

# 超微弱生物发光图像中的统计检验\*

陈天明 俞 信 王苏生

(北京理工大学光电工程系, 北京 100081)

**摘 要** 应用光电阴极探测灵敏度为  $0.5 \text{ cps/mm}^2$  的超高灵敏度的光电成像系统, 获得了绿豆芽和活体昆明鼠的超微弱生物发光图像, 并用统计理论研究了极弱光强条件下光子图像的信号检验问题。文中在信号和噪声均为泊松分布的条件下, 分析了从光子噪声中检验是否有信号的判据以及影响到检验的 5 个因素对检验结论的影响。以此判据成功地检验到实验获得的昆明鼠发光光子图像中的信号。

**关键词** 超微弱生物发光图像, 统计检验, 信号检测, 泊松分布。

## 1 生物超微弱发光图像

生物学家把生物体在进行新陈代谢的过程中, 细胞自发地辐射出的极其微小的光子流, 以及细胞受到外界光激发, 在激发光消失后仍保持的极其微弱的延迟发光定义为生物光子或生物超微弱发光 (bio-photon or ultra-weak bioluminescence)。生物超微弱发光强度为  $10^0 \sim 10^4 \text{ Photons/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 。光谱范围为  $200 \sim 800 \text{ nm}^{-1}$ 。这种发光现象广泛存在于各种动物、植物、以及单细胞生物之中。

本文用近期研制的具有超高灵敏度的光子图像探测系统研究了植物和动物外表面的超微弱发光, 得到不同强度和信噪比的光子图像。光电探测系统是以微通道板像增强器为核心的超高灵敏度成像系统, 该系统由照相物镜、微通道像增强器 (Janpan, Hamamatsu C2166-01)、中继透镜、CCD 摄像系统 (Canada, Dalsa Ca-D1) 组成, 其原理示意图如图 1 所示。

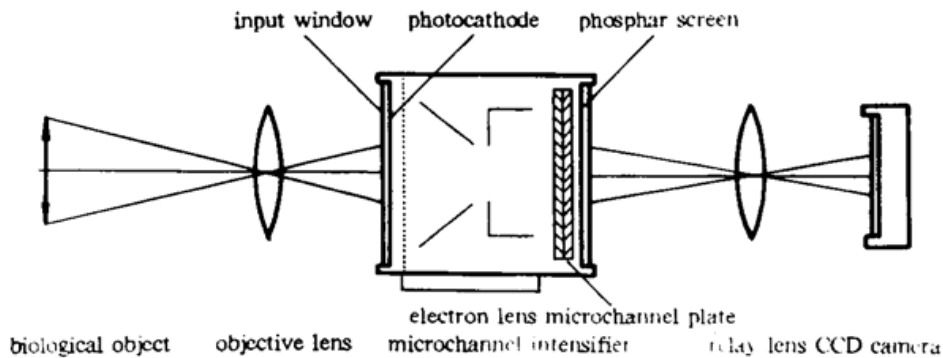


Fig. 1 Diagram of ultra-sensitive image detect system

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1995 年 4 月 1 日; 收到修改稿日期: 1995 年 10 月 4 日

生物对象由超强光力照相物镜成像在微通道板像增强器的多碱光阴极上，光阴极的光敏波长为 280~850 nm。透过输入窗口落在  $\Phi 15$  mm 的像增强器光阴极上的光子由于光电效应转换成电子图像，电子透镜将电子图像耦合到微通道板上，在微通道板的每一光纤通道内，电子经过不断的撞击，每一入射电子会产生  $10^2 \sim 10^6$  个电子，从微通道板出射的电子撞击荧光屏(材料 P-20)重新激发出光子图像。超高灵敏度图像中的核心器件——微通道像增强器不仅有极高的光子放大能力( $10^3 \sim 10^7$ )，同时具有较好的空间分辨率和时间分辨率，每一落在像增强器上的光子，经过放大后，在像增强器的出射荧光屏上光斑直径为 60  $\mu\text{m}$ ，延迟时间为 30 ns~100 ns (当光子增益为  $10^6$  时)。在  $10^4$  photons/mm<sup>2</sup>·s 以下的单光子成像条件下整个成像系统的空间分辨率为 15 lp/mm。荧光屏上的图像由中继透镜投射在 CCD 摄像系统的像面上，经图像采集板进入计算机。

