

超微弱发光图像的统计处理方法*

陈天明** 俞 信 王苏生

(北京理工大学光电工程系, 北京 100081)

摘 要 应用超高灵敏度的光电成像系统, 获得了活体昆明鼠的超微弱生物发光图像, 并用概率统计理论研究了光子图像中的光子频数分布, 得到了一种去除噪声的原则。文中首次提出了用 χ^2 准则拟合实际图像中的信号区和背景区分布, 并根据得到的统计估计值对光子图像进行处理的方法。该法对实验获得的昆明鼠的超微弱生物发光有较好的处理效果, 提高了图像的信噪比, 得到了好的观察效果。

关键词 超微弱生物发光图像, 光子图像, 图像处理, 统计处理。

1 引 言

超微弱发光图像是指光强能量极弱, 每次被探测器接收到的只是时间和空间都随机离散分布的光子, 到达某一位置的概率由光子的波粒二像性决定, 在长时间的叠加后, 才会得到有一定确定分布的图像信息。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, 本世纪 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及实验研究报道不多。Gustav Bernroider 研究了栗树叶的生物超微弱发光图像, 提出了用光学传递函数去除背景噪声的方法, 但是这种处理方法要求预先知道信号和背景的位置分布^[1], 然后将背景区域的计数去除, 留下信号区域的计数光子。Kurono 等研究了用光子图像探测 (Photon-counting image acquisition, PIAS) 系统得到人像的光子图像 (总计数 2×10^5), 并用滤波方法平滑图像以去除噪声^[2], 光子图像在总计数较大时, 观察效果类似一般的图像, 因而图像处理的方法也基本类似通常的处理方法。通常的滤波方法要求获得的总光子计数大, 不适用于总光子计数小的图像 ($10^2 \sim 10^4$)。迄今未见利用统计方法研究在 $10^2 \sim 10^4$ 范围内的未知信号和背景位置分布的图像处理的研究报道。

所有的有机体, 从细胞到人, 在进行新陈代谢的过程中都存在一种极微弱的光辐射。生物学家把生物体在进行新陈代谢过程中, 细胞自发辐射出的极其微量的光子流, 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)。生物超微弱发光光谱范围为 $200 \sim 800 \text{ nm}$ ^[3], 强度为 $10^0 \sim 10^4 \text{ Photons/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 。这种发光现象广泛存在于各种动物、植物、以及单细胞生

* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

** 现在中国科学院上海技术物理研究所, 上海 200083。

收稿日期: 1995 年 6 月 23 日

物之中^[4]。

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动物外表面的超微弱生物发光。

2 光子图像探测系统及生物超微弱发光图像

光子图像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(Japan, Hamamatsu C2166-01)、中继透镜、CCD 摄像系统(Canada, Dalsa Ca-D1)组成。可探测光谱范围 280~850 nm,暗计数为 0.35 cps(-15℃)。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($10^5 \sim 10^7$),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的光斑直径为 60 μm ,延迟时间 0.1 ms max。图 1(a)是用超微弱光探测系统得到的昆明鼠(16 g,生长期 28 day)在正常光照条件下立即移入暗箱后,在 136 sec 内累积的超微弱发光的光子图像,总计数为 304。图 1(b)是同样实验条件下昆明鼠在 408 sec 内积累的超微弱生物发光图像。

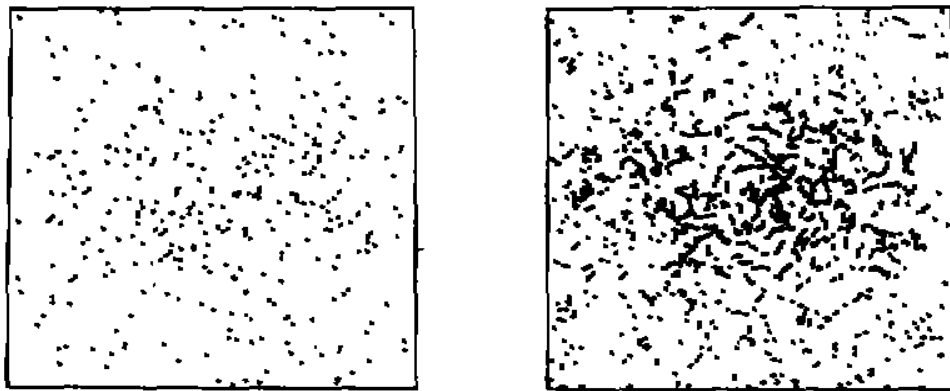


Fig. 1 Image of Ultra-weak bioluminescence emitted from Kunming rate before image processing

