

基于空间高斯滤波的超分辨光学波动成像算法

李蕊¹ 屈惠明¹ 张运海^{2*} 姜杉²

¹南京理工大学电子工程与光电技术学院, 江苏 南京 210049

²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

摘要 为了提高超分辨光学波动成像(SOFI)显微技术的实时性,提出了一种结合图像滤波的 SOFI 算法。对获取的多帧图像先进行滤波处理,再根据多帧图像中荧光粒子的时间自相关性进行 SOFI 算法处理,可快速得到高信噪比的超分辨图像。结果表明,对比不同滤波器,权衡去噪效果和图像分辨率,利用基于空间高斯滤波的 SOFI 算法可以在低信噪比的图像序列中快速得到信噪比较高的超分辨图像,计算速度提高 2.3 倍。

关键词 图像处理; 超分辨; 光学波动; 滤波去噪

中图分类号 O439 文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP53.081001

Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging Algorithm Based on Spatial Gaussian Filter

Li Rui¹ Qu Huiming¹ Zhang Yunhai² Jiang Shan²

¹ School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology,
Nanjing, Jiangsu 210049, China

² Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract In order to achieve real-time imaging with superresolution optical fluctuation imaging (SOFI), a novel SOFI algorithm combined with image filtering is proposed. Multi-frame images should be filtering processing, and the super-resolution images with high signal-noise ratio are obtained utilizing SOFI algorithm depending on temporal self correlations of fluorescent particles in multi-frame images. The result show that the SOFI algorithm based on spatial Gaussian filter can get a high signal-noise ratio super-resolution image from the low signal-noise ratio image sequences, and the calculating speed can be accelerated to 2.3 times, comparing different filters, weighing denoising effect and image resolution.

Key words image processing; super-resolution; optical fluctuation; filtering denoising

OCIS codes 100.2000; 100.2960; 180.2520

1 引言

荧光显微技术在某些科学领域有着显著贡献,比如在生物学上,可以利用荧光显微技术对亚纳米尺度的微结构进行观测与分析。2014 年诺贝尔化学奖授予美国科学家 Eric Betzig、德国科学家 Stefan W. Hell 和美国科学家 William E. Moerner,表彰他们在发展超分辨荧光显微镜方面的贡献。超分辨荧光显微镜的出

收稿日期: 2016-03-10; 收到修改稿日期: 2016-04-26; 网络出版日期: 2016-07-27

基金项目: 国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1)、江苏省六大人才高峰资助项目(2012-swyy-020)、苏州应用基础研究计划项目(SYG201510)

作者简介: 李蕊(1992—),女,硕士研究生,主要从事图像处理方面的研究。E-mail: lirui@sibet.ac.cn

导师简介: 屈惠明(1967—),男,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事红外成像电子学理论和成像测试评估技术、红外成像应用等方面的研究。E-mail: huimingqu@163.com

* 通信联系人。E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn

现,突破了阿贝衍射极限,将分辨能力提升到了纳米量级,实现了超分辨荧光显微技术,大幅推动了生物学和医学的发展,为深入研究生命过程的分子机制提供了新的工具和新的机遇^[1-2]。超分辨率荧光显微镜利用了荧光分子的光开关特性,突破光学衍射极限,可以分为两类:1)对单个荧光分子随机进行高精度定位,如随机光学重建显微术(STORM)和光激活定位显微术(PALM)等^[3-4];2)采用预先设定的激发空间分布对荧光发射进行限制,如结构光照明显微术(SIM)和受激辐射损耗显微术(STED)等^[1,5-7]。

2009年,Dertinger等^[8]提出了一种以荧光波动统计分析为基础的超分辨成像技术,也称之为超分辨光学波动成像技术(SOFI)。SOFI具有成像速度相对较快、光毒性较小、可长时间观测活体生物样本、系统复杂性较低等优点^[9-11]。利用CCD拍摄获得一系列随时间波动的图像序列,由于同一个单一的荧光粒子具有时间自相关性,所以可以对图像的时间序列自相关计算直接产生高分辨图像。通过计算图像中每个像素的 n 阶时间累积量,在不进行后续去卷积算法的情况下,SOFI技术的分辨率比传统显微成像高 \sqrt{n} 倍^[8]。随着 n 值的增加,噪声和相邻像素去相关的效果得到了提升,便于得到高信噪比的超分辨图像。

