

文章编号: 0253-2239(2010)12-3631-06

多光谱荧光影像的纯光谱分析与信号分离

黄远程 张良培 李平湘 钟燕飞

(武汉大学测绘遥感信息工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430079)

摘要 多光谱活体荧光成像技术正逐渐成为生物医学研究的关键技术,但是荧光物质光谱之间的串扰和自发荧光现象严重影响了荧光影像的解译。混合光谱分解对于去除活体多光谱荧光影像自发荧光效应和进行多种荧光信号分离是非常有效的技术,但是光谱分解的前提是获得了各种荧光物质的光谱。基于多元曲线解析-交替最小二乘法(MCR-ALS)计算框架,提出包括非负、等式、闭合性、单峰、波段范围及归一化的多约束条件的荧光纯光谱估计方法,利用估计的纯光谱和线性混合光谱模型得到不同荧光信号的分离,去除自发荧光背景对起标记目的的荧光物质信号的干扰。Dirichle 分布随机混合构造的不同信噪比和纯净水平的荧光蛋白混合光谱数据分析结果反映出在混合问题严重、有噪声影响的情况下,该算法要比传统端元光谱分析方法的精度高 10 倍以上。活体鼠多光谱量子荧光影像的实验也证明了该算法在信号分离上的有效性。

关键词 光谱学;自发荧光;线性混合光谱分解;多元曲线解析-交替最小二乘法;多光谱荧光影像

中图分类号 TP751 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS20103012.3631

Pure Spectral Analysis and Fluorescent Signal Separation for Multispectral Fluorescence Imaging

Huang Yuancheng Zhang Liangpei Li Pingxiang Zhong Yanfei

(State Key Laboratory of Information Engineering in Surveying, Mapping, and Remote Sensing,
Wuhan University, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract One of the most important issues in biomedical research is in vivo fluorescence-based multispectral imaging, but quantitative image analysis has been generally perturbed by the cross talk problem of fluorescence signals and significant autofluorescence problem of tissues. Spectral unmixing is a useful technique in multispectral fluorescence imaging for reducing the effects of native tissue autofluorescence and separating multiple fluorescence probes in vivo. While spectral unmixing methods are well established in fluorescence microscopy, which typically rely on precharacterized spectra for each fluorophore. A spectral unmixing algorithm tailored for in vivo optical imaging that is able to find the signal distribution and the pure spectrum of each component is introduced. It is derived from multivariate curve resolution-alternative least square (MCR-ALS) method using multiple constraints such as nonnegative, equality, closure, unimodal, spectral range and normalization. The signal distribution maps help to separate autofluorescence from other probes in the raw images and hence provide better quantification and localization for each probe. The test of mixed spectral samples with abundance fractions generated by Dirichlet distribution demonstrates that the algorithm is robust with different noises and pure spectral. And a quantum dots mouse multispectral fluorescence image has convinced this method.

Key words spectroscopy; autofluorescence; linear spectral unmixing; multivariate curve resolution-alternative least square (MCR-ALS); multispectral fluorescence imaging (MSFI)

收稿日期: 2010-03-01; **收到修改稿日期**: 2010-04-21

基金项目: 国家 973 计划(2009CB723905)、国家 863 计划(2009AA12Z114)和国家自然科学基金(40930532, 40901213 和 40771139)资助课题。

作者简介: 黄远程(1983—)男,博士研究生,主要从事高光谱图像信息处理与模式识别等方面的研究。

E-mail: yuancheng.huang@gmail.com

导师简介: 张良培(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事遥感信息工程方面的研究。

E-mail: zlp62@public.wh.hb.cn(通信联系人)

本文电子版彩色效果详见中国光学期刊网(<http://www.opticsjournal.net>)

1 引言

多光谱活体生物荧光成像技术是近年发展起来的一项分析检测技术,由于荧光技术操作简单便捷,可进行多重标记。多光谱影像的非侵入式的检测和图像与光谱信息集成的优势,使这一技术逐渐成为生物学研究的关键技术^[1~3]。然而,由于起标记目的的荧光物质的光谱(FLS)之间的相互串扰问题,以及活体组织产生的自发荧光与 FLS 严重的重叠问题,限制了成像的质量及对影像的解译,特别是自发荧光现象成为影响定量分析的瓶颈^[4]。