利用上述的超高灵敏度图像探测系统完成了植物和动物的超微弱发光探测研究。植物的超微弱发光强度比动物的发光强度要大得多<sup>[2]</sup>，图 2(a)、图 3(a)分别是绿豆芽、昆明鼠 A 在正常光照条件后立即移入暗箱后，在 2 分 16 秒钟内累积得到的超微弱发光图像，图 2(b)、图 3(b)分别是此绿豆芽、昆明鼠 A 的外形图。由图 2(a)图像的信噪比可立即直观地判断出绿豆芽存在超微弱发光现象。而从图 3(a)无法直接得到昆明鼠 A 存在发光现象的结论。

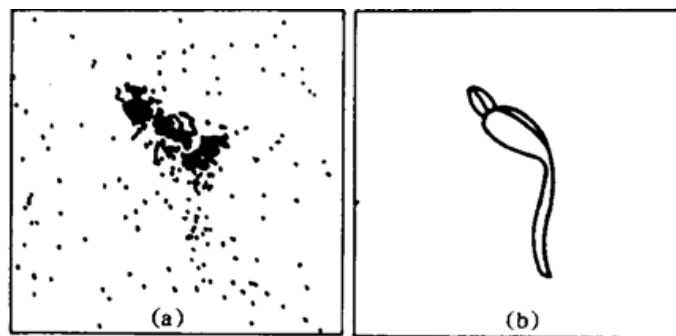


Fig. 2 Image of ultra-weak bioluminescence emitted from a sprouting mung bean and it's outline

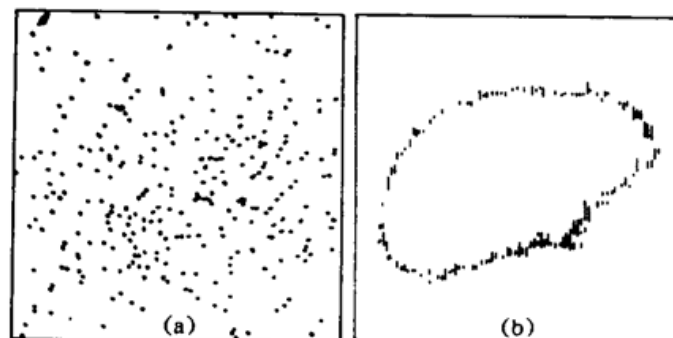


Fig. 3 Image of ultra-weak bioluminescence emitted from Kunming mouse and it's outline

## 2 超微弱发光图像统计检验的量化判据

超微弱发光图像和通常的图像有很大差别，在光强极弱时，探测器响应时间内到达的是时间和空间都不连续的离散光子，到达某一位置的概率由光子的波粒二象性决定，只有在足够长的探测累积时间后，才会有通常意义上的空间连续分布的图像。探测超微弱发光图像最主要受探测系统本身的背景暗噪声限制，本底噪声表现为在极弱的光子图像上叠加的随机分

布的噪声点，此噪声会掩盖测量的信号。在图像信号和背景噪声都极低的条件下，由于信号和噪声都服从泊松分布，因信号泊松分布噪声和本底噪声的影响，使得图像信号和背景难以直接区分，必须用统计理论进行计算得到量化的区分判据，在此基础上进行特征提取和图像重构。

由于用实验研究获取超微弱发光图像需要超高灵敏度的二维成像器件，国际上在 80 年代才在技术上制成了具有单光子事件探测能力的微通道板像增强器和致冷 CCD，有关光子图像的理论实验研究报道不多，有一些研究如何提高探测信噪比的方法<sup>[3~5]</sup>，迄今尚未有利用统计检验判别信号与噪声的系统研究报道。