计算高阶互相关SOFI图像时,为了得到指定位置的虚拟像素,可能用到的几个像素之间合理的互相关量的个数随 n (阶数)成指数增长,高阶算法不能确定最优的互相关几何结构^[12]。并且由于 n 阶时空互累积量的计算,随着 n 的增加,需要更长的计算时间和更大的计算内存,计算速度将会逐渐减慢^[13]。而且在实验中获取的图像序列存在噪声,将会影响传统SOFI图像分辨率,为了减小噪声对分辨率的影响,传统SOFI算法一般采用几千帧图像序列进行计算,这一方法并不适于SOFI技术的实时成像^[8,10,13]。现有的SOFI算法的改进方法可以分为两种:1)Stein等^[12]提出傅里叶SOFI算法,在探测器的像元尺寸较大时,可以得到图像质量更佳的超分辨图像,但是没有考虑图像处理的计算速度;2)Jiang等^[14]通过小波滤波器提高量子点涨落信号的提取效率,可以提高SOFI显微技术的时间分辨率,但是该方法的SOFI计算模型复杂,不利于提高计算速度。为了提高SOFI技术的计算速度,减小噪声对图像分辨率的影响,增强图像质量,本文提出了一种结合空间高斯滤波器的SOFI算法。空间高斯滤波SOFI算法对图像序列进行SOFI算法处理之前,先对低信噪比的图像进行滤波处理,然后进行二阶SOFI自相关计算,利用该算法不仅可以减少计算时间,还能够得到高信噪比超分辨图像。

2 原 理

SOFI成像系统简单易搭建,需要传统的宽场显微镜和一个探测器记录图像序列。SOFI成像的条件有三个:即荧光辐射体的荧光辐射至少需要具有亮暗两个态(或具有荧光强度可区分的多个态,即荧光点可以闪烁)、不同的荧光点之间的闪烁相互独立和成像CCD有效像元尺寸小于光学衍射极限。

假设样本中有 N 个荧光点,在图像采集过程中无漂移现象(即每个荧光点的位置保持不变),而且每个荧光点随时间变换都独立闪烁,与其他点无关。利用CCD拍摄一段连续时间内的图像序列,图像序列可以用时间相关函数表示为^[8]

$$F(r, t) = \sum_{i=1}^N U(r - r_i) \cdot \epsilon_i \cdot s_i(t), \quad (1)$$

式中 $F(r, t)$ 表示在 t 时刻, r 位置上的某一点的信号, r_i 表示样本中第 i 个荧光点的位置, ϵ_i 表示发光点的亮度常数, $s_i(t)$ 为一个时间相关的波动函数, $U(r - r_i)$ 是实验所用显微镜的点扩展函数(PSF),它与显微镜物镜的数值孔径成反比,显微镜的点扩展函数越小,说明这个显微镜的分辨能力越强。

为了得到二阶SOFI图像,计算这些图像的二阶自相关函数为^[8]

$$G_2(r, \tau) = \langle \delta F(r, t + \tau) \cdot \delta F(r, t) \rangle_t = \sum_{i=1}^N U^2(r - r_i) \cdot \epsilon_i^2 \cdot \langle \delta s_i(t + \tau) \delta s_i(t) \rangle, \quad (2)$$

二阶自相关SOFI产生了一个新的点扩展函数^[8]:

$$U(r) = \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\omega_0^2} - \frac{z^2}{2\omega_{0z}^2}\right)$$

$$\Rightarrow U^2(r) = \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\tilde{\omega}_0^2} - \frac{z^2}{2\tilde{\omega}_{0z}^2}\right), \quad (3)$$