Zimmerman^[5], James R. Mansfield 等^[6]的研究表明,多光谱荧光影像的光谱信号是 FLS 与自发荧光光谱信号的线性混合,故而能通过线性混合光谱分解技术求解不同的荧光物质对所观测的混合信号的贡献,达到分离不同荧光信号的目的。但混合光谱分解的前提是各荧光的参考光谱是已知的,而获取活体 FLS 的纯净光谱是困难的,因为活体 FLS 信号中掺杂着自发荧光;此外由于活体内的环境不同于离体环境,也不能直接采用荧光标准光谱库应用于混合分析。最可靠的方式是直接 from 影像中提取各荧光目标的纯净光谱信号^[4,7,8],但传统的从影像中寻找最纯净的端元像元算法如 N 查找算法(N-FINDR)^[8]、迭叠代端元分析(IEA)^[8]、顶点组分分析(VCA)^[9]以及正交投影分析(OPA)^[10],需先验地假设影像中代表端元光谱的像元是纯净的,而这对于活体荧光影像的 FLS 信号是不现实的。对此,本文提出多约束条件的多元曲线解析-交替最小二乘法(MCR-ALS)活体多光谱荧光影像纯净光谱提取算法,通过对非负、等式、单峰性和波段范围等多种约束性条件的分析,无需假设端元光谱纯净像元,得到影像中各荧光端元纯光谱的估计,以此为基础分离不同荧光光谱信号,并以灰度图像排列和假彩合成两种方法表达不同荧光信号的分布情况。

2 基本原理

2.1 多约束性条件 MCR-ALS 多光谱荧光影像光谱分析与信号分离原理

2.1.1 线性光谱混合模型

多光谱荧光影像^[4]中的混合光谱遵循比尔-朗伯(Beer-Lambert)定律,即不同的光信号是互不干扰的,且当信号中含有多种光谱组分时,总的吸收光谱是各组分的加性和。

设 \mathbf{X} 为多光谱荧光影像,将其写成 $(n \times l)$ 数值

矩阵, n 是像素总数, l 是波段数,每一行表示一个像素光谱,若影像中有 p 种荧光信号 $\mathbf{E} = [e_1, \dots, e_k, \dots, e_p]$, $e_k \in R^l$, $1 \leq k \leq p$, e_k 是 l 维列向量,纯净荧光信号通常称为端元。那么观测的混合光谱信号的线性模型表达为

$$x_i = \mathbf{E}w_i + \epsilon_i \quad i = 1, \dots, n, \quad (1)$$

式中 w_i 是 p 维列向量,是表示各荧光信号对混合信号的组分丰度贡献,要求满足组分丰度为正且闭合,即

$$w_{i,k} \geq 0, \quad k = 1, \dots, p \sum_{k=1}^p w_{i,k} = 1, \quad (2)$$

式中 ϵ_i 表示模型误差。对 n 个观测测量将(1)式写成矩阵形式, $\mathbf{W} = (w_1, w_2, \dots, w_n)^T$ 。

$$\mathbf{X} = \mathbf{E}\mathbf{W}^T + [\epsilon_1, \epsilon_2, \dots, \epsilon_n]^T. \quad (3)$$

2.1.2 基于 MCR-ALS 的多约束性计算方法

在一给定的影像中,荧光端元光谱或丰度贡献通常是未知的,不妨设 $\hat{\mathbf{E}}$ 和 $\hat{\mathbf{W}}$ 分别为端元光谱及其丰度贡献的估计,那么它们需符合最小二乘估计准则:

$$(\hat{\mathbf{E}}, \hat{\mathbf{W}}) = \min f(\mathbf{E}, \mathbf{W}) = \min \text{tr}[(\mathbf{X} - \mathbf{E}\mathbf{W}^T) \sum^{-1} (\mathbf{X} - \mathbf{E}\mathbf{W}^T)^T]. \quad (4)$$

对于(4)式 de Juan 等^[11]和 Van Benthem 等^[12]等发展了 MCR-ALS 计算框架,将问题分解为两个子问题:

$$\hat{\mathbf{E}}^{k+1} = \arg \min f(\mathbf{E}, \mathbf{W}^k), \quad (5)$$

$$\hat{\mathbf{W}}^{k+1} = \arg \min_{A \geq 0} f(\mathbf{E}^{k+1}, \mathbf{W}), \quad (6)$$

