

应用共焦空间微分显微镜获取边缘增强显微图像

吴丽如¹ 唐志列^{1,2} 吴泳波¹ 池妍¹ 黄敏芳¹

(¹ 华南师范大学物理与电信工程学院, 广东 广州 510006
² 广东省量子调控工程与材料重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要 生物样品图像边缘增强与提取是医学图像处理的关键技术之一, 是进行生物样品形态分析的基础。图像边缘增强通常是通过计算机编程对原始图像进行后期处理来实现的, 然而, 这里应用共焦空间微分显微镜系统, 实现了在获得样品共焦显微图像的同时直接获取对应的边缘增强显微图像, 且图像分辨率与对比度较高。实验不仅获取了掩膜板与标准分辨率板 RTA-07 的边缘增强图像, 说明系统分辨率达到 $1.5 \mu\text{m}$, 而且实现了生物细胞的边缘增强图像的获取, 如血红细胞与口腔上皮细胞, 图像可用于样品尺度与面积等形态的分析与计算, 在生物医学研究中有实际应用意义。

关键词 图像处理; 共焦显微镜; 边缘增强图像; 空间微分技术; 细胞; 形态分析

中图分类号 O766⁺.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201434.0317001

Application of Spatial Differential Confocal Microscopy in Obtaining Edge Enhanced Microscopic Images

Wu Liru¹ Tang Zhilie^{1,2} Wu Yongbo¹ Chi Yan¹ Huang Minfang¹

¹ School of Physics and Telecommunication Engineering, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China

² Key Laboratory of Quantum Engineering and Quantum Materials, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract Edge enhancement and extraction of biological samples' images are one of the key technologies for the processing of medical images, and the basis of samples' morphological analysis. In general, the realization for image edge enhancement is through post processing of original images by computer programming. However, spatial differential confocal microscopy system has been applied to directly obtain the high resolution and contrast edge enhanced microscopic images of samples while the confocal microscopic images are obtained. The biomedical application is demonstrated not only for edge enhancement imaging for a mask and a resolution test target (RTA-07) that shows the resolution of the system is $1.5 \mu\text{m}$, but also for edge enhancement imaging for biological cells like RBCs and oral epithelial cells. The obtained edge enhanced microscopic images can be used for simply sample morphological analysis and calculation, such as the scale and area, which has a practical application significance in the research of biomedicine.

Key words image processing; confocal microscopy; edge enhanced images; spatial differential technique; cells; morphological analysis

OCIS codes 170.0180; 170.1790; 100.2980

1 引言

医学图像已成为临床诊断、病理分析及治疗的

重要依据, 对医学图像的处理使得医生对人体内部病变部位的观察更直接和清晰, 确诊率更高^[1-3]。

收稿日期: 2013-10-21; **收到修改稿日期**: 2013-11-12

基金项目: 国家自然科学基金(61178086)、广东省自然科学基金重点项目(S2013020012810)

作者简介: 吴丽如(1987—), 女, 硕士研究生, 主要从事激光共聚焦显微成像和光声成像方面的研究。

E-mail: forexamplewu@126.com

导师简介: 唐志列(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事光声成像和激光共聚焦显微镜等方面的研究。

E-mail: tangzhl@senu.edu.cn(通信联系人)

边缘是图像本质特征之一,一幅图像就相当于一个信息库,大部分的信息是由图像的边缘轮廓所提供的,因此生物样品图像边缘增强与提取是医学图像处理的关键技术之一^[4-7],是进行样品形态分析的基础,增强提取的结果直接影响到病情的分析和诊断,目前已应用于医学图像匹配、肿瘤病灶确定、造影血管检测、各种时期癌症细胞的识别、冠心病诊断、左心室边缘抽出等方面^[8-10]。现有的图像边缘增强方法主要是在获得原始图像后通过计算机编程处理来实现的,是图像处理领域的研究热点,近年来随着计算机技术与数学的发展,出现了不少新的方法,主要的方法有微分法(Sobel、Robert算子等)、小波变换法、数学形态法、模糊检测法等^[4-8]。