式中 $\tilde{\omega}_{0z} = \frac{\omega_{0z}}{\sqrt{2}}$, $\tilde{\omega}_0 = \frac{\omega_0}{\sqrt{2}}$, ω 是点扩展函数的半峰全宽, ω_{0z} 是 z 方向上的点扩展函数半峰全宽, ω_0 是 x 、 y 方向上的点扩展函数半峰全宽。定量分析 SOFI 算法的结果, 假设所用光学系统的点扩展函数可以等价于一个三维的高斯分布函数, 那么从(3)式可以看到, 图像经二阶 SOFI 算法处理后, 新图像的有效点扩展函数在每一个方向都减小了 $\sqrt{2}$ 倍, 从而增强了二阶 SOFI 图像的光学分辨能力。

3 模拟数据分析

采用 Matlab 软件来实现荧光点的图像序列模拟和计算分析。根据荧光点的发光特性, 首先模拟 1000 张独立随机闪烁的荧光点图像序列, 荧光点分布如图 1 所示。



图 1 荧光点排列

Fig. 1 Distribution of emitters

图 1 为 6 列排列相同的荧光点分布图(前三列与后三列对称), 每一列从上至下分别为一个荧光点, 两个距离分别为 107, 120, 160, 170, 214, 267 nm 的荧光点。模拟光学系统的点扩展函数为高斯型, 半峰全宽约为 187 nm。理论上, 此图像序列 SOFI 处理后的分辨率为 132 nm, 但是噪声的存在, 会对分辨率造成一定影响。在模拟序列图中加上噪声, 考虑到实验情况及简化模型, 选择加入高斯随机白噪声。高斯噪声模型为

$$p(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp[-(z - \mu)^2 / (2\sigma^2)], \quad (4)$$

式中 μ 表示噪声均值, σ 表示噪声方差。

虽然通过计算累积量可以有效去除时间不相关噪声, 但是在图像序列的拍摄中, 会产生与时间相关的信号, 仅利用 SOFI 算法并不能去除, 因此在采用 SOFI 算法之前需要先对图像去噪, 抑制部分与时间相关的噪声, 同时不会对图像造成太大影响, 还能够增强图片的质量。图像的去噪处理方法基本上可分为空间域法和变换域法两大类。空间域法是在原图像上直接进行数据运算, 对像素的灰度值进行处理。空间域法又可以分为两类: 1) 对图像作逐点运算, 称为点运算; 2) 在与处理像素点邻域有关的空间域上进行运算, 称为局部运算。变换域法是在图像的变换域上进行处理, 对变换后的系数进行相应的处理, 然后进行反变换达到图像去噪的目的。

3.1 滤波器的选择

选取不同滤波方法对图像进行处理, 讨论不同滤波器对图像的处理效果。在保证图像分辨率的情况下, 得到图像质量最好图片的滤波器作为优选。图 2(a) 是 1000 张噪声图像序列模型及其背景噪声分布(图中噪声范围任意选取, 控制下面各图噪声范围与此处相同), 标尺长度为 $1 \mu\text{m}$, 其中加入的噪声是均值为 0, 方差为 0.125 的高斯白噪声。采用不同滤波器与 SOFI 算法相结合对模型处理, 结果对比如图 2 所示。图 2(b) 为仅用 SOFI 算法处理图 2(a) 后的效果及其背景噪声分布; 图 2(c) 为结合频域理想滤波 SOFI 算法处理图 2(a) 后的效果及其背景噪声分布; 图 2(d) 为结合空间 disk 滤波 SOFI 算法处理图 2(a) 后的效果及其背景噪声分布; 图 2(e) 为结合频域高斯滤波 SOFI 算法处理图 2(a) 后的效果及其背景噪声分布; 图 2(f) 为结合空间高斯滤波 SOFI 算法处理图 2(a) 后的效果及其背景噪声分布; 图 2(g) 为结合空间均值滤波 SOFI 算