式中 \mathbf{W}^k 和 $\hat{\mathbf{E}}^{k+1}$ 代表第 $k+1$ 次迭代待估计的光谱上一循环中估计的组分丰度, $\hat{\mathbf{W}}^{k+1}$ 是在 $\hat{\mathbf{E}}^{k+1}$ 的基础上求得。2 个子问题在未加约束条件的情况下可分别用最小二乘求解得到

$$\hat{\mathbf{W}}_{(j+1)} = \mathbf{X} * \mathbf{E} * (\mathbf{E}^T * \mathbf{E})^{-1}, \quad (7)$$

$$\hat{\mathbf{E}}_{(j+1)}^T = (\mathbf{W}^T * \mathbf{W})^{-1} * \mathbf{W}^T * \mathbf{X}. \quad (8)$$

但这存在着不确定性问题,即若 \mathbf{T} 是 $p \times p$ 非奇异矩阵,那么

$$\mathbf{X} = \mathbf{W}_{\text{old}} \mathbf{E}_{\text{old}}^T = (\mathbf{W}_{\text{old}} \mathbf{T})(\mathbf{T}^T \mathbf{E}_{\text{old}}^T) = \mathbf{W}_{\text{new}} \mathbf{E}_{\text{new}}^T. \quad (9)$$

很明显,这存在无数组满足等式的可行解。为了获得有意义的真实解,需将反映光谱和组分丰度的物理意义及其先验信息作为约束条件加入到求解中。根据实际情况,增加以下约束:1)非负约束,2)等式约束,3)闭合约束,4)波段约束。

非负约束 1),即各组分的贡献非负和光谱信号的数值是非负, $w_{i,k} \geq 0$, 或 $e_{j,k} \geq 0$, 在此限制下(5)和(6)式实际是非负最小二乘约束求解问题,采用经典的活动集非负最小二乘法(NNLS)及其改进的快

速非负最小二乘法(FNNLS)求解^[13]。

等式约束 2)是在掌握了某端元光谱或某组分丰度值的先验值的情况下采用降低解的不确定性的有效约束,采用加权增广矩阵的方法将已知信息纳入到计算中^[12]。加权增广矩阵计算模型如下表达:

$$\begin{bmatrix} \boldsymbol{\eta} \\ \lambda g \end{bmatrix} \approx \begin{bmatrix} \boldsymbol{\Psi} \\ \lambda \mathbf{H} \end{bmatrix} b. \quad (10)$$

观测向量 $\boldsymbol{\eta}$ 中的增广项 g 是关于被求变量 b 的先验信息,增广变量 \mathbf{H} 作用于变量 b ,具有定位和投影的功能, λ 是加权罚系数,大小根据对约束的期望来调节, λ 越大约束越强。

①假设第 t 条端元光谱 $\mathbf{e}_t = (e_{t,1}, e_{t,2}, \dots, e_{t,i})^T (1 \leq t \leq p)$ 是已知的,则令 $\boldsymbol{\eta} = \mathbf{X}_j, g = e_{t,j}, \boldsymbol{\Psi} = \mathbf{W}, \mathbf{H} = [0, \dots, 1, \dots, 0]$, b 是第 j 波段待求的所有端元的值。对于荧光影像而言,活体的自发荧光光谱可通过样区定义来获得,可以作为已知信息形成等式约束。

②假设第 k 个端元对混合光谱的组分贡献已知 $w^k = [f_1, f_2, \dots, f_n]$, 则令 $\boldsymbol{\eta} = \mathbf{x}_i, g = f_i, \boldsymbol{\Psi} = \mathbf{E}, \mathbf{H} = [0, \dots, 1, \dots, 0]$, $b = w_i$ 。

当不对求解过程施加等式约束时,通常对光谱施加归一化约束,其中最大—最小值归一化约束是最常用的,用以将光谱标定在 0~1 的范围

$$x_{ij}^{norm} = (x_{ij} - x_i^{min}) / (x_i^{max} - x_i^{min}). \quad (11)$$

闭合约束 3)即所有组分的贡献之和为常数,由于这一常数通常为 1,故又称和为 1 约束,也可以通过加权增广矩阵的方法将其作为问题的一部分纳入到计算中,即令 $\boldsymbol{\eta} = \mathbf{x}_i, g = 1, \boldsymbol{\Psi} = \mathbf{E}, b = w_i, \mathbf{H} = [1, \dots, 1, \dots, 1]$ 。