然而,本课题组近期提出了一种新的实现共焦显微镜空间微分的方法^[11],将空间微分技术引入到共焦显微镜中,初步实验已发现其可实现图像边缘增强。可由于早期实验条件的限制,得到的实验结果并不理想,图像的分辨率低。在前期工作的基础上,进一步研究了共焦空间微分显微成像技术,搭建了共焦空间微分显微镜系统,此系统不仅可以获得生物样品的共焦显微图像,还可直接获得对应的边缘增强显微图像,不需后期的图像编程处理。

本文应用自制的共焦空间微分显微镜系统直接获取样品高分辨率与高对比度边缘增强显微图像。先是通过标准分辨率板等规则样品的边缘增强图像的获取,测试得到系统的分辨率较高。而后进一步应用此系统到生物细胞中,实现了生物细胞的边缘增强显微图像的获取,得到了人血红细胞(RCBs)和口腔上皮细胞的边缘增强图像,最后根据得到的边缘图像进行了样品形态分析与计算。

2 实验方法

2.1 共焦空间微分显微镜的原理

基于光源、被照物点和探测器三点彼此共轭的原理,共焦显微镜利用光电探测器探测样品的反射

光,将反射光信号转化成电信号,信号经采集与处理后重构出样品的共焦显微图像^[12]。在共焦显微镜的基础上,要实现边缘增强显微图像的获取,即提取出边缘信号并利用边缘信号进行图像重构,可以采用空间微分的方法,实现探测光信号 $I(x)$ 对样品上对应空间位置 x 的微分,数学上可以表示为

$$\frac{dI}{dx} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta I}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{I(x + \Delta x) - I(x)}{\Delta x}.$$

当样品上相邻空间两点的反射光强度相等时,探测器探测到的微分信号为 0,而当样品上相邻空间两点的反射光强度相差较大时,探测器探测到的微分信号则是一个峰值信号,也就是边缘信号,从而可以实现边缘信号的提取,最终实现图像边缘增强。因此,将共焦显微镜与空间微分技术相结合构建共焦空间微分显微镜系统,可以实现边缘增强显微图像的获取。

空间微分技术实质上是互补调制技术与激光扫描技术的结合^[11,13],激光扫描技术使得入射激光束连续扫描,实现了两束调制光束到达样品上的空间两点距离足够小 $\Delta x \rightarrow 0$ 。互补调制技术是空间微分技术的关键,其作用是将入射光束调制成两束强度相同、相位相反的光束,从而实现探测光信号的差分 $I(x + \Delta x) - I(x)$ 。

互补调制模块由互补斩波器与分束-合束器组成,分束器将入射激光束 i 分成两束强度相同的光束 i_1, i_2 。当斩波器以调制频率 ω 转动时, t 时刻 i_1 通过斩波器,而在 $t + \Delta t$ 时刻 i_2 通过斩波器,二者轮流地通过互补斩波器,从而被调制成两束强度相同、相位相反的光束, i_2 在相位上相对 i_1 延迟了 $\pi(\omega \Delta t = \pi)$,分别表示为 $i_1(t) = i_0 \cos(\omega t)$ 与 $i_2(t + \Delta t) = i_0 \cos(\omega t + \pi)$ 。 i_1, i_2 先后被聚焦到样品上,光电探测器探测到的反射光信号 I 不仅与入射光束有关,还与样品自身有关。当光束以速度 v 进行连续扫描时,探测器接收到总光强信号可表示为

$$\begin{aligned} I &= I_1(t) + I_2(t + \Delta t) = C \cdot \mu(t) \cdot i_1(t) + C \cdot \mu(t + \Delta t) \cdot i_2(t + \Delta t) = \\ &C \cdot \mu(x) \cdot i_0 \cos(\omega t) + C \cdot \mu(x + v\Delta t) \cdot i_0 \cos(\omega t + \pi) = C \cdot \mu(x) \cdot i_0 \cos(\omega t) - \\ &C \cdot \mu(x + \Delta x) \cdot i_0 \cos(\omega t) = Ci \cdot \mu(x) - Ci \cdot \mu(x + \Delta x) = I(x) - I(x + \Delta x), \end{aligned} \quad (1)$$