法处理图 2(a)后的效果及其背景噪声分布。

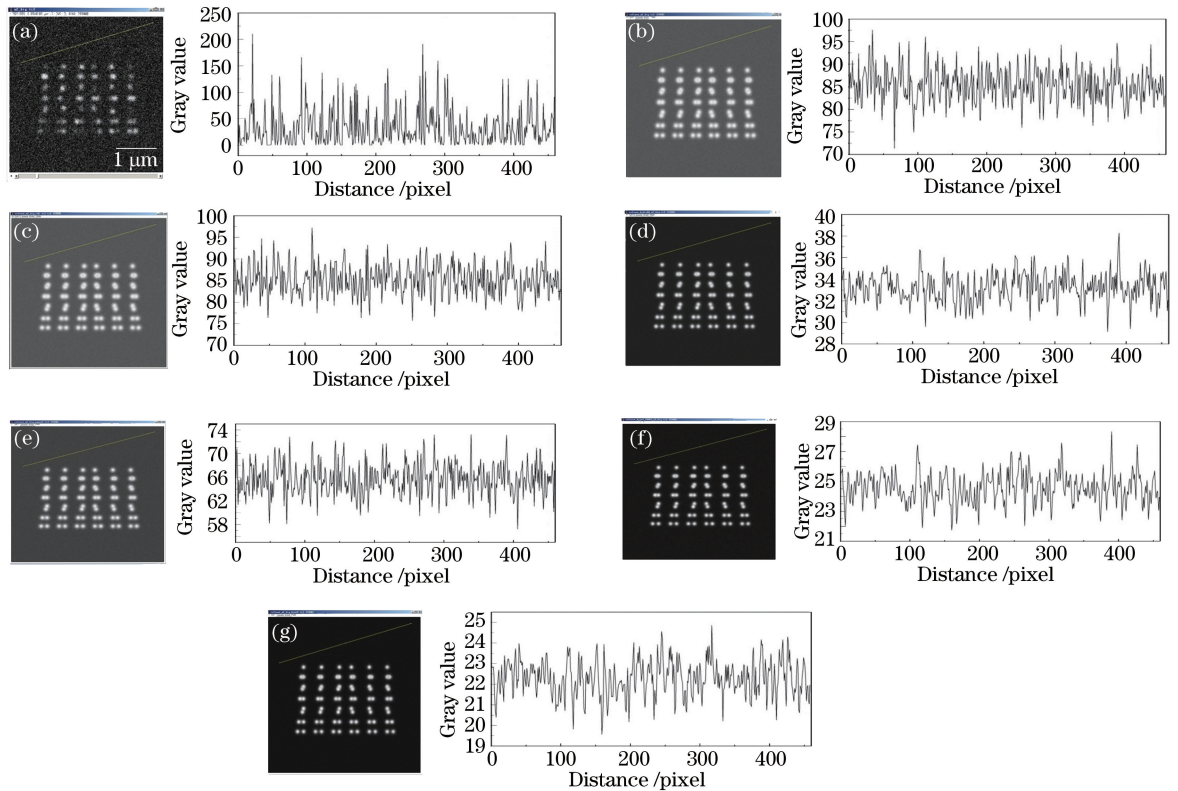


图 2 不同滤波器的滤波效果对比。(a)加入高斯白噪声的图像序列模型及其背景噪声分布;(b)SOFI算法处理;(c)频域理想滤波结合 SOFI 算法处理;(d)空间 disk 滤波结合 SOFI 算法处理;(e)频域高斯滤波结合 SOFI 算法处理;(f)空间高斯滤波结合 SOFI 算法处理;(g)空间均值滤波结合 SOFI 算法处理

Fig. 2 Comparison of filtering results with different filters. (a) Image sequences with Gaussian noise and the background noise distribution; (b) SOFI algorithm; (c) SOFI algorithm based on ideal filter in frequency domain; (d) SOFI algorithm based on disk filter in spatial domain; (e) SOFI algorithm based on Gaussian filter in frequency domain; (f) SOFI algorithm based on Gaussian filter in spatial domain; (g) SOFI algorithm based on average filter in spatial domain

图 2 中各图的分辨率如表 1 所示。由表 1 可知,传统 SOFI 算法得到的图像分辨率并没有达到理论值,说明噪声对获得的图像分辨率有一定影响,二阶 SOFI 算法并不能去除所有噪声。另外,可以看到经过空间高斯滤波,空间均值滤波,空间 disk 滤波这三种滤波方法结合 SOFI 算法得到的图像分辨率都不错,但相对于其他滤波器,空间高斯滤波 SOFI 算法得到的分辨率最佳。

