

结构光照明超分辨成像图像重建算法研究进展

唐于璠^{1,2}, 王林波², 文刚², 李辉^{1,2*}¹中国科学技术大学生物医学工程学院, 江苏 苏州 215163;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 结构光照明超分辨显微镜 (SIM) 已成为分子细胞生物领域进行活细胞动态过程实时观测的重要工具。SIM 作为一种计算成像方法, 其成像质量很大程度上依赖于超分辨图像重建算法的优劣。近 5 年来, 陆续报道了近 10 种针对不同条件下的 SIM 超分辨成像开源算法, 基于深度学习的 SIM 重建算法也层出不穷。理解各算法的原理及异同从而在实际成像实验中选择合适的成像算法, 成为了 SIM 成像技术应用的重要环节。首先介绍了 SIM 成像的原理; 然后分别从结构光参数估计、频谱优化的重建算法、基于深度学习的重建算法三方面介绍了 SIM 重建算法的最新进展, 为 SIM 研究者及用户提供参考; 最后总结了高质量 SIM 超分辨图像重建仍需解决的问题。

关键词 医用光学; 荧光显微镜; 结构光照明; 超分辨成像; 参数估计; 频谱优化; 深度学习

中图分类号 O438.2

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617009

Recent Advances in Structured Illumination Microscope Super-Resolution Image Reconstruction

Tang Yujun^{1,2}, Wang Linbo², Wen Gang², Li Hui^{1,2*}¹School of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Suzhou, Jiangsu 215163, China;²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract Structured illumination microscopy (SIM) has become one of the most popular super-resolution (SR) instruments for dynamic imaging of live cells. However, the final SR images of SIM depends heavily on the image reconstruction algorithms, which could dramatically affect the image quality. In the past five years, nearly 10 open-source software packages for SIM reconstruction have been developed with advantage on different situations. And deep learning based SIM reconstruction algorithms has also been reported. Understanding the principles and differences of each algorithm becomes a priority to select the appropriate algorithms for practical applications. This review firstly introduces the principle of SIM, and then presents the latest advances for the reference of SIM researchers and users from three aspects: estimation of structured illumination parameter, spectrum optimization, and deep learning based reconstruction. Finally, the remaining issues that need to be addressed further for high-quality SIM super-resolution image reconstruction are summarized.

Key words medical optics; fluorescence microscopy; structured illumination; super-resolution imaging; parameter estimation; spectrum optimization; deep learning

1 引言

荧光显微镜在生命科学研究领域扮演着举足轻

重的角色, 其可对各种生物组分和结构进行特异性标记和成像。传统荧光显微镜因受到光学衍射极限的限制, 分辨极限在 200 nm 左右^[1-5]。然而大多数亚细

收稿日期: 2022-01-04; 修回日期: 2022-01-28; 录用日期: 2022-02-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC0110101)、国家自然科学基金(62141506)

通信作者: *hui.li@sibet.ac.cn

胞器的尺寸在 100 nm 以下,对亚细胞结构和功能的观察对于了解细胞命运决定机制、揭示生命的本质以及研究重大疾病机理等至关重要。因此可突破衍射极限的超分辨显微成像技术成为近 20 年的研究热点。结构光照明超分辨显微镜(SIM)通过调制的条纹结构光照明样品,再通过图像重建可以实现两倍于衍射极限的分辨率。相较于其他超分辨成像技术, SIM 具有较高的时间分辨率(约 80 Hz)^[6],对标记样品的荧光染料无特殊要求,且光毒性较低(照明强度约 10 W/cm²),这些优点对于活细胞的动态观察来说十分重要。因此, SIM 已经成为分子细胞学研究中常用的超分辨成像装备之一^[7-9]。

SIM 成像一方面需要照明光场的精确调控来采集多帧原始图像,另一方面需通过后期算法对采集的多帧原始图像进行超分辨重建。因此精密的结构光调控和精准的重建算法是 SIM 实现高质量超分辨图像重建的两个关键。经过近 20 年的发展,目前采用激光干涉产生照明结构光的方式逐渐成熟,并成为最广泛使用的方案^[10-13],常见的光路有光栅型^[14]、空间光调制器型^[15-16]以及数字微型型^[17]。随着 SIM 仪器系统的逐渐成熟和定型, SIM 技术的研究越来越集中到超分辨图像重建算法。因为 SIM 最终的成像质量严重依赖于重建算法,而传统算法存在多个物理意义不明确的可调参数,即使是商业仪器的图像重建也不完全可靠。近 5 年来人们开发了近 10 种开源的 SIM 重建算法,他们分别从结构光参数的估计、频谱的分离、融合等方面对算法进行了优化,以提高分辨率、减少重建伪影,为真实可靠的 SIM 超分辨图像重建提供理论支撑及使用软件。但是这些重建算法各有其特点,目前还没有一个最理想的算法软件可以适用于所有 SIM 图像的重建,这给普通 SIM 使用者带来一定的困难。最近,深度学习技术也被引入到 SIM 超分辨图像重建之中,其通过宽场图像或较少的结构光调制图像来生成 SIM 超分辨图像,提高了成像速度并减少光漂白,但是这些基于深度学习的 SIM 重建算法在实际使用中还存在困难,

是否可以应用于新结构的发现仍存在争议。

本综述针对上述 SIM 重建算法的关键问题,在介绍 SIM 成像过程的基础上介绍了 SIM 重建算法的最新研究进展。文章从结构光参数的准确估计、伪影抑制和基于深度学习的 SIM 图像重建三部分进行分析,并讨论了普适的高质量 SIM 超分辨图像重建仍需解决的问题。受限于文章篇幅,本文仅讨论线性 SIM 超分辨图像的重建算法。

2 SIM 超分辨成像过程

传统显微光学系统的成像原理表示为

$$D(\mathbf{r}) = E(\mathbf{r}) * \text{PSF}(\mathbf{r}) + B(\mathbf{r}) + N(\mathbf{r}), \quad (1)$$

式中: $D(\mathbf{r})$ 为像面(探测器平面)的光场强度分布; $E(\mathbf{r})$ 为样本平面的光场强度分布; $\text{PSF}(\mathbf{r})$ 表示显微系统的点扩散函数;*表示卷积运算; $B(\mathbf{r})$ 代表离焦背景; $N(\mathbf{r})$ 代表来自样本及相机的噪声。其在频域可表示为

$$D(\mathbf{k}) = E(\mathbf{k}) \cdot \text{OTF}(\mathbf{k}) + B(\mathbf{k}) + N(\mathbf{k}), \quad (2)$$