式中 C 是与实验条件有关的常数, $\mu(x)$ 是与样品自身有关的系数。由上式可知,互补调制技术实现了光强信号的差分。

2.2 实验装置与系统

共焦空间微分显微镜系统原理图如图 1 所示,波长为 514.5 nm 的氩离子激光器 (Argon ion

laser, 35LAL515-230, CVI Melles Griot) 作为光源,其输出的连续光首先进入互补调制模块,将入射光束调制成两束轮流通过互补斩波器的调制光。两束调制光束完全沿着同一路径,通过二向色镜到达振镜后由物镜聚焦到样品上。振镜(6231C, Cambridge Technology)由振镜控制电路控制,使聚焦光斑相对于样品作水平二维扫描。样品的反射光沿原光路返回,经物镜到达振镜后再由二向色镜

反射,最后经聚焦通过针孔后到达光电倍增管(PMT)(CR131, Beijing Hamamatsu)进行探测。PMT接收到空间微分信号后送到锁相放大器(SR830, Stanford Research Systems)对其解调并放大,由数据采集卡(PCI6115, National Instrument)采集数据并存储到电脑,通过计算机算法重建出样品的边缘增强显微图像。

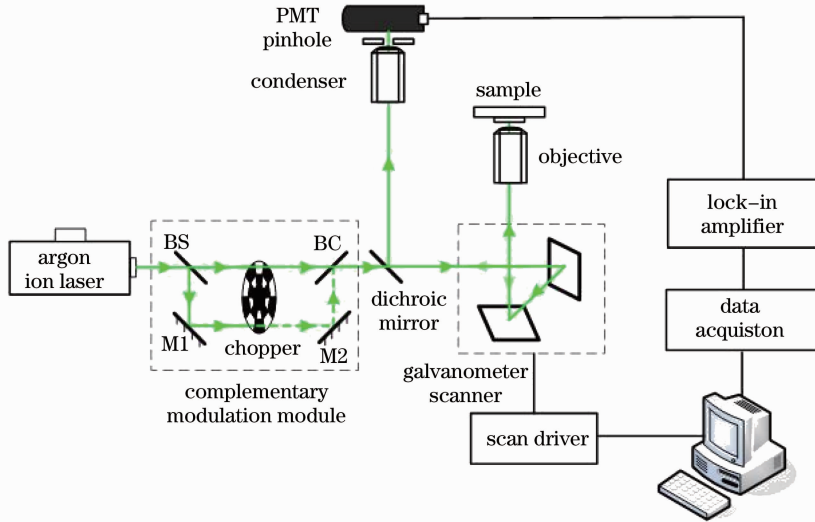


图1 共焦空间微分显微镜系统原理图

Fig. 1 Schematic of confocal spatial differential microscopy system

本实验系统在早期工作基础上进行了优化,改善早期实验图像分辨率低的问题,实现高分辨率边缘增强图像的获取。首先是振镜扫描装置的改进,要满足实现空间微分条件之一 $\Delta x \rightarrow 0$,必须使入射光束连续扫描,这就要求振镜连续运动,而驱动电压的步长大小决定其运动的连续性,步长减小时 Δx 变小,因此本系统通过设法减小驱动电压步长,由早期的 5 mV 优化到本系统中的 1 mV,从而实现了分辨率的提高。其次,根据不同的样品特点,采用不同

数值孔径的物镜,提高系统分辨率。由分辨极限公式 $Z = 0.61\lambda/NA$,其中 Z 为显微物镜最小分辨距离, λ 为光源波长, NA 为显微物镜的数值孔径,可得数值孔径 NA 越大,分辨率越高。