表 1 不同滤波器对分辨率的影响

Table 1 Influence on resolution with different filters

Filter	No filter	Spatial disk filter	Frequency ideal filter	Frequency Gaussian filter	Spatial Gaussian filter	Spatial average filter
Resolution /nm	189.60	145.63	192.64	168.35	139.23	142.62

可通过与无噪声图像对比,计算图像的峰值信噪比(PSNR)来评估滤波器的去噪效果。当 PSNR 值越高,表明其去噪效果越好。图 2 中各图的 PSNR 如表 2 所示。

表 2 图 2 中各图的 PSNR 值

Table 2 PSNR value of the images in Fig.2

Filter	No filter	Spatial disk filter	Frequency ideal filter	Frequency Gaussian filter	Spatial Gaussian filter	Spatial average filter
PSNR	9.14	16.45	9.14	11.29	18.29	18.80

由表 2 可知,空间均值滤波 SOFI 图像质量更佳,但是由于均值滤波器易使图像细节和边缘模糊,所以图像的细节和边缘等特征表现为灰度值的尖锐变化,从而影响了图像的空间分辨率。

通过分析表 1 和表 2,从图像分辨率与去噪效果两方面来看,选用空间高斯滤波器可以获得较好的处理结果。

3.2 空间高斯滤波 SOFI 算法

拍摄 SOFI 图像序列时,每张图片曝光时间越长,信噪比越高。传统 SOFI 算法无法去除时间相关的噪声信号,为了提高 SOFI 图像的信噪比,一般做法是延长图像曝光时间,但是会导致整个图像序列获取时间随之延长,严重影响 SOFI 的实时性。本文算法不仅可以有效去噪,而且能够将曝光时间缩短,便于快速成像,即使得到的图像信噪比降低,仍可以得到分辨率较好的 SOFI 图像。通过仿真来验证本文算法的有效性,具体模拟过程如下。

利用含有不同方差噪声的图像作对比,滤波 SOFI 算法可以在信噪比较低的原图中得到高信噪比图像,对高信噪比图像进行二阶 SOFI 算法处理与对低信噪比图像进行空间高斯滤波二阶 SOFI 算法处理的结果对比如图 3 所示。图 3(a)为对 1000 张加入噪声方差为 0.03 的图像进行二阶 SOFI 算法处理结果,图 3(b)为对 1000 张加入噪声方差为 0.125 的图像进行空间高斯滤波 SOFI 算法处理结果,图 3(c)为图 3(a)、(b)中白线横截面强度分布的高斯拟合图像。

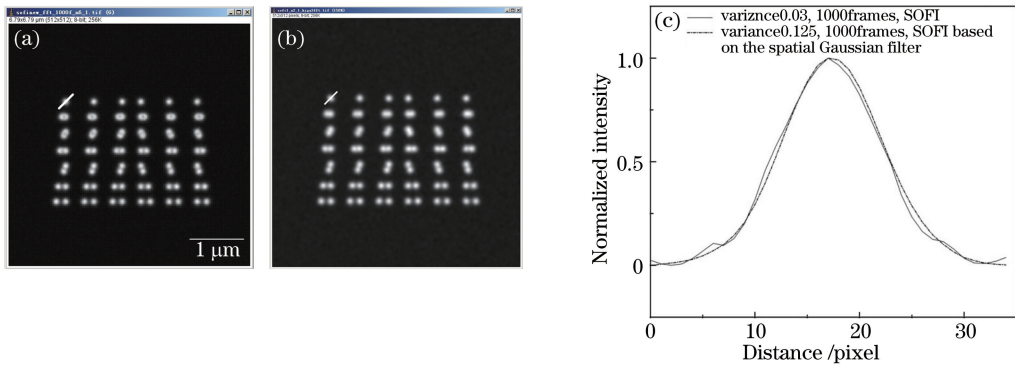


图 3 (a)对噪声方差为 0.03 的图像利用 SOFI 算法处理;(b)对噪声方差为 0.125 的图像利用空间高斯滤波 SOFI 算法处理;(c)白线横截面强度分布的高斯拟合曲线

Fig. 3 (a) Image with noise variance of 0.03 using SOFI algorithm; (b) image with noise variance of 0.125 using the spatial Gaussian filter SOFI algorithm; (c) Gaussian fitting curves of strength distribution of the white cross section profile