约束 4)是针对具有典型的激发光波峰或发射光波峰的荧光光谱的约束,即需要抑制除了最大的光谱波峰外的其它波峰,所以又称为单峰性约束^[11],实现中允许最大波峰外的局部波峰保持为原波峰值的 0.5 倍,这一约束在求解荧光端元光谱时具有将最大波峰左右两边光谱曲线单调化和平滑化的作用;此外 FLS 的光谱不是全波段分布,存在一个光谱波段边界,即光谱边界之外的值为 0。

2.2 基于多约束条件的多光谱荧光影像光谱分析与信号分离算法流程

以上的约束条件大大地缩小了目标解的范围,因为只有满足这些条件求解得到的荧光端元光谱才是所期待的解。基于此论文提出以下活体多光谱荧光影像光谱分析框架,如图 1 和图 2 所示。图 1 中

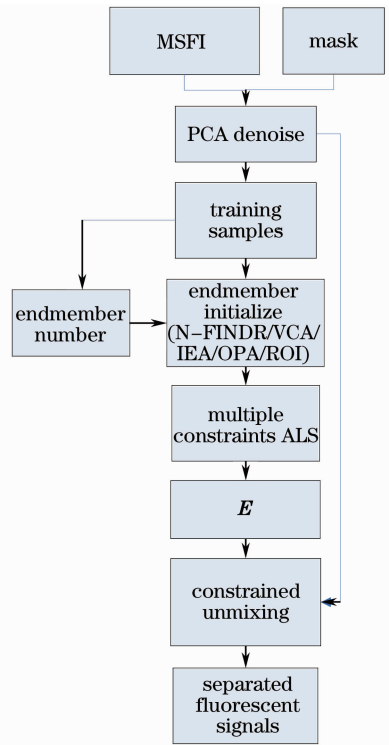


图 1 多光谱荧光影像光谱分析框架

Fig.1 Spectral analysis frame work of multispectral fluorescence image

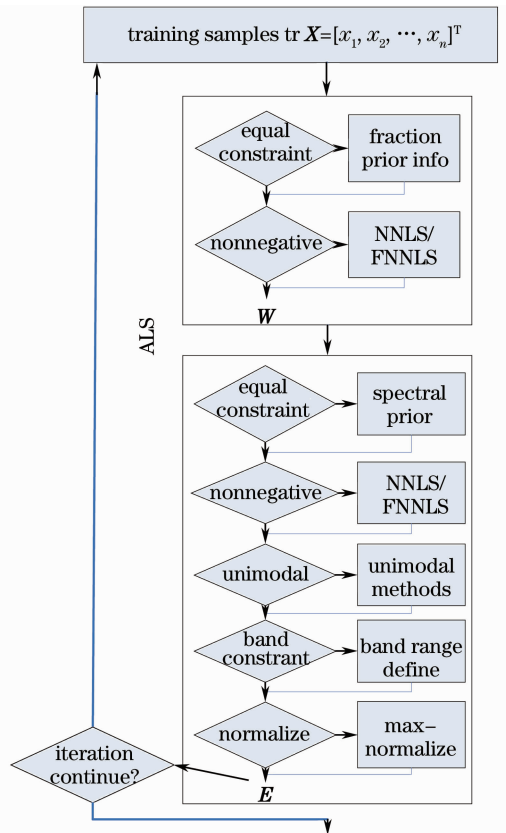


图 2 多限制条件的 ALS 计算流程

Fig.2 Flow chart of multiple constraints ALS

输入数据包括影像、影像掩膜和先验信息。影像为写成 $n \times l$ 形式的二维数组矩阵;掩膜用于屏蔽活体目标以外的背景,降低分析计算的复杂性;为了减少噪声的影响,采用传统的主成份逆变换(PCA)的方式实现去噪;训练样本通过用户自定义或者基于纯净像素指数(PPI)^[8]为基础的边界点的方式获取。通过搜索相对较纯的光谱作为初始光谱,故利用传统端元提取结果或者训练样区的平均光谱;图2为通过ALS的计算框架将以上不同约束加入计算中,迭代计算使得估计值沿着约束方向逼近,终止条件为迭代次数或误差阈值。最后将对训练样本计算得到的端元光谱估计值用于对整个影像进行混合光谱分解,混合分解时仅对组分做非负与闭合约束,从而达到分离不同荧光信号的目的。