3 实验结果与分析

3.1 获取掩膜板边缘增强显微图像

由于共焦显微镜自身对光路调节的要求很高,所以共焦空间微分显微镜系统的搭建对光路的要求

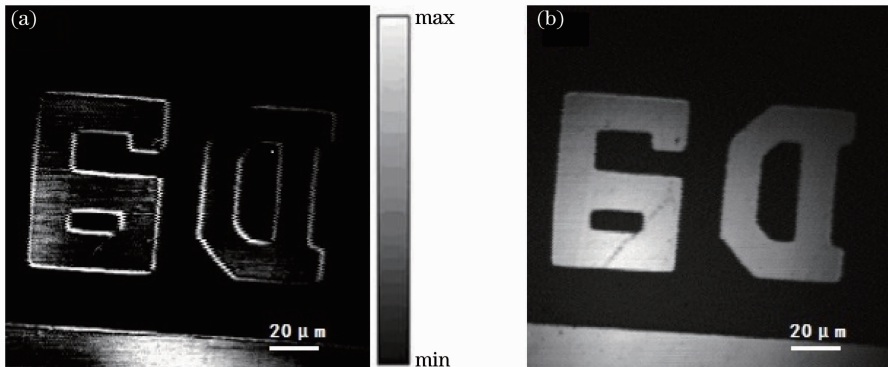


图2 掩膜板成像。(a)边缘增强显微图像;(b)共焦显微图像

Fig. 2 Imaging of mask. (a) Edge enhanced microscopic image; (b) confocal microscopy image

更高,两束调制光束必须严格合束沿着同一路径。为了验证此系统获取边缘增强显微图像的可行性,形状规则取材容易的掩膜板首先作为样品进行了实验。实验采用的显微物镜是 $20\times$ ($NA=0.40$)的平场透镜,激光输出功率设置在最小处 15 mW ,图像像素为 $250\text{ pixel}\times 250\text{ pixel}$ 。

图2(a)是掩膜板的边缘增强显微图像,图2(b)是其对应的共焦显微图像。从图2可以看出,图像对比度高,与前期实验结果相比,图像分辨率明显提高了,边缘增强显微图像边缘清晰突出,边缘增强效果很好,从而说明了应用共焦空间微分显微镜获取边缘增强显微图像的可行性,可以很好地实现样品图像边缘增强。

3.2 获取标准分辨率板边缘增强显微图像

为了将共焦空间微分显微镜系统应用到对生物医学研究有意义的样品,首先选用国家标准分辨率板(JJG 827-1993, RTA-07)进行实验,可测试本系统的分辨率。实验采用的物镜是 $25\times$ ($NA=0.40$)平场透镜,图3(a)是对分辨率板进行共焦空间微分显微成像得到的边缘增强图像,图3(b)是图(a)中红色线水平 a 到 a 范围内对应信号归一化后的数据图像

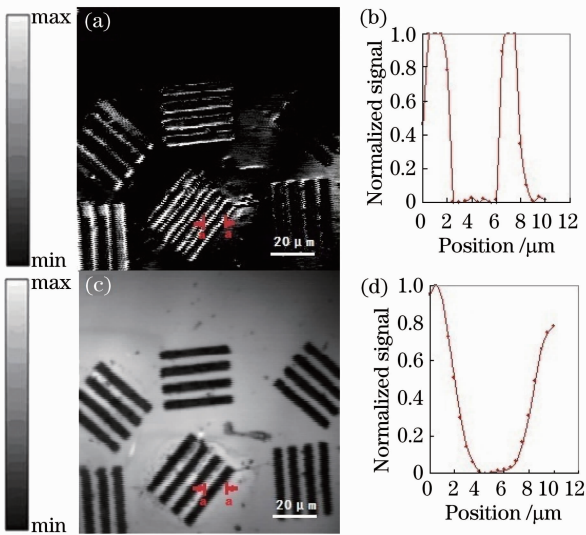


图3 分辨率板成像。(a)边缘增强显微图像;(b)图(a)中红色线 a 到 a 水平范围归一化数据图像;(c)共焦显微图像;(d)图(c)中红色线 a 到 a 水平范围归一化数据图像

Fig. 3 Imaging of the resolution plate. (a) Edge enhanced microscopic image; (b) normalized signals at the sections highlighted by the space from a to a in Fig. (a); (c) confocal microscopy image; (d) normalized signals at the sections highlighted by the space from a to a in Fig. (c)

图像,图3(c)是图(a)相对应的共焦显微图像,图3(d)是图(c)中红色线水平 a 到 a 范围内对应信号归一化后的数据图像。

由图像可知,将共焦空间微分显微镜系统应用到标准分辨率板,可得到较高分辨率的边缘增强显微图像,且可很容易地由图3(b)得到分辨率板的线条宽度约为 $5\text{ }\mu\text{m}$,边缘轮廓线的宽度约为 $1.5\text{ }\mu\text{m}$,由此可得此系统可以清楚地分辨 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ 的距离,即间距大于 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ 的两个线物体能被分辨,系统分辨率达到 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ 。