式中: $B(\mathbf{k})$ 及 $N(\mathbf{k})$ 分别表示离焦背景和噪声的频谱; $E(\mathbf{k})$ 表示物频谱; $\text{OTF}(\mathbf{k})$ 表示显微系统的光学传递函数(OTF),其等价于一个低通滤波器,大于 OTF 截止频率的高频信息将无法通过光学系统进行传播。SIM 通过结构光条纹调制,将截止频率外的高频信息向下调制到 OTF 的可探测范围,最后通过重建算法将这些目标高频信号解码出来,最终实现约 2 倍的分辨率提高,其原理如图 1 所示。

常规 SIM 成像通常采用呈余弦分布的结构化条纹光场照明样本,

$$I(\mathbf{r}) = I_0 \cdot [1 + m \cdot \cos(2\pi \cdot \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r} + \varphi_0)], \quad (3)$$

式中: I_0 表示结构光的平均强度; m 为调制度; \mathbf{k}_0 代表结构光条纹的空间频率; φ_0 表示初始相位。在线性 SIM 中,样品平面的光强分布 $E(\mathbf{r})$ 通常与照明光场强度分布 $I(\mathbf{r})$ 呈线性关系,即 $E(\mathbf{r}) \propto \alpha(\mathbf{r}) \cdot I(\mathbf{r})$,其中 $\alpha(\mathbf{r})$ 表示样本的荧光分子浓度。因此, CCD 获取的原始图像频谱信息为

$$D(\mathbf{k}) = E(\mathbf{k}) \cdot \text{OTF}(\mathbf{k}) + B(\mathbf{k}) + N(\mathbf{k}) = [\alpha(\mathbf{k}) * I(\mathbf{k})] \cdot \text{OTF}(\mathbf{k}) + B(\mathbf{k}) + N(\mathbf{k}) = I_0 \cdot \left[\alpha(\mathbf{k}) + \frac{m}{2} \cdot \alpha(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \exp(i\varphi_0) + \frac{m}{2} \cdot \alpha(\mathbf{k} + \mathbf{k}_0) \cdot \exp(-i\varphi_0) \right] \cdot \text{OTF}(\mathbf{k}) + B(\mathbf{k}) + N(\mathbf{k}). \quad (4)$$

结构光调制下的物频谱信息被复制为三份并移动相应距离,所以 SIM 获取的原始图像频谱为高频分量 $[\alpha(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \text{OTF}(\mathbf{k}), \alpha(\mathbf{k} + \mathbf{k}_0) \cdot \text{OTF}(\mathbf{k})]$

与低频分量 $[\alpha(\mathbf{k}) \cdot \text{OTF}(\mathbf{k})]$ 的线性叠加。为求解三个未知数,至少需要三个线性方程,因此需在同一方向采集三个不同相位 $(0, \pm \frac{2\pi}{3})$ 的原始图像。

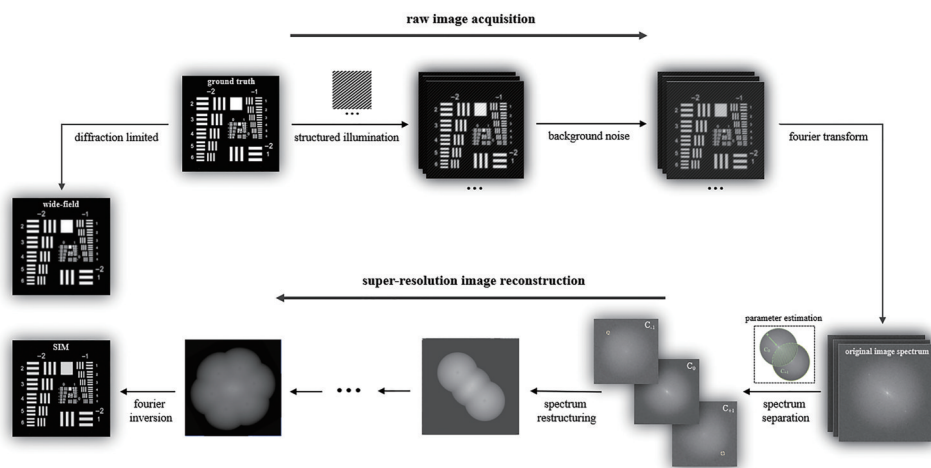


图 1 二维结构光显微成像原理

Fig. 1 Principle of two-dimensional structured illumination microscopy

然后通过求解该线性方程组准确分离出三个频谱分量,随后将两个高频分量移回原始位置便可获得该方向的扩展频谱。根据上述方法,利用三个方向(0°, 60°, 120°)对应的 9 幅原始图像,即可获得约两倍的频谱扩展,实现超分辨成像。

频谱分离,然后再将这些频谱分量平移至对应位置以得到扩展频谱。精准的频谱分离与平移离不开对结构光条纹参数(空间频率、相位以及调制对比度)的准确估计^[18]。噪声、像差、不同的调制对比度、光漂白等都会影响参数的准确估计^[19-22]。

3 SIM 超分辨重建算法

3.1 参数估计

根据 SIM 超分辨成像原理,首先需进行准确的

在 SIM 重建算法中,传统的结构光条纹参数估计方法为迭代自相关算法^[23-24]。其原理如图 2 所示,对同一方向采集到的三张 SIM 原始图像[图 2(a)],首先用初始的条纹周期参数将低频分量与高频分

