



基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法

千佳 党诗沛 周兴 但旦 汪召军 赵天宇 梁言生 姚保利 雷铭

Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform

Qian Jia Dang Shi-Pei Zhou Xing Dan Dan Wang Zhao-Jun Zhao Tian-Yu Liang Yan-Sheng Yao Bao-Li Lei Ming

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 69, 128701 (2020) DOI: 10.7498/aps.69.20200352

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200352>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

结构光照明技术在二维激光诱导荧光成像去杂散光中的应用

Structured illumination for two-dimensional laser induced fluorescence imaging to eliminate stray light interference

物理学报. 2019, 68(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190977>

表面等离激元结构光照明显微成像技术研究进展

Research progress of plasmonic structure illumination microscopy

物理学报. 2017, 66(14): 148701 <https://doi.org/10.7498/aps.66.148701>

受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展

New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy

物理学报. 2020, 69(10): 108702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200168>

结构光照明显微中的偏振控制

Polarization control methods in structured illumination microscopy

物理学报. 2017, 66(14): 148704 <https://doi.org/10.7498/aps.66.148704>

小波变换在太赫兹三维成像探测内部缺陷中的应用

Wavelet transform in the application of three-dimensional terahertz imaging for internal defect detection

物理学报. 2017, 66(8): 088701 <https://doi.org/10.7498/aps.66.088701>

基于希尔伯特变换的结构光照明快速 三维彩色显微成像方法*

千佳¹⁾²⁾ 党诗沛¹⁾²⁾ 周兴¹⁾ 但旦¹⁾ 汪召军³⁾ 赵天宇¹⁾²⁾
梁言生³⁾ 姚保利^{1)2)†} 雷铭^{2)3)‡}

1) (中国科学院西安光学精密机械研究所, 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 西安 710119)

2) (中国科学院大学光电学院, 北京 100049)

3) (西安交通大学理学院, 西安 710049)

(2020年3月9日收到; 2020年4月2日收到修改稿)

结构光照明显微是一种宽场显微技术, 可以实现超分辨成像和三维光切片成像. 基于HSV (色相、饱和度、明度) 彩色空间的结构光照明全彩色三维光切片成像技术可以复原样品表面的真彩色信息, 但每一层光切片都需要采集3幅固定相移差的原始图像, 这对于需要多视场拼接的大尺寸样品而言, 图像采集数据量大、图像重构时间长的缺点就凸显出来. 鉴于此, 本文提出一种基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法, 只需在样品的每一层采集2幅原始图像便可以重构出该层的全彩色光切片图像, 因此图像采集量减少了1/3, 图像重构时间节约了约28%, 有效提高了彩色三维成像的效率和速度.

关键词: 三维成像, 结构光照明, 彩色, 显微

PACS: 87.64.M-, 42.66.Ne, 87.85.Pq, 42.79.-e

DOI: 10.7498/aps.69.20200352

1 引言

生物结构在不同尺度、不同维度和不同部位的观察与形态分析, 为科学研究提供最直接的证据, 在众多学科领域扮演了不可或缺的角色. 目前生物结构的二维形态观察手段已非常成熟, 但三维技术手段却相对滞后. 三维光学成像技术具有非接触、快速、精确等优点, 是获取样品表面形态特征的一种重要手段, 也是真实物体三维数字化的基础, 在生物医学、精密测量等领域发挥着重要作用.

色彩信息是描述生物体特征的一个重要物理量, 生物体表面色彩的不同色相、饱和度和明度在很大程度上反映了其微观结构和光学性质的不同.

例如昆虫体表的结构色大都是由其表面的微纳结构产生, 结构色已成为昆虫分类和物种鉴定的一个重要指征^[1-3]. 以激光扫描共聚焦显微镜为代表的点扫描显微成像技术具有三维层析成像能力^[4-6], 结合多通道融合技术可以获得三维荧光样品的伪彩图像^[7,8], 但是受制于滤光片的有限带宽, 激光共聚焦扫描显微镜无法复原样品的真实全彩色信息.