由于存在背景暗噪声的影响,使得图像的信号掩埋在噪声点中,观察效果差,为提高图像的观察质量,必须对图像进行处理以提高信噪比。

3 光子图像的概率分布研究

在没有关于光子图像中信号和背景的光子计数强度以及分布区域的先验知识的条件下($\lambda_a, \lambda_b, M, N$ 未知),为研究光子图像的处理方法,作假设如下:

1) 整个像面为 $A + B$,其中有信号的区域为 A , A 区的计数点称为信号区光子,背景区域为 B , B 区的计数称为背景区光子或噪声光子;

2) 光子图像总光子计数在 $10^2 \sim 10^4$ 范围内时,信号区光子和背景区光子在空间上都服从泊松分布(和实际获得的图像分布相符合);

3) 均匀划分整个像面为 $M + N$ 个统计区域,其中信号区域 A 占 M 个统计区域,背景区域 B 占 N 个统计区域;

4) 信号区域总的光子数为 P 个,背景区域的光子数为 Q 个,所以信号区域的率函数^[5](每个统计区域的平均光子数) λ_a 和背景区域的率函数 λ_b 分别为:

$$\lambda_a = P/M, \quad \lambda_b = Q/N \quad (1)$$

由探测系统的工作状态可知,信号和噪声的分布为:

$$\lambda_A = \lambda_{\text{signal}} + \lambda_{\text{noise}}, \quad (2)$$

$$\lambda_B = \lambda_{\text{noise}} \quad (3)$$

显然, $\lambda_A > \lambda_B$ 。则 A 区域某一统计区域的光子数满足泊松分布,为 K 的概率为:

$$P(U = k) = (\lambda_A^k / k!) \exp(-\lambda_A) \quad (4)$$

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

B 区域某一统计区域的光子数满足泊松分布,为 k 的概率为:

$$P(U = k) = (\lambda_B^k / k!) \exp(-\lambda_B) \quad (5)$$

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

因而,图像中任一统计区域中满足其中有 $K = 0, 1, 2, 3, \dots$ 个光子,并且光子为信号区光子的概率 P_{signal} 为:

$$P_{\text{signal}} = [M\lambda_A^k / (M+N)k!] \exp(-\lambda_A) \quad (6)$$

图像中任一统计区域中满足其中有 $K = 0, 1, 2, 3, \dots$ 个光子,并且光子为背景光子的概率 P_{noise} 为:

$$P_{\text{noise}} = [N\lambda_B^k / (M+N)k!] \exp(-\lambda_B) \quad (7)$$

根据上述的概率计算,可找到一个正整数 J ,使得当 $K = 0, 1, 2, \dots, J$ 时,满足:

$$(M\lambda_A^k / k!) \exp(-\lambda_A) < (N\lambda_B^k / k!) \exp(-\lambda_B) \quad (8)$$

即 $P_{\text{signal}} < P_{\text{noise}}$ 。

当 $K = J + 1, J + 2, \dots$ 时,满足:

$$(M\lambda_A^k / k!) \exp(-\lambda_A) \geq (N\lambda_B^k / k!) \exp(-\lambda_B) \quad (9)$$