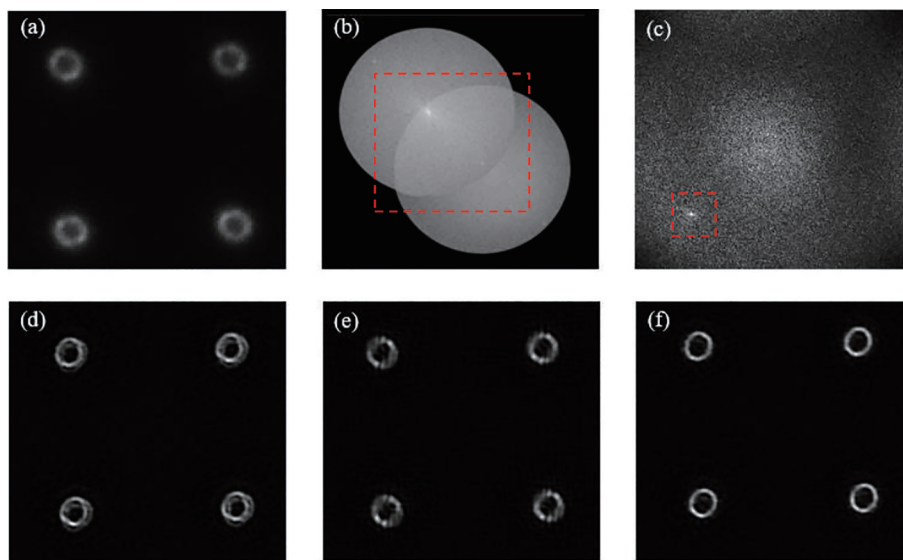


图 2 迭代自相关算法原理及参数估计准确与否的重建结果对比。(a) 原始图像;(b)(c) 迭代自相关算法原理;(d) 空间频率错误估计下(误差约 7.69%)的重建结果;(e) 相位值错误估计下(误差约 8.67%)的重建结果;(f) 参数准确估计下的重建结果

Fig. 2 Principle of iterative autocorrelation algorithm and comparison of reconstruction results with and without accurate parameter estimation. (a) Original image; (b)(c) principle of iterative autocorrelation algorithm; (d) reconstruction result under wrong spatial frequency (error is about 7.69%); (e) reconstruction result under wrong phase (error is about 8.67%); (f) reconstruction result with accurate parameters

量分离[图 2(b),虚线框为低频分量与高频分量的重叠区域],然后迭代计算其重叠区域的自相关值[图 2(c),虚线框为自相关峰值],自相关值的分布有一明显的峰值,该峰值对应的位置即为结构光的空间频率。根据该空间频率可进一步计算出相位值及调制对比度。因此,若空间频率的估计存在偏差,则相位和调制度的估计也将出现偏差,从而产生重建伪影,如图 2(d)所示。但是迭代自相关算法的估计精度受限于 CCD 像素大小。对此,Lahrberg 等^[25]提出一种在空间频率初始估计值附近使用双重矩阵进行过采样的亚像素精度算法。Cao 等^[26]也利用特殊逆矩阵及迭代互相关运算实现了亚像素精度的空间频率估计。

即使准确估计出空间频率的大小,相位估计仍可能存在偏差,影响频谱的准确分离,导致重建伪影的产生,如图 2(e)所示。根据物频谱信息高频成分远大于低频成分,频谱强度分布沿高频方向迅速衰减这一特点,Shroff 等^[27]于 2009 年提出峰值相位(POP)算法,该算法仅在结构光条纹调制度较高,空间频率适中(不高于 OTF 截止频率的 85%)且离焦背景干扰很弱时具有较高的准确度。针对 POP 算法的不足,2013 年,Wicker 等根据各频谱分量之间的关系,提出迭代互相关算法及非迭代自相关(ACR)算法^[28-29]。其中迭代互相关算法在低信噪比条件下准确度更高,但存在计算复杂耗时的问题。2016 年,Zhou 等^[30]提出图像重组变换(IRT)算法,该算法在低调制对比度下具有较高的估计准确度,但其适用的原始图像相移大小为 90°。

3.2 传统的 SIM 超分辨重建及频谱优化算法

为更好地重组分离频谱,减少重建伪影。2000 年,Gustafsson 等^[24,31]将 Wiener 反卷积引入 SIM,提出广义维纳滤波,其为针对成像过程中物函数与点扩散函数的卷积运算,在频域内做逆运算,表示为

$$\hat{S}(\mathbf{k}) = \frac{\sum_n \text{OTF}_n^{(*)}(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0) \cdot S_n(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0)}{\sum_n |\text{OTF}_n(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0)|^2 + \omega^2} A(\mathbf{k}), \quad (5)$$

式中: $\hat{S}(\mathbf{k})$ 为最终重建频谱; $S_n(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0)$ 表示相应的频谱分量($n = 0, \pm 1$); $\text{OTF}_n(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0)$ 表示系统的 OTF, $\text{OTF}_n^{(*)}(\mathbf{k} + n\mathbf{k}_0)$ 为其共轭; ω 代表维纳参数; $A(\mathbf{k})$ 代表切趾函数,常被用于抑制振铃效应。 ω 以及 $A(\mathbf{k})$ 常根据经验进行选择, ω 过小可能产生

锤击伪影,反之则会损失分辨率, $A(\mathbf{k})$ 的选择需权衡分辨率与振铃效应的抑制效果。

Gustafsson 所提出的基于 Wiener 反卷积的重建算法被商用 SIM 所采用,是目前应用较为广泛的一种算法。Wiener 反卷积可有效校正正在重组各频谱分量过程中出现的等效 OTF 形状不平滑问题。但是其严重依赖系统性能,如果系统不够稳定和准确,重建结果将出现严重失真,因此即使准确估计结构光条纹各参数,基于 Wiener 反卷积的重建依旧会因各种原因产生重建伪影^[19]。所以,SIM 算法提出与改进的主要目的便是减少重建伪影,文献[11,32]总结了 SIM 重建过程中各种伪影产生的情况。

在 SIM 重建算法中,Richardson-Lucy(R-L)反卷积常被用于解决泊松噪声以及离焦背景带来的伪影问题^[33-41]。R-L 反卷积是一种基于贝叶斯定律的空域图像复原算法^[42-45]。

$$f^{i+1}(\mathbf{r}) = f^i(\mathbf{r}) \cdot \left[\text{PSF}(\mathbf{r}) \otimes \frac{g(\mathbf{r})}{\text{PSF}(\mathbf{r}) * f^i(\mathbf{r})} \right], \quad (6)$$

式中: $\text{PSF}(\mathbf{r})$ 为系统点扩散函数; $f^i(\mathbf{r})$ 为第 i 次迭代所得图像; $g(\mathbf{r})$ 为失真图像; \otimes 表示相关运算。通过迭代使该函数值取最大时即可得到最佳复原图像。在没有噪声的情况下,仅通过充分的迭代 R-L 反卷积便可以很好地恢复高频信息^[46]。与 Wiener 反卷积相比,其不受特定用户可调参数的影响,但仍需权衡对比度与噪声的增强,且随着迭代次数的增加,重构结果可能不收敛^[47]。此外,陷波滤波器的使用也可有效抑制离焦背景及蜂窝状伪影的产生^[48]。

