institute for Systems and Technologies of Information, Control and Communication, 2008: 243-250.
- [29] Huang W, Jing Z L. Evaluation of focus measures in multi-focus image fusion[J]. Pattern Recognition Letters, 2007, 28(4): 493-500.
- [30] Wee C Y, Paramesran R. Measure of image sharpness using eigenvalues[J]. Information Sciences, 2007, 177(12): 2533-2552.
- [31] Sun Y, Duthaler S, Nelson B J. Autofocusing in computer microscopy: selecting the optimal focus algorithm[J]. Microscopy Research and Technique, 2004, 65(3): 139-149.
- [32] Yang G, Nelson B J. Wavelet-based autofocusing and unsupervised segmentation of microscopic images[C] // Proceedings 2003 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS 2003(Cat. No. 03CH37453), October 27-31, 2003, Las Vegas, NV, USA. New York: IEEE Press, 2003: 2143-2148.
- [33] Baina J, Dublet J. Automatic focus and iris control for video cameras[C] // Fifth International Conference on Image Processing and its Applications, July 4-6, 1995, Edinburgh. London: IET, 2002: 232-235.
- [34] Shen C H, Chen H H. Robust focus measure for low-contrast images[C] // 2006 Digest of Technical Papers International Conference on Consumer Electronics, January 7-11, 2006, Las Vegas, NV, USA. New York: IEEE Press, 2006: 69-70.
- [35] 王秀峰, 孙小伟, 王加科, 等. 余弦变换与拉普拉斯算子结合的聚焦评价方法[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(24): 2410005. Wang X F, Sun X W, Wang J K, et al. Focus measure operator combining cosine transform and Laplacian operator[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(24): 2410005.
- [36] Pertuz S, Puig D, Garcia M A. Analysis of focus measure operators for shape-from-focus[J]. Pattern Recognition, 2013, 46(5): 1415-1432.
- [37] 尚明皓, 余飞鸿. 变焦显微三维测量系统的研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(16): 1600002. Shang M H, Yu F H. Research on microscopic 3D measurement system based on focus variation[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(16): 1600002.
- [38] Xiong Y, Shafer S A. Depth from focusing and defocusing[C] // Proceedings of IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, June 15-17, 1993, New York, NY, USA. New York: IEEE Press, 1993: 68-73.
- [39] Marshall J A, Burbeck C A, Ariely D, et al. Occlusion edge blur: a cue to relative visual depth[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1996, 13(4): 681-688.
- [40] Malik A S, Choi T S. Consideration of illumination effects and optimization of window size for accurate calculation of depth map for 3D shape recovery[J]. Pattern Recognition, 2007, 40(1): 154-170.
- [41] Montgomery D C, Runger G C. Applied statistics and probability for engineers[J]. European Journal of Engineering Education, 1994, 19(4): 516-517.
- [42] Yan T, Hu Z G, Qian Y H, et al. 3D shape reconstruction from multifocus image fusion using a multidirectional modified Laplacian operator[J]. Pattern Recognition, 2020, 98: 107065.
- [43] Subbarao M, Choi T. Accurate recovery of three-dimensional shape from image focus[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1995, 17(3): 266-274.