3.3 获取血红细胞边缘增强显微图像

为了实现将共焦空间微分显微镜系统应用到生物细胞中,人血红细胞被选为样品进行实验。由于人血红细胞较小,其直径一般小于 $10\text{ }\mu\text{m}$,所以采用的物镜放大倍数为60倍($NA=0.75$)。图4(a)是系统直接获取的血红细胞的边缘增强显微图像,图4(b)是图(a)中红色线水平 a 到 a 范围内对应信号归一化后的数据图像,图4(c)是图(a)相对应的共焦显微图像,图4(d)是图(c)中红色线水平 a 到 a 范围内对应信号归一化后的数据图像。

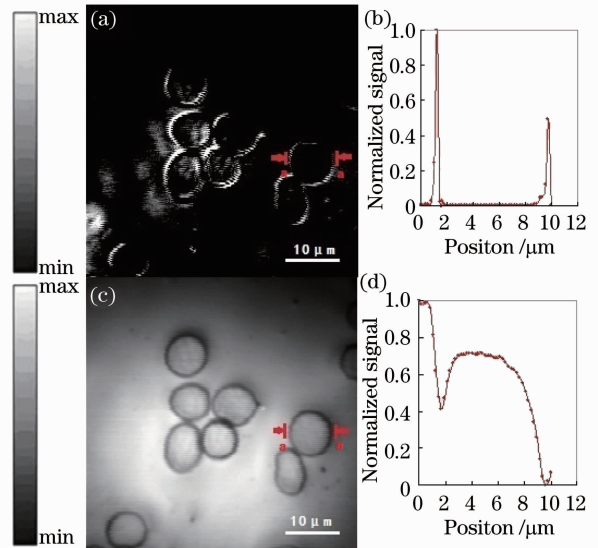


图4 血红细胞成像。(a)共焦空间微分显微图像;(b)图(a)中红色线 a 到 a 水平范围归一化数据图像;(c)共焦显微图像;(d)图(c)中红色线 a 到 a 水平范围归一化数据图像

Fig. 4 Imaging of RBCs. (a) Edge enhanced microscopic image; (b) normalized signals at the sections highlighted by the space from a to a in Fig. (a); (c) confocal microscopy image; (d) normalized signals at the sections highlighted by the space from a to a in Fig. (c)

由图4可知,共焦空间微分显微镜系统成功地应用到生物细胞样品中,可直接获取到其对应的边缘增强显微图像。而且,可根据边缘增强显微图像对样品形态做简单的分析,由图4(b)的边缘增强图像对应的数据曲线可知,两个图线尖峰很好地确定了细胞的边缘位置,很容易地得到血红细胞的直径约为 $8\ \mu\text{m}$,面积约为 $50\ \mu\text{m}^2$ 。

3.4 获取口腔上皮细胞边缘增强显微图像

实际的生物医学研究中,所研究的生物细胞大部分都是不规则的,因此将共焦空间微分显微镜系统应用于不规则的生物细胞可使得此系统应用更全面,容易取材的口腔上皮细胞被选为实验样品,实验采用 $40\times$ ($NA=0.65$)的物镜。

图5(a)是口腔上皮细胞的边缘增强显微图像,图5(b)是其对应的共焦显微图像。由图5不仅可知共焦空间微分显微镜系统可应用到不规则形状的生物细胞中获取边缘增强图像,且可知此系统还可应用于无色透明细胞,得到的边缘增强显微图像分辨率高,细胞的微细结构得到了突显。

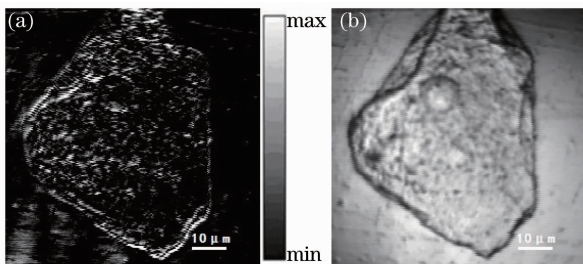


图5 口腔细胞成像。(a)边缘增强显微图像;
(b)共焦显微图像

Fig. 5 Imaging of oral epithelial cells. (a) Edge enhanced microscopic image; (b) confocal microscopy image