通过合理构造约束函数(正则化)并控制迭代次数同样可以有效减少重建伪影^[40,46,49-52]。低曝光条件下,原始图像会受到泊松噪声及高斯噪声的混合干扰,并被 Wiener 反卷积过程放大,使得重建图像存在大量随机伪影。2014 年,Chu 等^[49]将全变分(TV)约束引入 SIM,使曝光时间减少两个数量级,并使 SIM 连续成像时间提高 15 倍,但是该约束可能锐化不同区域之间的边界并减少单个区域内的差异。2018 年,Huang 等^[51]利用荧光显微镜下多维生物结构 x, y, t 的连续性提出 Hessian 约束。

$$R_{\text{Hessian}} = \int_{\Omega} \left\| \begin{bmatrix} f_{xx} & f_{xy} & \sqrt{\sigma} f_{xt} \\ f_{yx} & f_{yy} & \sqrt{\sigma} f_{yt} \\ \sqrt{\sigma} f_{tx} & \sqrt{\sigma} f_{ty} & f_{tt} \end{bmatrix} \right\|_1 d\mathbf{r}, \quad (7)$$

式中: Ω 表示包含图像全部像素; f 为所要估计的无伪影 SIM 图像; σ 是为加强结构沿 t 轴的连续性所引

入的参数。基于Hessian约束的Wiener反卷积算法可以有效减少随机噪声引起的伪影,将成像所需光子剂量降低10%,其损失函数表示为

$$\arg \min_f \left[\frac{\mu}{2} \cdot \| \mathbf{f} - \mathbf{g} \|_2^2 + R_{\text{Hessian}} \right], \quad (8)$$

式中: \mathbf{g} 表示Wiener反卷积得到的重建图像; μ 为权重值。然而,Hessian-SIM是以降低分辨率为代价来减少重建图像伪影的。对此,Zhao等^[46]提出的Sparse-SIM算法利用生物结构的稀疏性作为另一项先验知识,以对抗分辨率降低及平衡高频信息提取,在高达564 Hz的帧率下,达到了约60 nm的分辨率,其损失函数表示为

$$\arg \min_f \left[\frac{\lambda}{2} \cdot \| \mathbf{g} - \mathbf{b} - \mathbf{f} \|_2^2 + R_{\text{Hessian}} + \lambda_{\text{L1}} \| \mathbf{f} \|_1 \right], \quad (9)$$

式中: \mathbf{b} 表示背景图像; λ 与 λ_{L1} 为平衡图像保真度与稀疏性的权重因子。此外,通过减少冗余信息或重建所需原始图像数量也可提高SIM的时间分辨率^[52-56]。

以上减少重建伪影算法的提出与改进皆基于Wiener反卷积重组频谱,无法解决重组过程中出现的伪影问题。2021年,Wen等^[57]提出的HiFi-SIM经两步频谱优化,有效抑制了Wiener反卷积重组过程所导致的伪影的产生,其重建保真度如图3所示,

HiFi-SIM几乎完全消除了旁瓣伪影,与Ground-truth的结构相似度保持在91.3%以上。两步频谱优化原理表示为

$$H_{\text{HiFi-SIM}}(\mathbf{k}) = H_{\text{directly-combined}}(\mathbf{k}) \cdot W_1(\mathbf{k}) \cdot W_2(\mathbf{k}), \quad (10)$$

式中: $H_{\text{directly-combined}}(\mathbf{k})$ 表示直接组合频谱的等效OTF; $W_1(\mathbf{k})$ 为初始优化函数,其可有效消除典型伪影及残余背景,但一定程度上损害了初始优化频谱的保真度,导致部分细节丢失。而 $W_2(\mathbf{k})$ 则被用来补偿 $W_1(\mathbf{k})$ 优化所丢失的真实样本细节信息。该方法有效避免了严格的PSF校准及复杂的参数调整,提高了算法的可靠性。图4为FairSIM、Hessian SIM、TV-SIM及HiFi-SIM的成像结果对比,可见HiFi-SIM有效抑制了各种常见伪影的产生,并在不损失精细和弱结构的情况下去除了残留的背景荧光。同年,Smith等^[58]提出噪声控制的SIM重建算法,该算法根据所提出的真实噪声模型,提出三种改进的滤波方式,减少或完全消除了特殊的可调参数,有效解决了频谱重组过程中出现的伪影问题。此外,尽管SIM重建算法大多在频域进行,仍有少数研究者在空域实现了SIM超分辨率重建^[59-63]。

为方便SIM研究者及用户了解并选择合适的算法,表1列举并对比了目前开源的SIM算法。

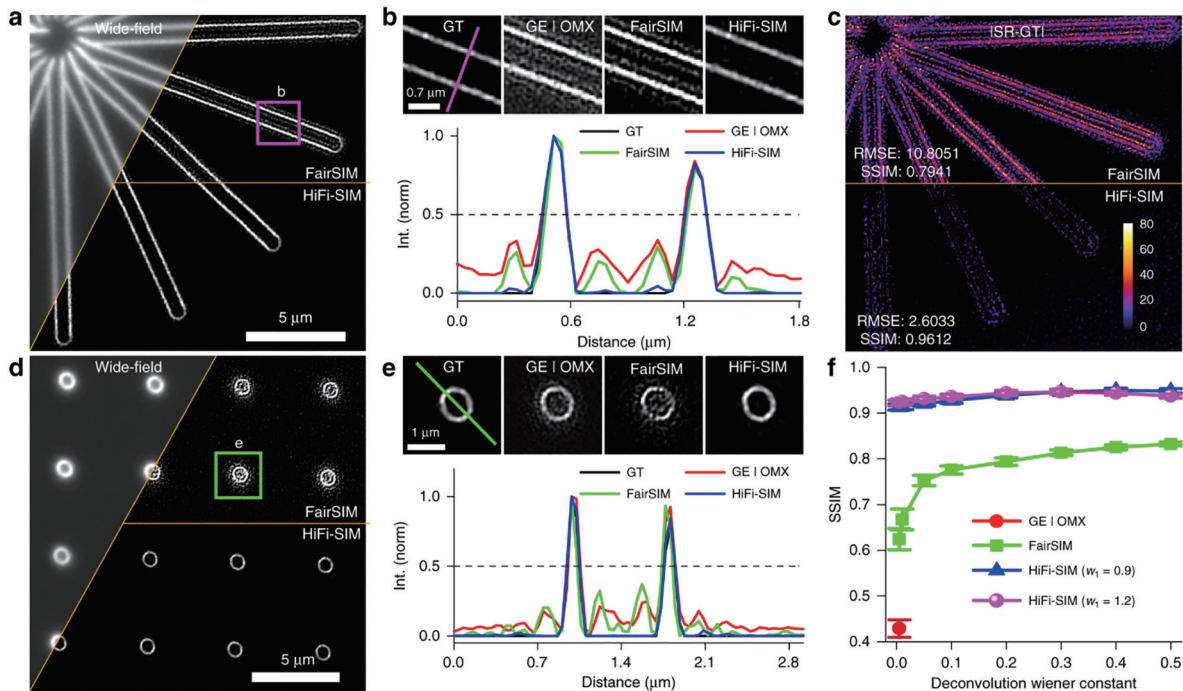


图3 HiFi-SIM重建保真度的定量表征^[57]