设图像上要检验的可能有信号的区域为 A，除去 A 区域以外的背景区域为 B，均匀划分图像的 A 区域和 B 区域为 m 和 n 个统计面积 Δ，在图像上的光子数极少的条件下，区域 A 和 B 上的光子分布都是泊松分布(经检验和实际发光图像的分布符合)。落在区域 A 的某个 Δ 单位统计面积上数目为 k<sub>1</sub> 个光子的概率为：

$$P(U = k_1) = (\lambda_1^{k_1}/k_1!) \exp(-\lambda_1), \tag{1}$$

$$k_1 = 0, 1, 2, \dots$$

式中 λ<sub>1</sub> = tq<sub>1</sub>/Δ 为率函数(每个统计区域 Δ 的平均光子数)，t 为测量时间，q<sub>1</sub> 为区域 A 中 Δ 的发光功率(单位: photons/s)。该分布函数为：

$$F(U) = \sum_{k_1 \leq M} (\lambda_1^{k_1}/k_1!) \exp(-\lambda_1), \tag{2}$$

$$k_1 = 0, 1, 2, \dots, M, \quad M = 0, 1, 2, \dots,$$

落在区域 B 的某个 Δ 单位统计面积上数目为 k<sub>2</sub> 个光子的概率为：

$$P(U = k_2) = (\lambda_2^{k_2}/k_2!) \exp(-\lambda_2) \tag{3}$$

$$k_2 = 0, 1, 2, \dots$$

式中 λ<sub>2</sub> = tq<sub>2</sub>/Δ 为率函数，t 为测量时间，q<sub>2</sub> 为 B 区域每个统计区域 Δ 的发光功率，为像面暗噪声的等效背景功率。该分布函数为：

$$G(U) = \sum_{k_2 \leq M} (\lambda_2^{k_2}/k_2!) \exp(-\lambda_2) \tag{4}$$

根据斯米尔诺夫检验<sup>[6]</sup>，要得到 F 和 G 为不同结论的条件是

$$\text{Sup}_{0 < M < +\infty} [F(U) - G(U)] > W / \sqrt{L}$$

$$\text{Sup}_{0 < M < +\infty} \left[ \sum_{k_1 \leq M} (\lambda_1^{k_1}/k_1!) \exp(-\lambda_1) - \sum_{k_2 \leq M} (\lambda_2^{k_2}/k_2!) \exp(-\lambda_2) \right] > W / \sqrt{L} \tag{6}$$

$$k_1 = 0, 1, 2, \dots, M, \quad k_2 = 0, 1, 2, \dots, M, \quad M = 0, 1, 2, \dots, +\infty$$

其中 L 取：
$$L = nm/(m + n) \tag{7}$$

对于不同的检验水平 α，根据斯米尔诺夫临界值表取不同的 w 值

Table 1. Table of cmnphob critical value (L > 40)

testing level	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
W value	1.52	1.73	1.92	2.15	2.30

上述关系式过于复杂，不易得到检验条件和其中参数的定量关系，可从信号检验的角度得到如下的定性结论：

- 1) q<sub>1</sub> 和 q<sub>2</sub> 的大小，q<sub>1</sub> - q<sub>2</sub> 的值越大，相当于信噪比高，则越容易满足检验条件；
- 2) 检测时间 t，t 越大，相当于检验的统计数据量大，则越容易满足检验条件；

3) 图像划分的单位统计面积的数目  $m$  和  $n$ , 对于总面积一定的成像系统  $m$  和  $n$  和划分的方法有关, 划得越细, 则  $m$  和  $n$  的数目越大。  $m$  和  $n$  的数目过大或过小都对检验不利,  $m$  和  $n$  过小, 相当于统计样本的数目小, 检验的结论不可靠, 统计理论要求统计样本  $m$  和  $n$  至少大于 50, 最好大于 100。  $m$  和  $n$  的数目过大, 如经划分使每个区域只有 1 个光子或者 0 个光子, 则检验条件变为:

$$(C_A - C_B) / \sqrt{m + n} > \sqrt{2W} \quad (8)$$

式中  $(C_A - C_B)$  为  $A$  区域和  $B$  区域的光子数差, 与划分无关, 而  $(m + n)$  为划分区域的总数,  $(m + n)$  越大, 则越不易满足检验条件, 即越不易检测到信号。