4 结 论

研究了共焦空间微分显微镜的原理,并搭建了共焦空间微分显微镜系统,不仅将其应用到形状规则的掩膜板,直接得到清晰的边缘增强显微图像,与前期结果相比图像分辨率与对比度明显提高,说明了此系统获取边缘增强图像的可行性,而且将此系统应用到对生物医学领域有实际意义的样品中,特别是应用到生物细胞中,实现了对标准分辨率板、血红细胞与不规则的无色透明口腔上皮细胞的成像,均很好地实现了边缘增强与微细结构的突显,系统分辨率达到 $1.5\ \mu\text{m}$ 。根据得到的边缘增强图像可以对样品的形态做简单的分析,大致计算了标准分辨率板的线条宽度、血红细胞的直径与面积等。由

此可知,共焦空间微分显微镜系统可应用于实际的生物医学研究中,获取的清晰的边缘增强显微图像可作为样品形态分析与相关计算的基础。

参 考 文 献

- 1 T McInerney, D Terzopoulos. Deformable models in medical image analysis: a survey [J]. *Medical Image Analysis*, 1996, 1(2): 91-108.
- 2 D L Pham, C Xu, J L Prince. Current methods in medical image segmentation [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2000, 2: 315-337.
- 3 Chen Wufan, Qin An, Jiang Shaofeng, *et al.*. Medical image analysis: state of the art and future directions [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2008, 27(2): 175-182. 陈武凡, 秦安, 江少峰, 等. 医学图像分析的现状与展望[J]. *中国生物医学工程学报*, 2008, 27(2): 175-182.
- 4 Duan Yuping. Studies on Compression and Edge Detection of Medical Image [D]. Huainan: Anhui University of Science and Technology, 2011. 段宇平. 医学图像的压缩及边缘检测研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2011.
- 5 Li Tiangang, Wang Supin. Edge detection for gastric tumor pathologic cell images based on morphology [J]. *J Image and Graphics*, 2004, 9(10): 1234-1238. 李天钢, 王素品. 基于形态学方法的胃癌病理细胞图像的边缘检测[J]. *中国图像图形学报*, 2004, 9(10): 1234-1238.
- 6 Qu Junle, Chen Dezhi, Niu Hanben. Application of wavelet edges detection method in fluorescence lifetime imaging microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 1998, 18(9): 1234-1238. 屈军乐, 陈德智, 牛憨笨. 应用小波边缘检测技术分析荧光寿命显微像[J]. *光学学报*, 1998, 18(9): 1234-1238.
- 7 Hu Wengang, Wang Yongzhong, Hua Wenshen. Edge enhancement of input image by using the polarizable character of spatial light modulator [J]. *Optical Technique*, 2007, 33(2): 289-292. 胡文刚, 王永仲, 华文深. 利用空间光调制器的偏振特性实现图像边缘增强[J]. *光学技术*, 2007, 33(2): 289-292.
- 8 Yuan Hua, Teng Qizhi, Yuan Zhirun, *et al.*. Edge-detection and its application in medical image processing [J]. *Chinese J Biomedical Engineering*, 2001, 18(1): 149-153. 袁华, 滕奇志, 袁支润, 等. 边缘检测及其在医学图像中的应用[J]. *生物医学工程杂志*, 2001, 18(1): 149-153.
- 9 Y Zhu, H Yan. Computerized tumor boundary detection using a Hopfield neural network [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 1997, 16(1): 55-67.
- 10 M Sonka, G K Reddy, M D Winniford, *et al.*. Adaptive approach to accurate analysis of small-diameter vessels in cineangiograms [J]. *IEEE Trans Med Imaging*, 1997, 16(1): 87-95.
- 11 Zhang Man, Tang Zhilie, Tan Zhiliang, *et al.*. New method of spatial differential imaging with confocal microscope [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(3): 183-187. 张曼, 唐志列, 谭治良, 等. 一种实现共焦显微镜空间微分成像的新方法[J]. *光学学报*, 2012, 32(3): 183-187.
- 12 T Wilson. *Confocal Microscopy* [M]. London: Academic Press, 1990.
- 13 H C Tang, Z L Tang, Y B Wu, *et al.*. Differential photoacoustic microscopy technique [J]. *Opt Lett*, 2013, 38(9): 1503-1505.

栏目编辑: 韩峰