即 $P_{\text{signal}} \geq P_{\text{noise}}$ 。

因而在某个统计区域中有 $1, 2, 3, \dots, J$ 个计数,这些计数是背景区的概率大于是信号区的概率。某一统计区域有 $J + 1, J + 2, \dots$ 个计数,这些计数是信号区的概率大于是背景区的概率。因而可根据去除的背景区光子概率大于去除的信号区光子概率的原则,去除统计区域内光子数小于等于 J 的区域中的光子,留下统计区域中光子数大于 J 的区域中的光子,以提高信噪比。

4 光子图像的统计处理方法

实际的光子图像并不知道信号的分布区域,无法得到 λ_A 和 λ_B ,也无法根据去除的背景区光子概率大于去除的信号区光子概率的原则,计算得到正整数 J 。

为在实际图像实施去除的背景区光子概率大于去除的信号区光子概率的原则,必须计算得到关于信号和背景的光子计数强度以及分布区域。均匀划分图像为 T 等份,设图像中总光子数为 S ,图像中某一统计区域内的光子数为 K 的概率服从分布:

$$P(U = K) = \frac{M}{M+N} \frac{\lambda_A^k}{K!} \exp(-\lambda_A) + \frac{N}{M+N} \frac{\lambda_B^k}{K!} \exp(-\lambda_B) \quad (10)$$

其中, $M + N = T$, $\lambda_A M + \lambda_B N = S$ 。

统计每个区域内的光子数,得到统计区域内光子数观察值 $k_1, k_2, k_3, \dots, k_n$,根据概率理论,可由似然函数的求得极大似然估计量^[7],得到未知参数 $\lambda_A, \lambda_B, M, N$ 。但实际上求取极大似然估计量过于复杂,即使用数值解法也不易求得。

为简单地估计到 λ_A , λ_B , M , N 的值, 可用 X^2 - 准则^[6], X^2 - 准则认为当总体服从某一分布时, 根据统计得到某一事件出现的次数 f_i 和理论计算得到这一事件出现的次数 np_i 的差异应小于某一数值, 因而只要找到一组 λ_A , λ_B , M , N , 使得 X^2 为最小值, 同时能够以一定的检验水平 α 满足:

$$X^2 = \sum \frac{(f_i - np_i)^2}{np_i} < X_{1-\alpha}^2(K - r - 1) \quad (11)$$

对于给定的检验水平 α , 可查 $X_{1-\alpha}^2(K - r - 1)$ 临界值表, K 为统计 np_i 的区域数, r 为估计的参数的个数, 在本文中 $r = 2$ 。因而可用满足公式(13)的一组 λ_A , λ_B , M , N 来作为统计估计值, 进而可用来计算 J 。为此用 C 语言编制了上述过程的计算机程序, 可对光子图像进行计算机自动处理, 图 1(a)和图 1(b)的原始图像经过程序处理后为图 2(a)和图 2(b)。

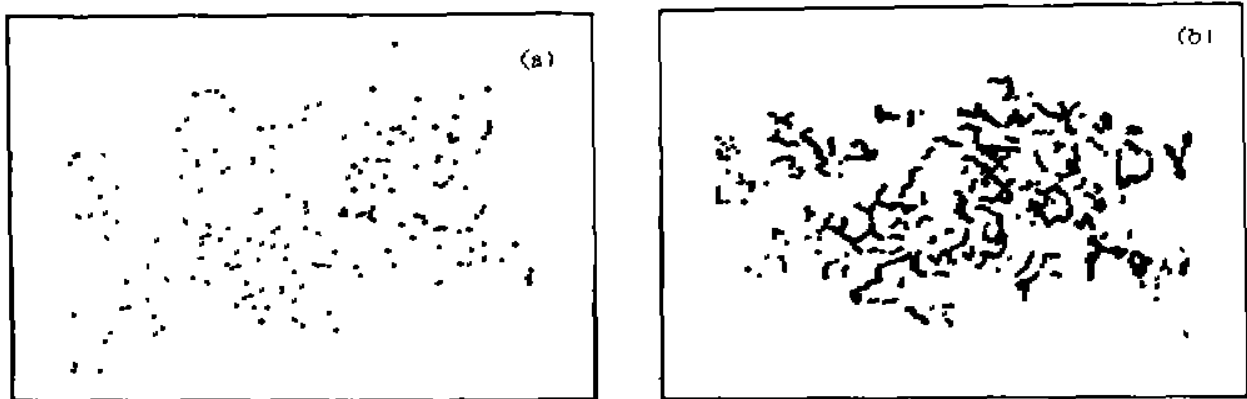


Fig. 2 Image of Ultra-weak bioluminescence emitted from Kunming rats after image processing