而作为一种宽场显微技术, 结构光照明显微 (structured illumination microscopy, SIM) 可以实现超分辨成像^[9-11] 以及三维光切片成像^[12-15], 在生物医学等领域已经获得了广泛的应用. 光切片SIM成像首先由牛津大学的Neil等^[12]提出, 使用面阵相机采集3幅固定相移差的原始图像并通过均方根 (root mean square, RMS) 运算重构出样品

* 国家自然科学基金 (批准号: 91750106, 61905189, 81427802) 和国家重点研发计划 (批准号: 2017YFC01101000) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yaobl@opt.ac.cn

‡ 通信作者. E-mail: ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

去除离焦背景的光切片图像. 其基本原理是显微镜有一定的景深, 因此 CCD 相机得到的图像实际上是焦面信息和离焦背景的叠加. 在显微成像时, 高频信息会随着离焦距离的增加而快速衰减, 只有焦面的信息才会保持不变. SIM 使用具有不同相位的高空间频率正弦条纹对样品进行照明, 因此只有焦平面附近才会出现条纹, 而离焦区域的条纹会迅速衰减变为均匀的宽场照明, 这相当于对焦面的目标进行了编码, 而离焦背景保持不变, 这也是使用不同相位的结构光照明样品时, 离焦背景保持不变的原因 [16–19]. 2015 年, 我们使用彩色数字相机记录白光或多色结构光照明获得的彩色图像, 使用基于色相 (hue)、饱和度 (saturation)、明度 (value) 空间的 HSV 彩色光切片算法 (HSV color space-root mean square algorithm, HSV-RMS), 实现了高分辨全彩色快速三维成像 [20]. 通过多视场拼接技术, 2019 年我们进一步实现了厘米量级昆虫样品的高分辨率全彩色三维成像 [21].

HSV-RMS 方法需要采集 3 幅固定相移差的图像并通过 RMS 算法计算重构出一幅消除离焦背景的光切片图像, 因此需要采集 3 倍于普通宽场成像的图像数据, 而且其彩色图像重构过程需要在 H, S, V 3 个通道中分别进行 3 次 RMS 运算以及 2 次 RGB 和 HSV 空间的图像转换, 计算耗时较大. 2015 年, 我们课题组提出了一种基于希尔伯特变换的快速 SIM 三维成像方法, 只需采集 2 幅任意相移差的原始图像便可以重构出一幅光切片图像 [19], 但是该技术当时局限于单色三维成像, 无法恢复样品的彩色信息. 鉴于此, 本文将希尔伯特变换的快速光切片算法与彩色结构光照明光切片技术结合, 提出一种新的基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法 (Hilbert-transform-based color optical sectioning method, HT-COS), 相比于 HSV-RMS 方法, HT-COS 的图像采集量减少了 1/3, 图像重构时间节约了约 28%. 该方法有望进一步扩展 SIM 技术的适用领域, 在生物学、材料科学研究中获得重要应用.

2 SIM 光切片算法

2.1 RMS 光切片算法

RMS 层析解码算法需要通过改变结构光场的相位获取 3 幅子图像, 相邻子图像之间的加载条纹相位差通常需严格匹配至 $2\pi/3$, 继而通过特定的

公式提取出焦面信息, 这是目前应用最为广泛的方法, 由 Neil 等 [12] 首先提出.

假设所使用的结构照明正弦条纹光场强度分布满足:

$$I_{\sin}(x, y) = 1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0), \quad (1)$$

其中, m 为正弦条纹的调制度, p 为条纹的空间频率, φ_0 为条纹的初相位. 使用 3 幅相移差为 $2\pi/3$ 的结构照明光场对样品进行照明, 可得采集到的 3 幅图像的表达式为

$$\begin{aligned} I_0(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{2\pi/3}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + 2\pi/3)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{4\pi/3}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + 4\pi/3)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \end{aligned} \quad (2)$$