4)  $m$  和  $n$  各占总数  $(m + n)$  的比例,  $m$  占的比例大, 信号样本大可使信号的检验更精确, 但噪声检验样本减少, 背景噪声的检验误差大, 不便于比较信号和噪声的差异, 即不易检验出信号。相反  $n$  占的比例大, 噪声检验很精确, 信号检验误差大, 也同样不易检验出信号, 最优比例应和  $q_1$  和  $q_2$  的比例有关。

5) 检验水平  $\alpha$ ,  $\alpha$  为犯“弃真”的概率。  $\alpha$  大则  $W$  值小, 容易满足检验条件, 即容易检出信号, 但由统计学理论可知犯“取伪”错误的概率也大, 即容易将背景随机波动误认为是有信号分布而“取伪”。  $\alpha$  小则  $W$  值大, 不容易满足检验条件, 检出信号的可信度增大, 但犯“弃真”的概率增大, 即容易将信号误认为是背景噪声的随机波动而“弃真”。

### 3 生物超微弱发光图像的信号检验

图 3(a) 首先要得到验证的是是否存在超微弱发光现象, 因为图像中心部分  $A$  光子计数密度略大可能是背景的随机波动引起的, 也有可能是昆明鼠  $A$  的超微弱发光叠加在背景上引起的, 如果是前者, 那么昆明鼠区域和背景区域为同一分布, 如果是后者, 那么昆明鼠区域和背景区域为同不同分布。为此作假设检验:

$$H_0: F(X) = G(X), \quad H_1: F(X) \neq G(X)$$

式中  $F(X)$  为昆明鼠区域光子的分布,  $G(X)$  为背景区域光子的分布。其计算为: 将图 3(a) 划分成  $17 \times 17 = 289$  个统计面积, 其中昆明鼠  $A$  所在的区域  $A$  为 58 个统计面积, 总光子数为 174。背景区域为 231 个统计面积, 总光子数为 284。如表 2 所示。其中  $f_{a_i}$ : 统计区域  $A$  中有  $i$  个计数的统计面积数,  $F_a$ : 统计区域  $A$  中的经验分布函数,  $f_{b_i}$ : 背景区域  $B$  中有  $i$  个计数的统计面积数,  $F_b$ : 背景区域  $B$  中的经验分布函数。

Table 2. Statistical data of ultra-weak bioluminescence image of Kunming mouse A

$i$	0	1	2	3	4	5	6	7	$\Sigma$
$f_{a_i}$	2	7	21	8	8	5	5	2	58
$F_a$	0.034	0.155	0.517	0.655	0.793	0.879	0.965	0.999	
$f_{b_i}$	74	70	59	19	5	2	2	0	231
$F_b$	0.320	0.623	0.879	0.961	0.982	0.991	1.000	1.000	

由表 2 可计算得到:  $\text{Sup}_{0 < M < +\infty} [F(U) - G(U)] = 0.468$ ,  $W / \sqrt{L} = 0.339$ , 其中取:  $L = nm / (m + n) = 58 \times 231 / (58 + 231) = 46$ ,  $w = 2.30$ 。

根据计算可得到结论: 图 3(a) 中心部分区域  $A$  和背景分布不同的概率是 99.5%, 因而可明确认为中心部分  $A$  和背景区域  $B$  不是同一分布。为从统计的观点证实昆明鼠  $A$  存在生物

超微弱发光, 实验在不同时刻采集昆明鼠 A 的发光图象, 每次采集的时间都为 136 sec, 以相同的方法计算共得到 8 次采集的数据统计如表 3 所列。

Table 3. Statistical data of ultra-weak bioluminescence image of Kunming mouse A at different time

number	1	2	3	4	5	6	7	8
statistical value	0.468	0.463	0.551	0.382	0.377	0.454	0.498	0.403

在 8 次采集过程中, 昆明鼠 A 固定在照相物镜前保持不动, 因而用于统计判断的  $W/\sqrt{L} = 0.339$  也保持不变, 可以得到结论: 在不同时刻采集的昆明鼠 A 发光图像中都可检测到有发光信号。上述采集过程是在 136 sec 内完成的, 叠加  $n$  幅图像可得到采集时间为  $136 \times n$  sec 的发光图像 ( $n = 1, 2, 3 \dots 8$ ), 以相同的统计方法可以检测到不同采集时间(大于 136 sec)的图像中的信号, 显而易见, 图像叠加后统计样本加大, 更容易检验到信号。因而可认为昆明鼠在不同采集时间的发光图像中都可以检测到发光信号。为进一步验证不同昆明鼠的发光现象的普遍性, 实验采用了 4 个不同的昆明鼠(A, B, C, D), 得到表 4 的数据:

Table 4. Statistical data of ultra-weak bioluminescence image of different Kunming mouse

	Kunming mouse A	Kunming mouse B	Kunming mouse C	Kunming mouse D
weight (g)	28	24	20	18
division area	17×17	25×25	20×20	20×20
statistical value	0.468	0.361	0.476	0.451
$W/\sqrt{L}$	0.339	0.316	0.373	0.373

表 4 中的数据不同体重的昆明鼠也都存在超微弱发光信号。

作为对照用和昆明鼠同样颜色的白纸团置于照相物镜前, 以同样的实验条件拍摄得到图像, 并用相同的方法统计图像, 得到的结论是: 白纸团区域和背景区域的分布是相同的。

不同体重的昆明鼠, 以及同一昆明鼠在不同时刻和不同时间内采集得到的超微弱生物发光图像中都可以用斯米尔诺夫统计方法检验得到图像中存在超微弱发光信号, 因而可得到的结论: 昆明鼠存在超微弱发光现象。

**结 论** 本文利用具有单光子探测能力的超高灵敏度光电探测系统得到了绿豆芽和昆明鼠的超微弱发光图像, 并且应用统计理论分析了区分信号和噪声的量化判据和影响判断的 5 个因素, 用上述的判据检验到实际获得的不同体重昆明鼠超微弱发光图像中的信号。上述理论不仅能应用于生物超微弱发光光子图像中的信号检验, 也可应用到其它光子图像。进一步的工作包括: 1) 用数值解法研究光子图像中对统计判据有影响 5 个因素; 2) 光子图像中局部特征的提取方法。3) 光子图像重构。

感谢本系赵达尊教授和周仁忠教授在光电统计理论上的悉心指导。

### 参 考 文 献

- [1] 胡天喜, 陈 杞, 陈克明等, 发光分析与医学, 第一版, 上海华东师范大学出版社, 1990 : 17~20
- [2] Fritz Albert Popp, Ulrich Warnke, Herbert L. Konig *et al.*, *Electromagnetic Bio-information*. 2nd edition, Germany, Urban & Schwarzenberg, 1989 : 140~141
- [3] W. H. R Langridge, A. Escher, M. Baga *et al.*, Use of low light image microscopy to monitor genetically engineered bacterial luciferase gene expression in living cells and gene activation throughout the development of a transgenic organism. *Proc. SPIE*, 1989, 1161 : 216~229
- [4] C. E. Hooper, R. E. Ansoorgeand, J. G. Rushbrooke, Low-light imaging technology in the life sciences. *J Biolumin Chemilumin*, 1994, 9 : 113~122
- [5] Gustav Bernroider, Processing biological images from very low light emissions. *J Biolumin Chemilumin*, 1994, 9 : 127~133
- [6] 韩於羹, 应用数理统计, 第一版, 北京, 北京航空航天大学出版社, 1989 : 140~144

## Statistical Testing in Ultra-Weak Bioluminescence Image

Chen Tianming      Yu Xin      Wang Susheng

(*Department of Optical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081*)

(Received 1 April 1995; revised 4 October 1995)

**Abstract** An ultra-sensitive imaging system with photocathode sensitivity of 0.5 cps/mm<sup>2</sup> has been developed to obtain the ultra-weak bioluminescence images of a sprouting Mung bean and a living Kunming mouse, and analysis with statistical theory was given for signal testing in these ultra-weak images. In this paper we analyzed the statistical judge to decide whether or not there is signal burying in noise under the condition that both signal and noise obey Poisson probability law, and discussed the five factors which have effects on the judge. With this judge, we have succeed in finding signal in the image of ultra-weak bioluminescence emitted by a living Kunming mouse.

**Key words** ultra-weak bioluminescence, statistical testing, signal testing, Poisson probability law