图 2(a)总计数为 503, 划分为 16×16 统计区域, 根据 X^2 原则拟合出 $\lambda_A = 4.88$ (信号区率函数), $\lambda_B = 1.26$ (背景区率函数), $M = 50$ (信号区的区域数), $N = 206$ (背景区域数), 同时得到 $X^2 = 11.925$ 。比较拟合出信号和背景分布经计算得到 $J = 3$, 根据去除的背景区光子概率大于去除的信号区光子概率的原则, 去除统计区域中计数小于等于 3 的统计区域中的计数, 共去除了 264 个计数, 剩下 239 个光子, 再去除图像中孤立统计区域中的计数 32 个, 最后输出的图像中有 207 个计数。图 2(b)总计数为 1482, 划分成 32×32 个统计区域, 拟合出 $\lambda_A = 4.09$, $\lambda_B = 0.578$, $M = 178$, $N = 1304$, $X^2 = 3.793$, 计算得到 $J = 3$, 根据 X^2 原则去除了 884 个计数, 再去除了 86 个孤立统计区域中的计数, 处理后的图像中只有 512 个计数。可以看到处理后的图像中只有原始图像的 $1/3 \sim 1/2$ 的计数, 图像的观察效果有明显的提高, 图 2(b)基本显示了昆明鼠的轮廓。

结 论 本文首次应用概率统计理论研究了总光子计数为 100~1000 时的光子图像(无信号和噪声的强度以及分布的先验知识)的光子概率统计分布, 得到了从图像中统计出信号和背景在一幅图像中各占的比例和对应光子计数率的方法, 以及用统计的数据对图像进行处理的方法。上述图像处理方法对实验得到的昆明鼠的生物超微弱发光图像有较好的处理效果, 并且可应用于其它光子图像。

参 考 文 献

- [1] Gustav Bernroider. Processing biological images from very low light emissions. *J Biolumin Chemilumin*, 1994, 9: 127~133

- [2] T. Kurono, T. Kawashima, M. Katoh *et al.*, Image processing on photon-counting imaging. *Proc. SPIE* 1985, 575: 225~231
- [3] 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
- [4] Fritz-Albert Popp, *Recent Advances in Biophoton Research and It's Application*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, 1992: 1~41
- [5] 陈天明, 俞 信, 王苏生, 超微弱生物发光图像中的统计检验. *光学学报*, 1996, 16(8): 1157~1162
- [6] 戚康男, 秦克诚, 程 路, 统计光学导论. 第一版, 天津, 南开大学出版社, 1987: 115~130
- [7] 韩於龔, 应用数理统计, 第一版, 北京, 北京航空航天大学出版社, 1989: 35~43
- [8] 傅 权, 胡蓓华, 基本统计方法教程. 第一版, 上海, 华东师范大学出版社, 1989: 268~290
- [9] 陈希孺, 柴根象, 非参数统计教程. 第一版, 上海, 华东师范大学出版社, 1993: 249~251

Statistical Processing Method of Ultra-Weak Bioluminescence Images

Chen Tianming Yu Xin Wang Susheng

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

(Received 23 June 1995)

Abstract An ultra-sensitive imaging system was developed and used to obtain the ultra-weak bioluminescence image of a living Kunming mouse, and statistical analysis was used for studying photon frequency distribution. In this paper, for the first time we use X^2 ruler to calculate the signal photon and background photon distribution parameters for the image processing. It has been proved that this method is effective in processing the ultra-weak bioluminescence images. The S/N ratio is increased and the image quality is improved.

Key words ultra-weak bioluminescence image, photon image, image processing, statistical processing