Fig. 3 Quantitative characterization of the fidelity of HiFi-SIM reconstruction^[57]

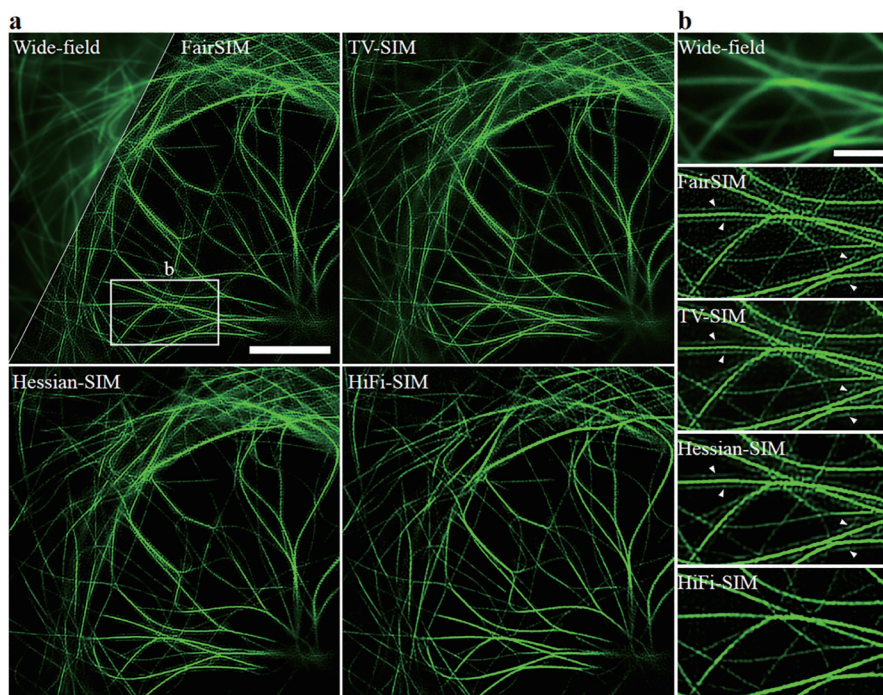


图 4 Wide-field、FairSIM、Hessian SIM、TV-SIM 及 HiFi-SIM 重建图像旁瓣伪影比较^[57]

Fig. 4 Comparison of sidelobe artifacts in reconstructed images of Wide-field, fairSIM, TV-SIM, Hessian-SIM, and HiFi-SIM^[57]

表 1 开源 SIM 重建算法

Table 1 Open-source SIM reconstruction algorithms

Algorithm	Download link	Application(benefits)	Running platform
SIMcheck ^[64]	https://github.com/MicronOxford/SIMcheck	1) Assessing the resolution and image quality; 2) identification of sources of errors and artefacts in reconstructed images	FiJi /ImageJ
FairSIM ^[48]	https://github.com/fairsim	SIM super-resolution reconstruction for all sinusoidal illumination modes	FiJi /ImageJ
SIMToolbox ^[65]	http://mmtg.fel.cvut.cz/SIMToolbox	1) Optical sectioning, classical SIM algorithm; 2) support MAP-SIM algorithm ^[50]	MATLAB
OpenSIM ^[23]	https://github.com/LanMai/OpenSIM	Classical 2D-SIM reconstruction algorithm	MATLAB
Hessian-SIM ^[51]	https://www.nature.com/articles/nbt.4115#Sec21	1) Effective suppression of reconstruction artifacts at low signal-to-noise ratios; 2) long-time dynamic imaging	MATLAB
Sparse-SIM ^[46]	https://github.com/WeisongZhao/Sparse-SIM	1) Effective suppression of reconstruction artifacts at low signal-to-noise ratios; 2) high spatial resolution (~60 nm)	MATLAB
HiFi-SIM ^[57]	https://doi.org/10.1038/s41377-021-00513-w	1) Effective reduction of reconstruction artifacts; 2) effective solution to the problems caused by PSF mismatch	MATLAB
True-Wiener SIM ^[58]	https://github.com/qnano/simnoise	1) Reduction of user adjustable parameters; 2) high contrast imaging	MATLAB
Flat-noise SIM ^[58]	https://github.com/qnano/simnoise	1) No user adjustable parameters; 2) suppression of structural noise artifacts	MATLAB
Notch-filtered SIM ^[58]	https://github.com/qnano/simnoise	1) No user adjustable parameters; 2) higher image contrast than flat-noise SIM	MATLAB

3.3 基于深度学习的 SIM 超分辨重建算法

目前,深度学习作为一门被广泛关注的技术,已被应用于各科学研究领域,有利推动了计算机视觉^[66-67]、自然语言处理^[68]等领域的发展。在荧光显微成像领域,已有不少深度学习技术被用于完成图像分割,目标检测,图像重建等任务^[69-75]。自 Wang 等^[76]于 2019 年首次将深度学习应用于 SIM 超分辨成像,已有不少学者基于 U-Net、生成对抗网络(GAN)、残差通道注意力网络(RCAN)等提出相应的 SIM 超分辨重建算法^[77-84]。这些算法主要解决了两类问题:1) 改善低信噪比条件下的成像质量,降低光毒性;2) 减少重建所需原始图像数量。上述问题的解决均可有效提高 SIM 的时间分辨率,为长时间活细胞实时动态成像提供可能。

表 2 列举并对比了现有基于深度学习的 SIM 重建算法。为改善低信噪比、高荧光背景条件下的重建图像质量,2020 年, Jin 等^[78]基于 U-Net 网络提出 scU-Net 网络,其利用两个串联的 U-Net 网络有效改善了低信噪比条件下的重建图像质量。相较于其他网络架构,基于 U-Net 的方法对于生物学家和缺乏深度学习经验的用户更加友好。2021 年, Qiao