3 实验与结果分析

3.1 模拟数据分析

3.1.1 模拟数据构建

为了验证算法的稳健性,从 <http://www.invitrogen.com/> 网站的荧光光谱库下载经归一化处理的三种荧光光谱数据:青色荧光蛋白(CFP),增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和黄色荧光蛋白(YFP),如图3所示。荧光蛋白适用于标记肿瘤细胞、病毒和基因等。通过Dirichlet分布^[8]随机构造光谱混合比例,各组分贡献满足非负性,以及贡献之和为1的约束,并以混合比例中的最大值表示混合光谱的纯净度,如(0.3:0.5:0.2)的混合比例,其纯净度为0.5,以 ρ 表示混合光谱信号的纯净度,对任意满足 $\rho - 0.1 < \rho_i < \rho$ 的混合光谱,定义纯净水平为 ρ 。实验中设定了 $\rho = 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1$ 七级不同纯净度水平,对每级纯净度水平的数据添加加性高斯噪声,分别设定了信噪比(SNR)为25,35,45,65,以及不加噪声5种情况。不同纯净度水平和信噪比的情况,构造了1500个混合光谱样本。

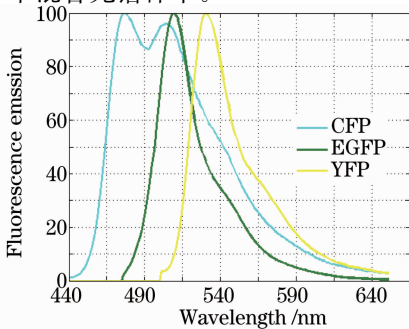


图3 CFP,EGFP,YFP 荧光射发光谱曲线

Fig. 3 Fluorescent emission spectra of CFP, EGFP, YFP

3.1.2 算法测度

利用估计光谱和参考光谱的光谱相似性光谱角度绘制(SAM),以及估计组分与参考组分贡献的误差来评价本文方法得到的纯净光谱的可靠性。

1)光谱角。假设对 p 个荧光光谱的估计分别 $(\hat{e}_1, \hat{e}_2, \dots, \hat{e}_p)$,参考光谱为 (e_1, e_2, \dots, e_p) ,那么

$$\theta_{\text{SAM}} = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \left[\arccos \left(\frac{e_i^T \hat{e}_i}{\|e_i\| \|\hat{e}_i\|} \right) \right]^2}, \quad (12)$$

式中 θ_{SAM} 记为平均相似度,其值越小,表明结果越好;

2)分解误差。假设 f_i 和 \hat{f}_i 分别为第 i 个荧光光谱的对混合光谱信号的贡献的实际值和参考值, ϵ_{RMS} 记为均方误差,那么

$$\epsilon_{\text{RMS}} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \|f_i - \hat{f}_i\| / N. \quad (13)$$

3.1.3 结果分析

图4为SNR为45情况下,分别利用多约束多曲线解析-交替最小二乘法(MCR-ALS)方法和顶点组分分析(VCA)做纯净光谱估计。曲线中标识的数值点表示在七级不同纯净度水平中估计得到的光谱与参考光谱的光谱角平均值。很明显本文所反演的纯净光谱的差异性远远小于(1个数量级的差距)传统的VCA算法估计得到的,更趋近于实际光谱。表1是SNR为25,35,45,65, $\rho = 0.7, 0.8, 0.9, 1$ 的光谱相似性和均方误差。从整体上看,随着纯净水平和信噪比的提高,误差变小;对于每一纯净水平,MCR-ALS的均方误差在不同SNR下的波动比传统方法要小。表中加粗数字为同一噪声水平下的最小值。顶点组分分析-全约束最小二乘法(VCA-FCLS)^[14]利用VCA算法得到的端元光谱估计,采用全限制性分解混合光谱。