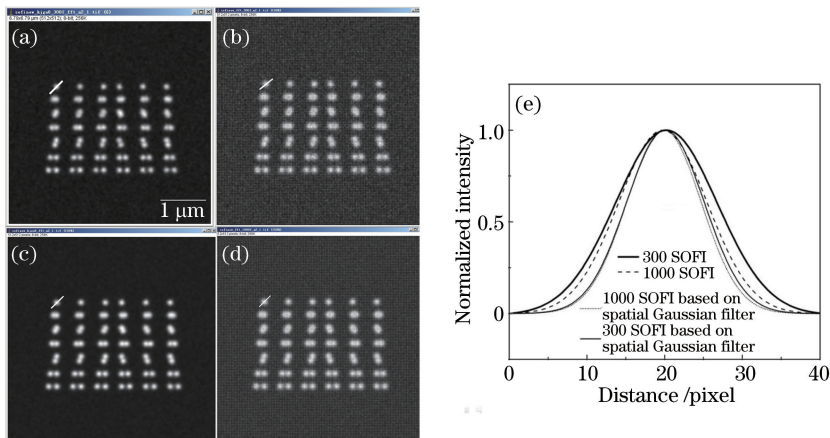


图 4 (a)对 300 张图像进行空间高斯滤波 SOFI 算法处理;(b)对 300 张图像进行 SOFI 算法处理;(c)对 1000 张图像进行空间高斯滤波 SOFI 算法处理;(d)对 1000 张图像进行 SOFI 算法处理;(e)白线横截面强度分布的高斯拟合曲线

Fig. 4 (a) 300 images processing with the spatial Gaussian filter SOFI algorithm; (b) 300 images processing with SOFI algorithm; (c) 1000 images processing with the spatial Gaussian filter SOFI algorithm; (d) 1000 images processing with SOFI algorithm; (e) Gaussian fitting curves of strength distribution of the white cross section profile

由图 3 可知,比较单个荧光点高斯拟合后点扩展函数的半峰全宽,图 4(a)分辨率为 147 nm,图 4(b)分辨率为 148 nm,由此可知在证明噪声增强的情况下,加入滤波器的 SOFI 算法可以达到噪声较小时传统 SOFI 算法得到的分辨率。本文算法不仅可以减小图像曝光时间,还能够对低信噪比的图像处理后得到较理想的超分辨图像。

滤波算法的计算速度对比如图 4 所示。图 4(a)为对 300 张加入噪声方差为 0.125 的图像进行空间高斯滤波二阶 SOFI 算法处理的结果,用时 72.65 s;图 4(b)为对 300 张加入噪声方差为 0.125 的图像进行二阶 SOFI 算法处理的结果,用时 69.29 s;图 4(c)为对 1000 张加入噪声方差为 0.125 的图像进行空间高斯滤波二阶 SOFI 算法处理的结果,用时 122.05 s;图 4(d)为对 1000 张加入噪声方差为 0.125 的图像进行二阶 SOFI 算法处理的结果,用时 171.16 s;图 4(e)为图 4(a)~(d)中白线横截面强度分布的高斯拟合图像。

对于低信噪比的图像,只采用传统 SOFI 算法,图像帧数越多图像质量越好,但是获取多帧图像需要更长时间,计算时间也长。比较不同帧数不同算法得到的单个荧光点高斯拟合后点扩展函数半峰全宽,可知图 4(a)分辨率为 156 nm,图 4(b)分辨率为 204 nm,图 4(c)分辨率为 150 nm,图 4(d)分辨率为 177 nm。通过图 4(a)和(b)分辨率对比或者图 4(c)和(d)分辨率对比可知,空间高斯滤波 SOFI 算法在图像帧数相同的条件下,得到的分辨率更高。对比图 4(a)和(c)可知,当采用空间高斯滤波 SOFI 算法时,300 张图像达到的分辨率和 1000 张基本相似(~ 156 nm),相对于原始图像序列的分辨率(~ 187 nm),分辨率提高了 1.2 倍,接近二阶 SOFI 分辨率理论极限值(~ 132 nm),同时计算速度提高了 1.6 倍。对比图 4(a)和(d),只对 300 张图像进行滤波后 SOFI 算法处理,分辨率比 1000 张传统 SOFI 算法处理后有所提高,而且计算时间减少了 2.3 倍。采用空间高斯滤波 SOFI 算法可以减少图像序列帧数,减小图像获取时间和计算时间,同时不影响图像分辨率,进而达到提高 SOFI 显微技术实时性的目的。