- [44] Choi T S, Yun J. Three-dimensional shape recovery from the focused-image surface[J]. Optical Engineering, 2000, 39(5): 1321-1326.
- [45] Asif M, Choi T S. Shape from focus using multilayer feedforward neural networks[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2001, 10(11): 1670-1675.
- [46] Ahmad M B, Choi T S. A heuristic approach for finding best focused shape[J]. IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology, 2005, 15(4): 566-574.
- [47] Ahmad M B, Choi T S. Shape from focus using optimization technique[C] // 2006 IEEE International Conference on Acoustics Speech and Signal Processing Proceedings, May 14-19, 2006, Toulouse, France. New York: IEEE Press, 2006.
- [48] Shim S O, Choi T S. A novel iterative shape from focus algorithm based on combinatorial optimization[J]. Pattern Recognition, 2010, 43(10): 3338-3347.
- [49] Muhammad M S, Choi T S. Sampling for shape from focus in optical microscopy[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2012, 34(3): 564-573.
- [50] Jang H S, Muhammad M S, Choi T S. Optimizing image focus for shape from focus through locally weighted non-parametric regression[J]. IEEE Access, 2019, 7: 74393-74400.
- [51] Mahmood M T, Choi T S. Nonlinear approach for enhancement of image focus volume in shape from focus[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2012, 21(5): 2866-2873.
- [52] Wang Z J, Lei M, Yao B L, et al. Compact multi-band fluorescent microscope with an electrically tunable lens for autofocusing[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(11): 4353-4364.
- [53] Jabbour J M, Malik B H, Olsovsky C, et al. Optical axial scanning in confocal microscopy using an electrically tunable lens [J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(2): 645-652.
- [54] Philipp K, Smolarski A, Koukourakis N, et al. Volumetric HiLo microscopy employing an electrically tunable lens[J]. Optics Express, 2016, 24(13): 15029-15041.
- [55] Zhou H, Zhang X F, Xu Z J, et al. Universal membrane-based tunable liquid lens design for dynamically correcting spherical aberration over user-defined focal length range[J]. Optics Express, 2019, 27(26): 37667-37679.
- [56] Minhas R, Mohammed A A, Wu Q M J, et al. 3D shape from focus and depth map computation using steerable filters[M] // Kamel M, Campilho A. Image analysis and recognition. Lecture notes in computer science. Heidelberg: Springer, 2009, 5627: 573-583.
- [57] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2000, 198(2): 82-87.
- [58] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [59] Rego E H, Shao L, Macklin J J, et al. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(3): E135-E143.
- [60] Ford T N, Lim D, Mertz J. Fast optically sectioned fluorescence HiLo endomicroscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(2): 021105.
- [61] Zhou X, Lei M, Dan D, et al. Double-exposure optical sectioning structured illumination microscopy based on Hilbert transform reconstruction[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120892.
- [62] Dan D, Yao B L, Lei M. Structured illumination microscopy for