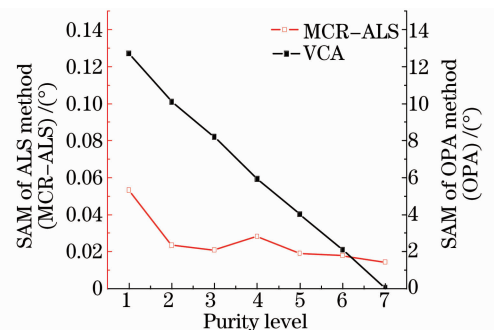


图4 本文方法与VCA方法估计的端元光谱比较

Fig. 4 SAM similarity evaluated for endmembers extracted by our method and VCA

表 1 不同纯净水平和噪声信噪比下的多约束 MCR-ALS 与 VCA-FCLS 的光谱与组分贡献估计的精度比较
Table 1 Comparison between multiple constraints MCR-ALS and VCA-FCLS by SAM similarity and rmse

Method	ρ	θ_{SAM}					ϵ_{rms}				
		SNR /dB					SNR /dB				
		25	35	45	65	∞	25	35	45	65	∞
MCR-ALS	0.7	0.1601	0.0441	0.0532	0.0932	0.0979	0.0074	0.0024	0.0011	0.0014	0.0014
	0.8	0.1341	0.0363	0.0209	0.0651	0.0708	0.0072	0.0023	0.0008	0.0007	0.0008
	0.9	0.1001	0.0325	0.0191	0.0665	0.0710	0.0073	0.0024	0.0008	0.0008	0.0009
	1.0	0.1447	0.0385	0.0143	0.0112	0.0003	0.0068	0.0023	0.0008	0.0003	0
VCA-FCLS	0.7	12.4472	12.6998	12.7053	13.3476	13.346	0.1532	0.1502	0.1506	0.1596	0.1596
	0.8	7.733	8.1533	8.2099	8.247	8.2475	0.1006	0.1057	0.1062	0.1066	0.1065
	0.9	3.2609	3.7483	4.0232	4.0748	4.0739	0.0497	0.053	0.0561	0.0567	0.0567
	1.0	0.7873	0.1285	0.045	0.0069	0.0003	0.0125	0.0034	0.0009	0.0001	0

3.2 活体鼠荧光影像分析

3.2.1 数据

图 5(a)是一只利用采用 CRI's (www.cri-inc.com) Maestro™ 成像系统^[3,15]获取的光谱分辨率为 10 nm 的量子点标记的荧光鼠图片,光谱范围为 580~700 nm,实验鼠在成像的前 3 周异种移植注

射了 C4-2 前列腺癌细胞,成像前 2 h 注射了抗-前列腺特异性膜抗原(anti-PSMA)抗体与激发 640 nm 量子点(QD),用于标识癌细胞。量子点信号是肋部区域隐晦可见的红色着色区域,但受到因食物叶绿素引起的远红色荧光信号和鼠组织自发荧光信号的干扰,加大了癌细胞分布区域识别的难度。