4 结 论

SOFI 成像技术有望在三维活体实时成像中得到应用,所提出的基于空间高斯滤波的 SOFI 算法,较之传统 SOFI 算法,可以在图像信噪比较低的情况下得到图像质量较好的超分辨图像,使 SOFI 图像获取过程不受信噪比限制,可以缩短图像获取时的曝光时间,以及减小 SOFI 所需的图像序列数,计算速度提高 2.3 倍,更好地实现 SOFI 技术的实时性。

参 考 文 献

- 1 Mao Zhengle, Wang Chen, Cheng Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: Breaking the diffraction barrier [J]. Chinese J Lasers, 2008, 35(9): 1283-1307.
毛峥乐, 王琛, 程亚. 超分辨远场生物荧光成像-突破光学衍射极限[J]. 中国激光, 2008, 35(9): 1283-1307.
- 2 Hao X, Kuang C, Gu Z, *et al.* From microscopy to nanoscopy via visible light [J]. Light: Science & Applications, 2013, 2(10): e108.
- 3 Quan Tingwei, Zeng Shaoqun, Lü Xiaohua. Comparison of algorithms for localization of single fluorescent molecule in super resolution imaging [J]. Chinese J Lasers, 2010, 37(11): 2714-2718.
全廷伟, 曾绍群, 吕晓华. 超分辨成像中荧光分子定位算法性能比较 [J]. 中国激光, 2010, 37(11): 2714-2718.
- 4 Cai Huanqing, Kuang Cuifang, Wang Yifan, *et al.* Superresolution microscopy imaging based on wide-field stochastic fluorescent bleaching [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(11): 111001.
蔡欢庆, 匡翠方, 王轶凡, 等. 基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法 [J]. 中国激光, 2013, 40(11): 111001.
- 5 Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy [J]. The Journal of Cell Biology, 2010, 190(2): 165-175.
- 6 Eggeling C, Willig K I, Sahl S J, *et al.* Lens-based fluorescence nanoscopy [J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2015, 48(02): 178-243.
- 7 Wu Meirui, Yang Xibin, Xiong Daxi, *et al.* Structured illumination fluorescence microscopy: Diffraction-limit breaking principle and application in life science [J]. Lasers & Optoelectronics Process, 2015, 52(1): 010003.
吴美瑞, 杨西斌, 熊大曦, 等. 结构光照明荧光显微镜突破衍射极限的原理和在生命科学中的应用 [J]. 激光与光电子学

- 进展, 2015, 52(1): 010003.
- 8 Dertinger T, Colyer R, Iyer G, *et al.* Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(52): 22287-22292.
 - 9 Dertinger T, Pallaoro A, Braun G, *et al.* Advances in superresolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2013, 46(2): 210-221.
 - 10 Zeng Z, Chen X, Wang H, *et al.* Fast super-resolution imaging with ultra-high labeling density achieved by joint tagging super-resolution optical fluctuation imaging[J]. Scientific Reports, 2015, 5.
 - 11 Chen X, Zeng Z, Wang H, *et al.* Three-dimensional multimodal sub-diffraction imaging with spinning-disk confocal microscopy using blinking/fluctuating probes[J]. Nano Research, 2015, 8(7): 2251-2260.
 - 12 Stein S C, Huss A, Hähnel D, *et al.* Fourier interpolation stochastic optical fluctuation imaging[J]. Optics Express, 2015, 23(12): 16154-16163.
 - 13 Dertinger T, Colyer R, Vogel R, *et al.* Achieving increased resolution and more pixels with super resolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. Optics Express, 2010, 18(18): 18875-18885.
 - 14 Jiang S, Zhang Y, Yang H, *et al.* Enhanced SOFI algorithm achieved with modified optical fluctuating signal extraction [J]. Optics Express, 2016, 24(3): 3037-3045.