其中, I_{in} 表示样品的焦面图像信息, I_{out} 表示离焦部分的图像信息, 只有焦面图像 I_{in} 受到了正弦条纹光场的调制, 对采集到的 3 幅图像两两相减可得到去除离焦背景的 3 幅结构照明图像:

$$\begin{aligned} \Delta I_1 &= I_0(x, y) - I_{2\pi/3}(x, y) \\ &= mI_{\text{in}}(x, y) \left[\frac{3}{2} \cos(2\pi px + \varphi_0) + \frac{\sqrt{3}}{2} \sin(2\pi px + \varphi_0) \right], \\ \Delta I_2 &= I_{2\pi/3}(x, y) - I_{4\pi/3}(x, y) \\ &= -\sqrt{3}mI_{\text{in}}(x, y) \sin(2\pi px + \varphi_0), \\ \Delta I_3 &= I_{4\pi/3}(x, y) - I_0(x, y) \\ &= -mI_{\text{in}}(x, y) \left[\frac{3}{2} \cos(2\pi px + \varphi_0) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin(2\pi px + \varphi_0) \right]. \end{aligned} \quad (3)$$

此时, 样品的焦面信息 I_{in} 仍然受到正弦条纹光场的调制, Neil 等 [12] 提出的 RMS 算法正是对 (3) 式得到的 3 幅图像进行均方根计算, 即:

$$\begin{aligned} &\sqrt{\frac{\Delta_1^2(x, y) + \Delta_2^2(x, y) + \Delta_3^2(x, y)}{3}} \\ &= \frac{3\sqrt{2}}{2} mI_{\text{in}}(x, y), \end{aligned} \quad (4)$$

因此,

$$I_{\text{in}}(x, y) = \frac{\sqrt{2}}{3m} \sqrt{\Delta_1^2(x, y) + \Delta_2^2(x, y) + \Delta_3^2(x, y)}. \quad (5)$$

除了 $2\pi/3$ 相移, 相移量为 $\pi/2$ 的正弦条纹结构光也可实现光切片图像重建, 相比 $2\pi/3$ 相移量, 在利用数字微镜器件 (digital micro-mirror device,

DMD) 投影产生结构照明的 SIM 系统中, 相移量为 $\pi/2$ 的条纹通常可以实现更高的条纹频率, 进而获得更优的光切片效果^[15]. 此时, (2) 式可写作:

$$\begin{aligned} I_0(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{\pi/2}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi/2)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{\pi}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y). \end{aligned} \quad (6)$$

由 (6) 式可以看出, I_0 和 I_{π} 之和恰好可以消除含有条纹的调制项, 而两者的差可以消除离焦背景, 类似于 (3) 式, 可以构造得到

$$\begin{aligned} I_0(x, y) + I_{\pi}(x, y) - 2I_{\pi/2}(x, y) \\ = 2mI_{\text{in}}(x, y) \cdot \sin(2\pi px + \varphi_0), \\ I_0(x, y) - I_{\pi}(x, y) \\ = 2mI_{\text{in}}(x, y) \cdot \cos(2\pi px + \varphi_0). \end{aligned} \quad (7)$$

对 (7) 式进行 RMS 运算, 可以得到

$$I_{\text{in}}(x, y) = \frac{1}{2m} \sqrt{(I_0 + I_{\pi} - 2I_{\pi/2})^2 + (I_0 - I_{\pi})^2}. \quad (8)$$

2.2 基于希尔伯特变换的光切片算法

希尔伯特变换是信号分析处理领域的一种常用方法, 以一维信号为例, 希尔伯特变换实质上是信号 $x(t)$ 与 $1/(\pi t)$ 的卷积运算, 即:

$$\hat{x}(t) = x(t) \otimes \frac{1}{\pi t} = \frac{1}{\pi} \int \frac{x(\tau)}{t - \tau} d\tau, \quad (9)$$

其中, 符号 \wedge 表示希尔伯特变换算符. 以一维正弦信号 $x(t) = \sin t$ 为例, 对其取希尔伯特变换并进行傅里叶变换, 可得

$$\begin{aligned} \text{FFT}\{\hat{x}(t)\} &= -i \cdot \text{FFT}\{\sin(t)\} \cdot \text{FFT}(1/(\pi t)) \\ &= -i \cdot \text{FFT}\{\sin(t)\} \cdot \text{sgn}(\omega) \\ &= -\frac{\delta(\omega + 1/2\pi) + \delta(\omega - 1/2\pi)}{2}, \end{aligned} \quad (10)$$