- super-resolution and optical sectioning[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(12): 1291-1307.
- [63] Lim D, Chu K K, Mertz J. Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy[J]. Optics Letters, 2008, 33(16): 1819-1821.
- [64] Monneret S, Rauzi M, Lenne P F. Highly flexible whole-field sectioning microscope with liquid-crystal light modulator[J]. Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 2006, 8(7): S461-S466.
- [65] Dan D, Lei M, Yao B L, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1116.
- [66] Qian J, Lei M, Dan D, et al. Full-color structured illumination optical sectioning microscopy[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14513.
- [67] Zhou X, Lei M, Dan D, et al. Image recombination transform algorithm for superresolution structured illumination microscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(9): 096009.
- [68] Wicker K, Heintzmann R. Single-shot optical sectioning using polarization-coded structured illumination[J]. Journal of Optics, 2010, 12(8): 084010.
- [69] Patorski K, Trusiak M, Tkaczyk T. Optically-sectioned two-shot structured illumination microscopy with Hilbert-Huang processing [J]. Optics Express, 2014, 22(8): 9517-9527.
- [70] Gong H, Xu D L, Yuan J, et al. High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12142.
- [71] Qian J, Dang S P, Wang Z J, et al. Large-scale 3D imaging of insects with natural color[J]. Optics Express, 2019, 27(4): 4845-4857.
- [72] 千佳, 党诗沛, 周兴, 等. 基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法[J]. 物理学报, 2020, 69(12): 128701.
- Qian J, Dang S P, Zhou X, et al. Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform[J]. Acta Physica Sinica, 2020, 69(12): 128701.
- [73] Wang Z J, Feng K, Yang F, et al. Breathing colour into fossils: a tomographic system for reconstructing the soft tissue microstructure of amber inclusions[J]. Optics and Lasers in Engineering, 2022, 148: 106775.
- [74] Zhao T Y, Feng K, Liu P Y, et al. Reconstructing the color 3D tomography of lunar samples[J]. Atomic Spectroscopy, 2022, 43(1): 6-12.
- [75] Karadaglić D, Wilson T. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy[J]. Micron, 2008, 39(7): 808-818.
- [76] Wang M R, Zhao T Y, Wang Z J, et al. Three-dimensional natural color imaging based on focus level correlation algorithm using structured illumination microscopy[J]. Frontiers in Physics, 2022, 10: 1041577.
- [77] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning[J]. Nature, 2015, 521(7553): 436-444.
- [78] Schmidhuber J. Deep learning in neural networks: an overview[J]. Neural Networks, 2015, 61: 85-117.
- [79] Wainberg M, Merico D, Delong A, et al. Deep learning in biomedicine[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(9): 829-838.
- [80] Belthangady C, Royer L A. Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction[J]. Nature Methods, 2019, 16(12): 1215-1225.
- [81] Rivenson Y, Göröcs Z, Günaydin H, et al. Deep learning microscopy[J]. Optica, 2017, 4(11): 1437-1443.
- [82] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(5): 460-468.
- [83] Wu Y C, Luo Y L, Chaudhari G, et al. Bright-field holography: cross-modality deep learning enables snapshot 3D imaging with bright-field contrast using a single hologram[J]. Light: Science & Applications, 2019, 8: 25.
- [84] de Haan K, Rivenson Y, Wu Y C, et al. Deep-learning-based image reconstruction and enhancement in optical microscopy[J]. Proceedings of the IEEE, 2020, 108(1): 30-50.
- [85] Weigert M, Schmidt U, Boothe T, et al. Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2018, 15(12): 1090-1097.
- [86] Barbastathis G, Ozcan A, Situ G H. On the use of deep learning for computational imaging[J]. Optica, 2019, 6(8): 921-943.
- [87] Goodfellow I, Pouget-Abadie J, Mirza M, et al. 2014. Generative adversarial nets[C] // Proceedings of the 27th International Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS' 14), December 8-13, 2014, Montreal, Canada. Cambridge: The MIT Press, 2014: 2672-2680.
- [88] Liu Z, Jin L, Chen J, et al. A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis[J]. Computers in biology and medicine. 2021, 134: 104523.
- [89] Li B W, Tan S Y, Dong J Y, et al. Deep-3D microscope: 3D volumetric microscopy of thick scattering samples using a wide-field microscope and machine learning[J]. Biomedical Optics Express, 2021, 13(1): 284-299.
- [90] Ning K F, Zhang X Y, Gao X F, et al. Deep-learning-based whole-brain imaging at single-neuron resolution[J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(7): 3567-3584.
- [91] Zhuge H M, Summa B, Hamm J, et al. Deep learning 2D and 3D optical sectioning microscopy using cross-modality Pix2Pix cGAN image translation[J]. Biomedical Optics Express, 2021, 12(12): 7526-7543.
- [92] Bai C, Qian J, Dang S P, et al. Full-color optically-sectioned imaging by wide-field microscopy via deep-learning[J]. Biomedical Optics Express, 2020, 11(5): 2619-2632.
- [93] Ling C, Zhang C L, Wang M Q, et al. Fast structured illumination microscopy via deep learning[J]. Photonics Research, 2020, 8(8): 1350-1359.
- [94] Jin L H, Liu B, Zhao F Q, et al. Deep learning enables structured illumination microscopy with low light levels and enhanced speed [J]. Nature Communications, 2020, 11: 1934.