等^[79]提出傅里叶通道注意机制,利用傅里叶域不同特征之间的频率内容差异更好地学习高频信息的层次表示,并将其与 GAN 相结合,提出了 DFGAN 网络,该网络能够提供与传统 SIM 类似的归一化均方根误差(NRMSE)和多尺度结构相似指数(MS-SSIM),特别适用于高结构复杂性样本。相较于 scU-Net 网络,DFGAN 网络的重建质量更佳,但是由于 GAN 需于训练过程中始终保持鉴别器的能力略强于生成器,训练相对困难。同年, Shah 等^[80]基于 RED-Net 网络结构提出 RED-fairSIM,该算法无需繁琐的图像预处理过程,通过较低的训练成本同样在低信噪比条件下重建出了高质量的超分辨图像。随后, Christensen 等^[82]借助迁移学习的思想,基于 RCAN 提出对噪声更具鲁棒性的 ML-SIM 网络。相较于 U-Net 网络,RCAN 具有更强的 SIM 重构能力。相较于 GAN 网络,虽然其重建图像略模糊,但伪影更少,这在科学成像应用中往往更可取。此外,虽然基于 GAN 的模型可提供接近真值的高分辨率,但它们的 NRMSE 和 MS-SSIM 通常比非 GAN 模型(例如 DFCAN 和 RCAN)差。所以,非 GAN 模型更适用于低至中荧光成像条件^[79]。

表 2 基于深度学习的 SIM 重建算法

Table 2 Deep learning based SIM reconstruction algorithm

Algorithm	Network	Download link	Advantage	Biological sample
scU-Net ^[78]	U-Net	https://github.com/drbeiliu/DeepLearning	High quality image reconstruction in low signal-to-noise conditions	Microtubules; adhesions; mitochondria; F-actin
DFCAN/DFGAN ^[79]	GAN	https://github.com/qc17-THU/DL-SR	High quality image reconstruction in low signal-to-noise conditions	Clathrin-coated pits; endoplasmic reticulum; microtubules; F-actin
RED-fairSIM ^[80]	RED-Net	—	1) High quality image reconstruction in low signal-to-noise conditions; 2) no image pre-processing required; 3) low training costs	U2OS cells; tubulin cytoskeleton
ML-SIM ^[82]	RCAN	http://ML-SIM.github.io	1) High quality image reconstruction in low signal-to-noise conditions; 2) model is highly generalized	Endoplasmic reticulum; cell membrane
U-Net-SIM3 ^[78]	U-Net	https://github.com/drbeiliu/DeepLearning	Fewer raw images (five-fold reduction)	Microtubules; adhesions; mitochondria; F-actin
Ref. [83]	cycleGAN	—	Fewer raw images(three original images)	—
caGAN ^[84]	GAN	https://github.com/qc17-THU/DL-SR	1) Halving the number of raw images (axial); 2) high quality image reconstruction in low signal-to-noise conditions	Clathrin-coated pits; endoplasmic reticulum; microtubules; F-actin
Ref. [76]	GAN	—	1) Large imaging field of view; 2) wide field images for super resolution	Gene-edited SUM159; drosophila embryos

为减少重建所需原始图像数量, Jin 等^[78]于 2020 年提出的 U-Net-SIM3 网络将三维(3D)-SIM 重建所需的原始图像数量减少为原来的 1/5。同年, Ling 等^[83]通过使用循环一致的生成对抗网络(cycleGAN), 将二维(2D)-SIM 重建所需原始图像减少为 3 幅。与 U-Net 网络相比, cycleGAN 所需计算资源更少, 训练效率更高。2021 年, Qiao 等^[84]基于 DFGAN 网络提出的 caGAN 网络模型, 将 3D-SIM 重建所需轴向图像数量减半。相较而言, 目前借助深度学习实现 SIM 超分辨成像的算法多为改善低信噪比、高荧光背景条件下的成像质量, 所提出的大部分网络在输入图像数量减少的情况下重建图像质量变差, 且目前并无特定网络类型适用某类任务。

与传统 SIM 重建算法相比, 基于深度学习的重建算法有效解决了传统算法所面临的空间分辨率、时间分辨率、光毒性与光漂白之间相互制约的问题, 减少了传统算法在低信噪比条件下因偏离预期的成像模型或错误估计的实验参数所引起的伪影。但是, 目前在高信噪比成像条件下传统算法更具优势^[79]。因此, 基于深度学习的 SIM 图像重建算法仍然有很大的发展空间。

4 结束语

经过 20 年的发展, SIM 超分辨成像仪器装备和重建算法皆愈发稳定可靠, 不仅可以满足细胞生物学常规成像需求, 而且发现了多种新的细胞亚结构, 成为分子细胞生物研究不可或缺的成像工具。随着应用的不断拓展, 研究者及用户对 SIM 成像技术的认识也不断提高。目前, 成像深度较浅是 SIM 显微成像技术的瓶颈之一, 今后自适应光学像差校正技术、结构光与光片照明融合技术, 以及近红外成像技术将可能引入到 SIM 超分辨显微成像之中, 大大拓展其成像深度, 从而为生物医学研究提供功能更强大、应用场景更广泛的成像工具。另一方面, SIM 超分辨图像重建算法有望在以下几个方面取得更多突破:

1) SIM 是否存在理论上最优的 OTF。光学显微镜空间分辨率受限本质上是因为衍射极限, 即存在 OTF 截止频率, 高于该截止频率的高频空间信号无法通过显微成像系统。SIM 通过结构光调制将高频信号搬移至可成像范围内, 从而扩展了其 OTF 截止频率。理论上 SIM 具有与共聚焦显微镜相同

的 2 倍于宽场的截止频率, 但是其对高频信号的强度衰减更弱, 因此实际上具有更优的分辨能力。SIM 重建的多种频谱优化算法本质上都是优化 OTF, 各种算法的区别也体现在最终等效 OTF 的形式上。Hifi-SIM 通过构建与宽场 OTF 具有相同函数形式但是截止频率范围扩展了 2 倍的 OTF, 实现了重建伪影的消除。Sparse-SIM 等通过稀疏去卷积的方式可以分辨更高频率的样品结构。那么, 是否存在一个理论上最优的 OTF 形式, 此函数有着最高的截止频率并对高频信号的强度衰减最弱。

2) 在实际 SIM 成像实验中, 除了调制的结构光信号, 还存在非调制的荧光信号、离焦背景信号和噪声信号。在 SIM 超分辨图像重建中, 如果能够准确地区分这几种信号, 采用不同的方式进行处理, 则有可能逼近最优的 SIM 超分辨图像。