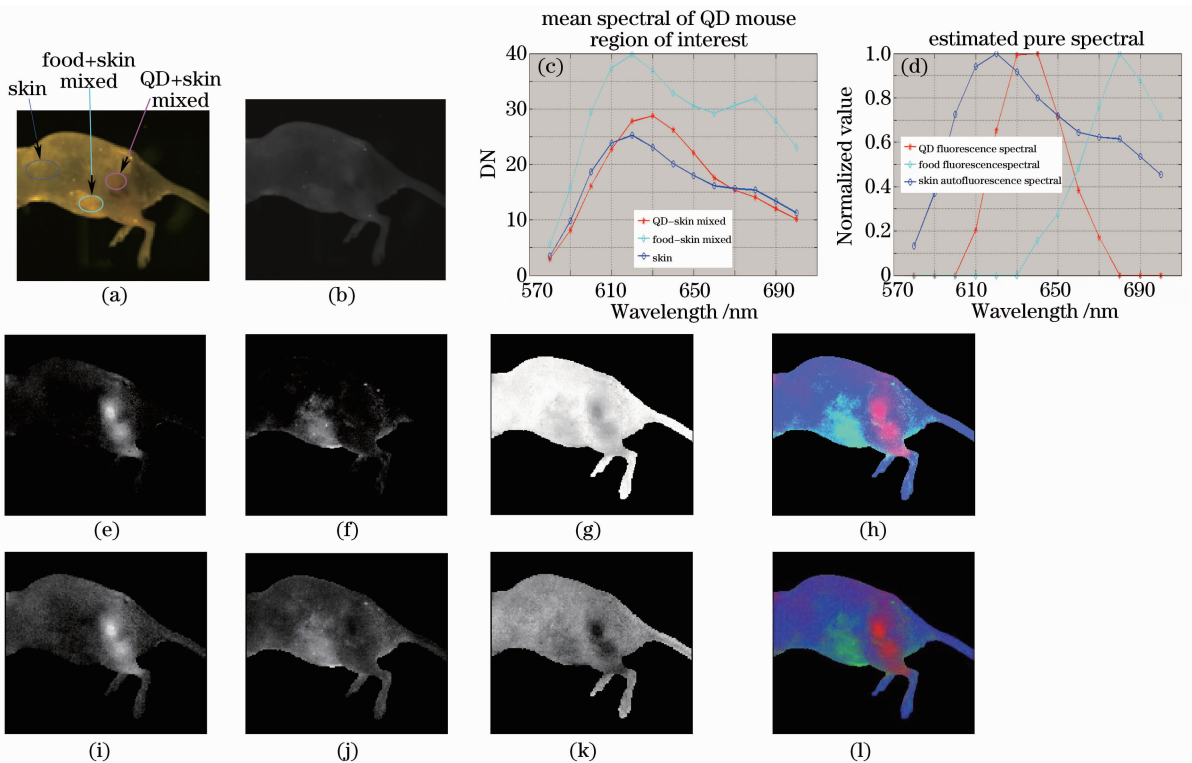


图 5 活体鼠多光谱量子点荧光影像信号分离

Fig. 5 Signals separation for QD fluorescent multispectral imaging of in-vivo mouse

3.2.2 实验方案

1) 基于用户定义样本的纯光谱计算及混合分解

通过初步解译,定义如图 5(a)三个样本区域,包括两个混合信号区域,以样区数据作为训练样本: QD+skin 对应为量子点荧光信号与活体自发荧光

信号混合样区,food+skin 为食物荧光信号和活体荧光信号混合的样区,与 skin 对应的相对较纯的组织自发荧光样区,图 5(c)为三样区的平均光谱。此外用户掌握的信息还包括量子点荧光与食物叶绿素荧光的波峰光谱区域范围,分别为 600~670 nm 和

640~700 nm。因而,以 QD+skin 样区为训练样本,估计 QD 光谱;以 food+skin 样区为训练数据,估计叶绿素荧光光谱。其中组织自发荧光光谱认为已知。故约束条件包括:光谱和组分贡献非负性,组织自发荧光已知,单峰约束,波段约束和归一化约束。

2) 基于 PPI 边界点样本纯光谱计算与混合分解

当用户无法提供初步解译信息时,应用 2.2 节的计算流程中 VCA 端元初始化方法得到不同信号的光谱初始估计,由于用户自定义信息不足,故本方案中的约束条件为:光谱和组分贡献非负性,单峰约束和归一化约束;通过 Envi 软件得到对 PPI 的计算,以掩膜后影像中 5% 的具有最大 PPI 值的像素作为训练样本。

3.3 荧光组分丰度影像的伪彩叠加分析方法

通过计算,不同的荧光信号以灰度图像排列,图像中亮度越强表明信号越集中;为了便于解译,不同的荧光丰度图像赋予不同的颜色,以假彩色图像的形式^[16]能同时表达多个荧光对象的强度及其相对分布。图 5(d)为 1) 方案估计的光谱,图 5(e)是分离的量子点信号,图 5(f)为分离的叶绿素信号,图 5(g)为自发荧光信号分离结果,图 5(h)是 3 种信号伪彩叠加,图 5(d)为估计得到的量子点和叶绿素的荧光纯光谱。图 5(i)为自动算法得到的信号分离结果,图 5(i)为 B 方案分离的量子点信号,图 5(j)为叶绿素信号区域,图 5(k)为分离的自发荧光信号,图 5(c)是这 3 种信号的伪彩叠加。在对 FLS 纯净光谱未知的情况下,对比于出现了相对较强量子荧光信号的 630 nm 影像,两种方案都获得了对不同荧光的信号分离结果。由于 1) 方案提供的用户信息相对 2) 方案充分,故获取的信号分离结果要好于 2) 方案。各信号成分的伪彩叠加有效地增强了活体影像的解译能力。