其中, FFT 为快速傅里叶变换算符; ω 为频谱空间的坐标; $\text{sgn}(\omega)$ 为 signum 函数,

$$\text{sgn}(\omega) = \begin{cases} 1, & \omega > 0, \\ 0, & \omega = 0, \\ -1, & \omega < 0. \end{cases} \quad (11)$$

由此可得, 一维正弦信号 $x(t) = \sin t$ 的希尔伯特变换为

$$\begin{aligned} \hat{x}(t) &= i \cdot \text{FFT} \left\{ -\frac{\delta(\omega + 1/2\pi) + \delta(\omega - 1/2\pi)}{2} \right\} \\ &= -\cos t. \end{aligned} \quad (12)$$

显然, 正弦信号和其希尔伯特变换结果的平方和为 1, 恰好可以消除正弦条纹. 两幅相移差为 $\Delta\varphi$ 的正弦结构光照明图像可表示为

$$\begin{aligned} I_0(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0)] + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{\Delta\varphi}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + \Delta\varphi)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y). \end{aligned} \quad (13)$$

将两幅图像相减, 首先消除了离焦背景的影响, 并令 $y = y_0$, 则该位置的一维信号可以表示为

$$\begin{aligned} \Delta I(x, y_0) &= 2m \sin(\Delta\varphi/2) I_{\text{in}}(x, y_0) \\ &\quad \times \sin(2\pi px + \varphi_0 + \Delta\varphi/2). \end{aligned} \quad (14)$$

对 (7) 式进行希尔伯特变换, 然后取其频谱, 可得

$$\begin{aligned} &\text{FFT} \left\{ \Delta \hat{I}(x, y_0) \right\} \\ &= \frac{-C}{2} \left[\tilde{I}_{\text{in}}(k_x - p, y_0) e^{i\varphi_s} + \tilde{I}_{\text{in}}(k_x + p, y_0) e^{-i\varphi_s} \right] \\ &= -C \left[\tilde{I}_{\text{in}}(k_x, y_0) \otimes \frac{\delta(k_x - p) e^{i\varphi_s} + \delta(k_x + p) e^{-i\varphi_s}}{2} \right], \end{aligned} \quad (15)$$

其中 $C = 2m \sin(\Delta\varphi/2)$, $\varphi_s = \varphi_0 + \Delta\varphi/2$, 由 (15) 式可得

$$\Delta \hat{I}(x, y_0) = -C I_{\text{in}}(x, y_0) \cos(2\pi px + \varphi_s). \quad (16)$$

对比 (14) 式与 (16) 式可知, 经过希尔伯特变换之后, 正弦结构光照明图像产生了 $\pi/2$ 的相移, 二者的平方和可以去除焦平面上的正弦结构图样. 以上分析为 $y = y_0$ 处的一维信号分析, 在 y 方向上所有位置全部进行上述运算, 则可实现整幅二维图像的图像重构处理, 进而获得焦平面上去除正弦结构条纹的光切片图像, 即:

$$I_{\text{in}}(x, y) = \sqrt{\Delta I(x, y)^2 + \Delta \hat{I}(x, y)^2}. \quad (17)$$

基于希尔伯特变换的快速层析算法仅需两幅任意相移差的子图像即可完成图像的解码重构, 实验中以某一个成像平面为例, 其具体过程简述为: 先将在该平面获取的不同初相位结构光照明的子图像进行相减, 获得仅含焦面编码信息的新图像; 再将新图像沿着与编码条纹空间频率方向进行希尔伯特变换并与子图像差值取平方和, 即可获得有效解码后的层析图像. 以横条纹 (即 y 方向强度为正弦分布) 为例, (17) 式可写作:

$$I_Z = \sqrt{(I_0 - I_{\Delta\varphi})^2 + \{\text{HT}_x(I_0 - I_{\Delta\varphi})\}^2}, \quad (18)$$

其中, I_0 和 $I_{\Delta\varphi}$ 为采集到的两幅相移差为 $\Delta\varphi$ 的结构光照明图像, HT_x 表示在 x 方向进行希尔伯特变换, I_Z 为该焦平面上的去除条纹的光切片图像.