3) 基于深度学习的 SIM 超分辨图像重建虽然已经取得了很大的进展, 可以减少原始图像数量或曝光时间, 但是目前网络的构建和训练都是针对已知亚细胞结构图像集进行的。而超分辨成像在细胞生物学研究方面更重要的用途是发现未知的细胞结构, 能否搭建一种 SIM 超分辨网络架构, 使其不仅能够重建已知细胞结构的图像还能够预测未知亚细胞结构, 将是今后 SIM 超分辨图像重建算法发展的方向。

参 考 文 献

- [1] Leung B O, Chou K C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology[J]. Applied Spectroscopy, 2011, 65(9): 967-980.
- [2] Bates M, Huang B, Zhuang X W. Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2008, 12(5): 505-514.
- [3] Fu Y, Wang T L, Zhao S. Imaging principles and applications of super-resolution optical microscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, 56(24): 240002.
付芸, 王天乐, 赵森. 超分辨光学显微的成像原理及应用进展[J]. 激光与光电子学进展, 2019, 56(24): 240002.
- [4] Yang J, Tian C P, Zhong G S. Stochastic optical reconstruction microscopy imaging technique and application[J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318005.
杨洁, 田翠萍, 钟桂生. 随机光学重构显微成像技术

- 及其应用[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318005.
- [5] Anwar S, Khan S, Barnes N. A deep journey into super-resolution: a survey[J]. *ACM Computing Surveys*, 2021, 53(3): 1-34.
- [6] Wu Y, FasterShroff H., sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(12): 1011-1019.
- [7] Hirvonen L M, Wicker K, Mandula O, et al. Structured illumination microscopy of a living cell[J]. *European Biophysics Journal: EBJ*, 2009, 38(6): 807-812.
- [8] Jost A, Heintzmann R. Superresolution multidimensional imaging with structured illumination microscopy[J]. *Annual Review of Materials Research*, 2013, 43: 261-282.
- [9] Heintzmann R, Huser T. Super-resolution structured illumination microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(23): 13890-13908.
- [10] Samanta K, Joseph J. An overview of structured illumination microscopy: recent advances and perspectives [J]. *Journal of Optics*, 2021, 23(12): 123002.
- [11] Demmerle J, Innocent C, North A J, et al. Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(5): 988-1010.
- [12] Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y. Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging[J]. *Microscopy*, 2015, 64(4): 237-249.
- [13] 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.
- [14] Gustafsson M G L, Agard D A, Sedat J W. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination[J]. *Proceedings of SPIE*, 2000, 3919: 141-150.
- [15] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 339-342.
- [16] Chang B J, Chou L J, Chang Y C, et al. Isotropic image in structured illumination microscopy patterned with a spatial light modulator[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14710-14721.
- [17] Dan D, Lei M, Yao B, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1116.
- [18] Righolt C H, Slotman J A, Young I T, et al. Image filtering in structured illumination microscopy using the Lukosz bound[J]. *Optics Express*, 2013, 21(21): 24431-24451.
- [19] Fan J C, Huang X S, Li L J, et al. A protocol for structured illumination microscopy with minimal reconstruction artifacts[J]. *Biophysics Reports*, 2019, 5(2): 80-90.
- [20] Shi R, Janunts N, Heintzmann R, et al. Fast-physical optics modeling of microscopy system with structured illumination[J]. *Proceedings of SPIE*, 2018, 10694: 106940I.
- [21] Patwary N, Doblas A, Preza C. Image restoration approach to address reduced modulation contrast in structured illumination microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(4): 1630-1647.
- [22] Hagen N, Gao L, Tkaczyk T S. Quantitative sectioning and noise analysis for structured illumination microscopy[J]. *Optics Express*, 2012, 20(1): 403-413.
- [23] Lal A, Shan C Y, Xi P. Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2016, 22(4): 50-63.
- [24] 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.
- [25] Lahrberg M, Singh M, Khare K, et al. Accurate estimation of the illumination pattern's orientation and wavelength in sinusoidal structured illumination microscopy[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(5): 1019-1025.
- [26] Cao R Z, Chen Y H, Liu W J, et al. Inverse matrix based phase estimation algorithm for structured illumination microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(10): 5037-5051.
- [27] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2009, 26(2): 413-424.
- [28] Wicker K, Mandula O, Best G, et al. Phase optimisation for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [29] Wicker K. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space[J]. *Optics Express*,

- 2013, 21(21): 24692-24701.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Karras C, Smedh M, Förster R, et al. Successful optimization of reconstruction parameters in structured illumination microscopy—a practical guide[J]. *Optics Communications*, 2019, 436: 69-75.
- [33] York A G, Chandris P, Nogare D D, et al. Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(11): 1122-1126.
- [34] Shaw M, Zajiczek L, O'Holleran K. High speed structured illumination microscopy in optically thick samples[J]. *Methods*, 2015, 88: 11-19.
- [35] Zhang Y W, Lang S, Wang H W, et al. Super-resolution algorithm based on Richardson-Lucy deconvolution for three-dimensional structured illumination microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2019, 36(2): 173-178.
- [36] Chen X Y, Zhanghao K, Li M Q, et al. Enhanced reconstruction of structured illumination microscopy on a polarized specimen[J]. *Optics Express*, 2020, 28(17): 25642-25654.
- [37] Chakrova N, Rieger B, Stallinga S. Deconvolution methods for structured illumination microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2016, 33(7): B12-B20.
- [38] York A G, Parekh S H, Nogare D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749-754.
- [39] Wu J J, Li S W, Cao H Q, et al. Resolution improvement of multifocal structured illumination microscopy with sparse Bayesian learning algorithm [J]. *Optics Express*, 2018, 26(24): 31430-31438.
- [40] Chakrova N, Heintzmann R, Rieger B, et al. Studying different illumination patterns for resolution improvement in fluorescence microscopy[J]. *Optics Express*, 2015, 23(24): 31367-31383.
- [41] Ströhl F, Kaminski C F. A joint Richardson-Lucy deconvolution algorithm for the reconstruction of multifocal structured illumination microscopy data[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2015, 3(1): 014002.
- [42] Schultz R R, Stevenson R L. Extraction of high-resolution frames from video sequences[J]. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 1996, 5(6): 996-1011.
- [43] Richardson W H. Bayesian-based iterative method of image restoration[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1972, 62(1): 55-59.
- [44] Lucy L B. An iterative technique for the rectification of observed distributions[J]. *The Astronomical Journal*, 1974, 79: 745.
- [45] Ingaramo M, York A G, Hoogendoorn E, et al. Richardson - Lucy deconvolution as a general tool for combining images with complementary strengths[J]. *ChemPhysChem*, 2014, 15(4): 794-800.
- [46] Zhao W, Zhao S, Li L, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2021: 1-12.
- [47] Perez V, Chang B J, Stelzer E H K. Optimal 2D-SIM reconstruction by two filtering steps with Richardson-Lucy deconvolution[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37149.
- [48] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, et al. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10980.
- [49] Chu K Q, McMillan P J, Smith Z J, et al. Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level[J]. *Optics Express*, 2014, 22(7): 8687-8702.
- [50] Lukeš T, Křížek P, Švindrych Z, et al. Three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy with maximum a posteriori probability image estimation[J]. *Optics Express*, 2014, 22(24): 29805-29817.
- [51] Huang X, Fan J, Li L, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [52] Zhu H F, Sun Y L, Yin L, et al. 3D super-resolution microscopy based on nonlinear gradient descent structured illumination[J]. *Optics Express*, 2021, 29(14): 21428-21443.
- [53] Ströhl F, Kaminski C F. Speed limits of structured