Advances in Rapid Three-Dimensional Wide Field Microscopy

Ren Jingrong^{1,2†}, Fu Xiangda^{1,2†}, Wang Mengrui^{1,2}, Zhao Tianyu^{1,2}, Wang Zhaojun^{1,2},
Feng Kun^{1,2}, Liang Yansheng^{1,2}, Wang Shaowei^{1,2}, Lei Ming^{1,2*}

¹MOE Key Laboratory for Nonequilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Xi'an 710049, Shaanxi, China;

²School of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract

Significance Three-dimensional (3D) imaging is an important research direction in microscopy and has been applied to many fields such as biomedicine and engineering science. Typical 3D microscopy techniques, such as laser confocal microscopy and multi-photon

microscopy, are based on laser point scanning geometry, and the imaging speed is limited by the scanning speed; therefore, biological samples are likely to be damaged under long scanning durations and high-intensity illumination.

Recently, wide-field microscopy with 3D imaging capability has received significant attention. Wide-field microscopy can yield complete two-dimensional imaging simultaneously and affords temporal resolutions higher than spot scanning by two to three orders of magnitude. Additionally, wide-field imaging offers high-quality grayscale images and fewer samples to be damaged, thus rendering it suitable for the real-time observation of living samples. However, conventional wide-field microscopy suffers from defocused backgrounds and low axial resolutions. Owing to the rapid development of computer science and optical technology, various algorithms and techniques for processing wide-field images have been proposed to improve their axial resolutions, thus providing more possibilities for 3D imaging.

We focus on three types of rapid 3D wide-field microscopy techniques, i. e., shape of focus (SFF), structural illumination microscopy (SIM), and deep learning-assisted 3D imaging. The SFF technique enables the extraction of focal plane information by processing a series of image stacks and reconstructing the 3D morphology of samples without requiring specific hardware. In SIM, samples are illuminated by phase-shifted light fields with high spatial frequencies, images are captured using a CCD camera, and the in- and out-focus information can be effectively separated using decoding algorithms. Deep learning models can learn the mapping relationship between different types of images from a large amount of data, such as the conversion between wide-field images and confocal images; this is a simple method to obtain high-quality images. The trained model can remove the background information of wide-field microscopic images to improve the axial resolution of imaging, thus facilitating the realization of 3D imaging via wide-field microscopy.

It is believed that rapid 3D microscopes based on wide-field imaging will be applied to many fields such as biomedicine, materials science, and precision manufacturing in the near future.

Progress This paper focuses on three rapid wide-field 3D imaging techniques, namely, SFF, SIM, and deep learning-assisted 3D imaging.

In the SFF technique, a focusing evaluation operator is used to calculate and extract the highest focus position of each pixel from a wide-field image stack; subsequently, the 3D depth image of the sample is reconstructed via a recovery algorithm, which is mainly used for surface topography measurement. We investigate the effect of the focused evaluation operator on the calculation results yielded by the SFF technique in different cases. Additionally, we discuss the development and application of the focused topography recovery operator and the optimization of related hardware.

Optical sectioning SIM utilizes encoded structured light fields to illuminate the sample and then recovers the 3D information of the sample using decoding algorithms, which can be used for both fluorescent and non-fluorescent imaging. We introduce the theoretical basis of optical sectioning SIM and then propose various rapid decoding algorithms for improving the reconstruction speed. Then, we discuss the development of related techniques and their most recent applications in the field of 3D color imaging.

Deep learning-assisted 3D imaging applies the learning ability of neural network models to complete target image tasks, such as the conversion between wide-field and confocal images as well as that between wide-field microscopy and SIM so as to achieve wide-field 3D imaging. We present the theoretical basis of deep learning-related models. Subsequently, we discuss the development and application of deep learning models for conversion between wide-field and confocal images as well as that between wide-field microscopy and SIM, followed by the applications of deep learning for achieving more rapid SIM imaging.

Finally, we discuss the current problems and future research directions for rapid 3D wide-field microscopy techniques.

Conclusions and Prospects Rapid 3D wide-field microscopy techniques have demonstrated performance improvement either through hardware modification or software assistance. However, these techniques are not perfect. SFF combined with other techniques is expected to benefit deep tissue imaging. The amount of SIM imaging data is two to three times that of the conventional wide-field microscopy, and the imaging speed of SIM can be further improved. Deep learning can be flexibly combined with other technologies. In summary, the potential of wide-field microscopy with 3D imaging capability is yet to be realized. Progress in technology and cross integration will enable the routine use of rapid 3D wide-field microscopy techniques in biomedical laboratories.

Key words bio-optics; wide field microscope; 3D imaging; shape from focus; structured illumination microscope; deep learning