4 结 论

对自发荧光背景去除以及荧光混合信号分离问题进行了分析,取得了以下成果:1) 考虑自发荧光光谱的可获得性,激发荧光光谱特有的光谱响应范围,以及光谱和组分丰度内在的非负与闭合性的特性提出了多约束 MCR-ALS 纯光谱计算方法,相对于传统端元光谱提取方法,该算法能有效解决光谱混合严重情况下的纯光谱估计,且具有很好的稳定性;2) 基于估计的不同荧光光谱信号和线性混合分解模

型,有效地分离了多光谱荧光影像的不同荧光信号。可以预见在荧光标记技术逐渐成为生物医学的关键技术的背景下,该方法将会得到有效的应用。

参 考 文 献

- 1 C. Vonesch, F. Aguet, J. L. Vonesch *et al.*. The colored revolution of bioimaging[J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2006, **23**(3): 20~31
- 2 Li Jing, Zeng Hongjuan, Pang Xiaofeng. Study of autofluorescence spectrum between hepatic carcinoma cell and hepatic cell[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(8): 2261~2263
李 静, 曾红娟, 庞小峰. 肝癌细胞和正常肝细胞的自体荧光光谱研究[J]. *光学学报*, 2009, **29**(8): 2261~2263
- 3 Lin Xiaogang, Pan Yingjun, Guo Yongcai. Study on autofluorescence spectral feature for cancer cell in different stages of cell cycle[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(5): 1328~1331
林晓钢, 潘英俊, 郭永彩. 癌细胞细胞周期自体荧光光谱特征[J]. *光学学报*, 2009, **29**(5): 1328~1331
- 4 J. R. Mansfield, K. W. Gossage, C. C. Hoyt *et al.*. Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, **10**(4): 41207
- 5 T. Zimmermann. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy [C]. *Adv. Biochem. Engng. Biotechnol.*, 2005, **95**: 245~265
- 6 J. R. Mansfield, C. Hoyt, R. M. Levenson. Visualization of microscopy based spectral imaging data from multi-label tissue sections[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2008, **84**: 14.19.1~14.19.15
- 7 F. Nadrigny, I. Rivals, P. G. Hirrlinger *et al.*. Detecting fluorescent protein expression and co-localisation on single secretory vesicles with linear spectral unmixing [J]. *Eur. Biophys. J. Biophys.*, 2006, **35**(6): 533~547
- 8 A. Plaza, P. Martinez, P. Perez *et al.*. A quantitative and comparative analysis of endmember extraction algorithms from hyperspectral data[J]. *IEEE T. Geosci. Remote*, 2004, **42**(3): 650~663
- 9 J. M. P. Nascimento, J. M. B. Dias. Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data[J]. *IEEE T. Geosci. Remote*, 2005, **43**(4): 898~910
- 10 F. C. Sa'nchez, J. Toft, B. vanden Bogaert *et al.*. Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment[J]. *Anal. Chem.*, 1996, **68**(1): 79~85
- 11 A. de Juan, R. Tauler. Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications[J]. *Crit. Rev. in Anal. Chem.*, 2006, **36**(3): 163~176
- 12 M. H. Van Benthem, M. R. Keenan, D. M. Haaland. Application of equality constraints on variables during alternating least squares procedures[J]. *J. Chemometrics*, 2002, **16**(12): 612~622
- 13 R. Bro, S. Dejong. A fast non-negativity-constrained least squares algorithm[J]. *J. Chemometr.*, 1997, **11**(5): 393~401
- 14 D. C. Heinz, C. I. Chang. Fully constrained least squares linear spectral mixture analysis method for material quantification in hyperspectral imagery [J]. *IEEE T. Geosci. Remote*, 2001, **39**(3): 529~545
- 15 R. M. Levenson, D. T. Lynch, H. Kobayashi *et al.*. Multiplexing with multispectral imaging: From mice to microscopy[J]. *Illar J.*, 2008, **49**(1): 78~88
- 16 N. Raksuntorn. Unsupervised Spectral Mixture Analysis for Hyperspectral Imagery[D]. Mississippi State University, 2009