相对于传统的 RMS 解码算法, 基于希尔伯特变换的快速层析解码算法具有明显的优势^[19]: 首先, 快速层析解码算法需要两幅原始图像即可完成层析图像重构, 将图像采集量减小了 33%. 其次, 快速层析解码算法对相移误差不敏感, 微小的相移误差并不影响三维重构效果, 避免了传统 RMS 解码算法在子图像加载条纹相位差不匹配时带来的残余条纹问题.

2.3 基于希尔伯特变换的彩色光切片算法

基于 HSV-RMS 方法, 将采集到的 3 幅固定相移差的原始彩色图像转换至 HSV 空间, 并在相应的通道利用 RMS 算法进行光切片处理, 随后将处理完成的结果转换至 RGB 空间进行存储并显示. 这一方法能够复原样品表面的全彩色信息, 已经成功应用于昆虫结构色的研究中^[20,21]. 然而该方法需采集 3 幅固定相移差的原始图像, 并且在 HSV 空间的三通道要进行 3 次 RMS 运算, 另外还需要在 HSV 空间和 RGB 空间进行两次转换, 对于需要视场拼接的大尺寸样品而言, HSV-RMS 方法的图像采集数据量大, 图像处理算法更耗时. 为此本文提出 HT-COS 方法.

使用彩色相机采集得到 2 幅相移差为 π 的原

始彩色图像, 首先利用 (19) 式得到消除条纹的均匀照明的宽场图像 $I_{\text{wide}}(\text{RGB})$; 将原始图像转换为灰度图像, 并利用 (18) 式计算得到光切片灰度图像 $I_z(\text{gray})$, 而宽场图像 $I_{\text{wide}}(\text{RGB})$ 则携带有样品的全部色彩信息, 二者相乘的结果为: 宽场图像的色彩将赋予光切片图像, 进而快速地获得样品的彩色光切片图像, 算法流程图如图 1(a) 所示. 沿样品轴向进行扫描, 并对每一层的重构结果进行叠加, 将得到样品的三维彩色光切片图像.

$$I_{\text{wide}}(\text{RGB}) = (I_0 + I_\pi)/2. \quad (19)$$

2.4 相移误差对 HSV-RMS 算法以及 HT-COS 算法的影响对比

RMS 算法对原始图像的相移差有着严格要求, 相移的微小误差便会影响到三维重构的效果, 导致光切片图像中出现明显的残余条纹, 而残余条纹的出现会在很大程度上影响对样品真实结构的观察与判断, 以 $\pi/2$ 相移的 3 幅原始正弦条纹图像为例, 假设图像在采集过程中由于环境振动引入了相移误差 $\Delta\varphi$, 那么这 3 幅原始图像可以写作:

$$\begin{aligned} I_0(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_{\pi/2}(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi/2 + \Delta\varphi)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y), \\ I_\pi(x, y) &= I_{\text{in}}(x, y)[1 + m \cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi + \Delta\varphi)] \\ &\quad + I_{\text{out}}(x, y). \end{aligned} \quad (20)$$