- illumination microscopy[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(13): 2511-2514.
- [54] Lal A, Shan C Y, Zhao K, et al. A frequency domain SIM reconstruction algorithm using reduced number of images[J]. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 2018, 27(9): 4555-4570.
- [55] Lal A, Huang X S, Xi P. A frequency domain reconstruction of SIM image using four raw images [J]. *Proceedings of SPIE*, 2016, 10024: 1002411.
- [56] Zhao T Y, Wang Z J, Chen T S, et al. Advances in high-speed structured illumination microscopy[J]. *Frontiers in Physics*, 2021, 9: 672555.
- [57] Wen G, Li S, Wang L, et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 70.
- [58] Smith C S, Slotman J A, Schermelleh L, et al. Structured illumination microscopy with noise-controlled image reconstructions[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 821-828.
- [59] Dong S Y, Nanda P, Shiradkar R, et al. High-resolution fluorescence imaging via pattern-illuminated Fourier ptychography[J]. *Optics Express*, 2014, 22(17): 20856-20870.
- [60] Dong S Y, Liao J, Guo K K, et al. Resolution doubling with a reduced number of image acquisitions[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(8): 2946-2952.
- [61] Orioux F, Sepulveda E, Loriette V, et al. Bayesian estimation for optimized structured illumination microscopy[J]. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 2012, 21(2): 601-614.
- [62] Tu S J, Liu Q L, Liu X, et al. Fast reconstruction algorithm for structured illumination microscopy[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(6): 1567-1570.
- [63] Bezzubik V V, Belashenkov N R, Vasilyev V N, et al. Optimization-based image reconstruction method for super-resolution structured-illumination microscopy [J]. *Journal of Optical Technology*, 2019, 86(12): 748-757.
- [64] Ball G, Demmerle J, Kaufmann R, et al. SIMcheck: a toolbox for successful super-resolution structured illumination microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15915.
- [65] Křížek P, Lukeš T, Ovesný M, et al. SIMToolbox: a MATLAB toolbox for structured illumination fluorescence microscopy[J]. *Bioinformatics*, 2015, 32(2): 318-320.
- [66] Hang Y C, Liao Q M, Yang W M, et al. Attention cube network for image restoration[C]//*MM '20: Proceedings of the 28th ACM International Conference on Multimedia*, October 12-16, 2020, Virtual Event/Seattle, WA, USA. New York: ACM Press, 2020: 2562-2570.
- [67] Zhang Y L, Tian Y P, Kong Y, et al. Residual dense network for image restoration[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2021, 43(7): 2480-2495.
- [68] Vaswani A, Shazeer N, Parmar N, et al. Attention is all you need[C]//*Advances in Neural Information Processing Systems 30: Annual Conference on Neural Information Processing Systems 2017*, December 4-9, Long Beach, CA, USA. [S.l.: s.n.], 2017: 5998-6008.
- [69] Zhang X, Zhang M S, Li D, et al. Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(37): 10364-10369.
- [70] Liu Z C, Jin L H, Chen J C, et al. A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2021, 134: 104523.
- [71] 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.
- [72] Shajkofci A, Liebling M. Spatially-variant CNN-based point spread function estimation for blind deconvolution and depth estimation in optical microscopy [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2020, 29: 5848-5861.
- [73] Yang X L, Huang L Z, Luo Y L, et al. Deep learning-based virtual refocusing of images using an engineered point-spread function[J]. *ACS Photonics*, 2021, 8(7): 2174-2182.
- [74] Ding H, Li F J, Meng Z, et al. Auto-focusing and quantitative phase imaging using deep learning for the incoherent illumination microscopy system[J]. *Optics Express*, 2021, 29(17): 26385-26403.
- [75] Chen J, Sasaki H, Lai H, et al. Three-dimensional residual channel attention networks denoise and sharpen fluorescence microscopy image volumes[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(6): 678-687.
- [76] Wang H D, Rivenson Y, Jin Y Y, et al. Deep-

- learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy[J]. *Nature methods*, 2019, 16(1): 103-110.
- [77] Laine R F, Goodfellow G, Young L J, et al. Structured illumination microscopy combined with machine learning enables the high throughput analysis and classification of virus structure[J]. *eLife*, 2018, 7: e40183.
- [78] Jin L, Liu B, Zhao F, et al. Deep learning enables structured illumination microscopy with low light levels and enhanced speed[J]. *Nature communications*, 2020, 11(1): 1-7.
- [79] Qiao C, Li D, Guo Y, et al. Evaluation and development of deep neural networks for image super-resolution in optical microscopy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(2): 194-202.
- [80] Shah Z H, Müller M, Wang T C, et al. Deep-learning based denoising and reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy images [J]. *Photonics Research*, 2021, 9(5): B168-B181.
- [81] Huang L, Chen H, Luo Y, et al. Recurrent neural network-based volumetric fluorescence microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 62.
- [82] Christensen C N, Ward E N, Lu M, et al. ML-SIM: universal reconstruction of structured illumination microscopy images using transfer learning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(5): 2720-2733.
- [83] 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.
- [84] Qiao C, Chen X Y, Zhang S W, et al. 3D structured illumination microscopy via channel attention generative adversarial network[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2021, 27(4): 6801711.