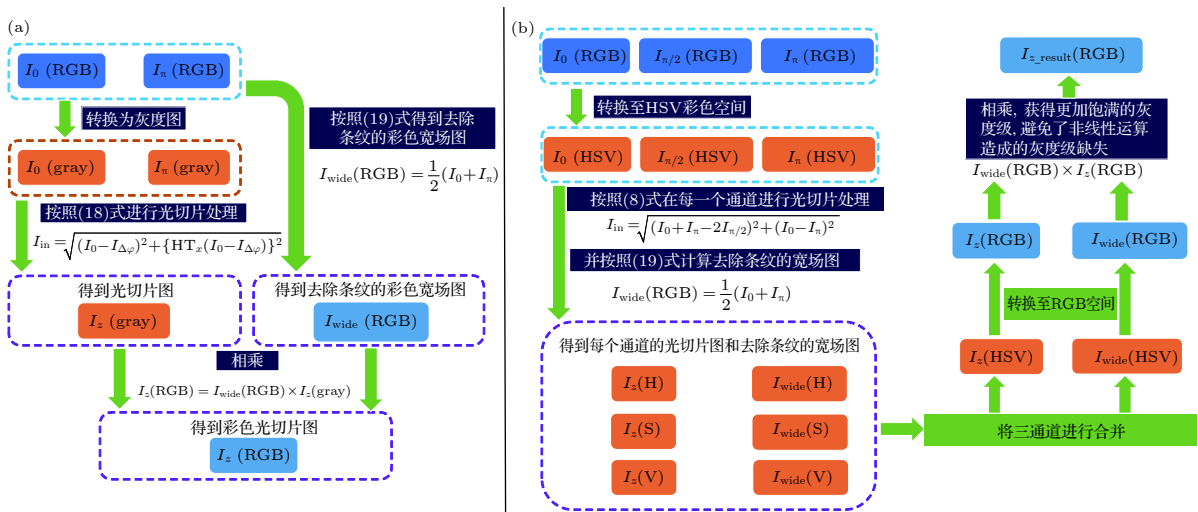


图 1 HT-COS 算法流程图和 HSV-RMS 算法流程图对比 (a) HT-COS 算法流程图; (b) HSV-RMS 算法流程图

Fig. 1. Flowchart diagram comparison between HT-COS algorithm and HSV-RMS algorithm: (a) HT-COS algorithm; (b) HSV-RMS algorithm.

将 (20) 式代入 (8) 式, 可以求得经 RMS 算法重构的图像为

$$I_{in}^{\Delta} \approx \sqrt{2}mI_{in}(x, y)\sqrt{\cos^2(2\pi px + \varphi_0) + \cos^2\Delta\varphi}. \quad (21)$$

由此可知, 当原始图像的相移差存在 $\Delta\varphi$ 的误差时, RMS 算法计算得到的光切片图像中将存在残余条纹. 由图 1(b) 可知, HSV-RMS 算法在得到光切片图像后, 还需利用 (19) 式计算得到的去除条纹的宽场图, 此时宽场图中也将出现少量的残余条纹:

$$I_{wide}^{\Delta}(\text{RGB}) \approx \frac{1}{2}[I_{in} + I_{out} + \cos(2\pi px + \varphi_0)(1 - \cos\Delta\varphi)]. \quad (22)$$

在 HSV-RMS 算法后续图像处理过程中, (21) 式和 (22) 式相乘, 会使二者的残余条纹被进一步放大, 进而导致最终的彩色光切片图像中出现严重的残余条纹:

$$I_{in}^{\Delta}I_{wide}^{\Delta} \approx \frac{\sqrt{2}}{2}mI_{in}\sqrt{\cos^2(2\pi px + \varphi_0) + \cos^2\Delta\varphi} \times [2(I_{in} + I_{out}) + mI_{in}\cos^2(2\pi px + \varphi_0)(1 - \cos\Delta\varphi)^2]. \quad (23)$$

在基于希尔伯特变换的光切片算法中, 当两幅相移差为 π 的结构光照明图像中存在相移误差 $\Delta\varphi$ 时, (14) 式可以写作:

$$\Delta I^{\Delta}(x, y_0) = C^{\Delta}I_{in}(x, y_0)\sin(2\pi px + \varphi_0 + \varphi_s^{\Delta}). \quad (24)$$

对其进行希尔伯特变换可得

$$\Delta \hat{I}^{\Delta}(x, y_0) = -C^{\Delta}I_{in}(x, y_0)\cos(2\pi px + \varphi_0 + \varphi_s^{\Delta}). \quad (25)$$

其中 $C^{\Delta} = 2m\sin[(\Delta\varphi + \pi)/2]$, $\varphi_s^{\Delta} = \varphi_0 + (\Delta\varphi + \pi)/2$, 将 (24) 式和 (25) 式代入 (17) 式可知, 光切片计算结果中并不会出现误差 $\Delta\varphi$ 的调制项, 也就不存在残余条纹.

HT-COS 算法中只有 (22) 式计算引入的微小的残余条纹, 在最终计算得到的彩色光切片图像中可以被近似忽略:

$$I_{in}I_{wide}^{\Delta} \approx \frac{1}{2}I_{in}[2I_{in} + 2I_{out} + \cos(2\pi px + \varphi_0)(1 - \cos\Delta\varphi)]. \quad (26)$$

因此, HT-COS 算法对微小的相移误差并不敏感, 不影响其三维光切片重建的效果.

为验证上述结论, 模拟了不同相移误差对三维光切片重建效果的影响, 以 $\pi/2$ 相移的 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法为例, 分别假设相移误差为

0.01π , 0.02π 和 0.05π , 数值模拟计算了 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法的图像重构效果, 如图 2 所示, 其中绿色虚线方框内为绿色实线方框区域内的放大图像. 由图 2(c)—(f) 可以看出, 在相移误差为 0.01π 时, HSV-RMS 算法光切片图像中无明显残余条纹, 当相移误差为 0.02π 时, HSV-RMS 算法复原的光切片图像出现了明显的残余条纹, 而当相移误差增大为 0.05π 时, 残余条纹非常严重. 如图 2(g)—(j) 所示, HT-COS 算法复原算法对相移误差并不敏感, 在相移误差为 0.01π 和 0.02π 时, 复原的光切片图像中并没有出现残余条纹, 当相移误差增加至 0.05π 时, 图像中出现了极少量的残余条纹. 因此本文提出的 HT-COS 算法具有更高的鲁棒性, 特别适用于存在机械振动等噪声干扰的实验环境.

2.5 噪声对 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法的影响对比

假设实验中采集的结构光照明图像中, 存在有随机分布的高斯噪声 $N(x, y)$, 3 幅 $\pi/2$ 相移的原始图像可以写作:

$$\begin{aligned} I_0(x, y) &= I_{in}(x, y)[1 + m\cos(2\pi px + \varphi_0)] \\ &\quad + I_{out}(x, y) + N_1(x, y), \\ I_{\pi/2}(x, y) &= I_{in}(x, y)[1 + m\cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi/2)] \\ &\quad + I_{out}(x, y) + N_2(x, y), \\ I_{\pi}(x, y) &= I_{in}(x, y)[1 + m\cos(2\pi px + \varphi_0 + \pi)] \\ &\quad + I_{out}(x, y) + N_3(x, y). \end{aligned} \quad (27)$$

当利用 RMS 算法进行光切片处理时, 根据 (7) 式, 对 (27) 式的三项进行循环相减操作, 可得

$$\begin{aligned} &I_0 + I_{\pi} - 2I_{\pi/2} + (N_1 + N_3 - 2N_2) \\ &\approx I_0 + I_{\pi} - 2I_{\pi/2} + 2N_C, \\ &I_0 - I_{\pi} + (N_1 - N_3) \approx I_0 - I_{\pi} + N_C, \end{aligned} \quad (28)$$

其中, N_C 表示均值噪声^[22], 并有

$$\begin{cases} N_i + N_j \approx 2N_C, \\ N_i - N_j \approx N_C, \end{cases} \quad i \neq j. \quad (29)$$

求取 (28) 式两项的平方和, 有

$$\begin{aligned} &(I_0 + I_{\pi} - 2I_{\pi/2} + 2N_C)^2 + (I_0 - I_{\pi} + N_C)^2 \\ &\approx [(I_0 + I_{\pi} - 2I_{\pi/2})^2 + (I_0 - I_{\pi})^2] + 5N_C^2 \\ &= 4m^2I_{in}^2 + 5N_C^2. \end{aligned} \quad (30)$$

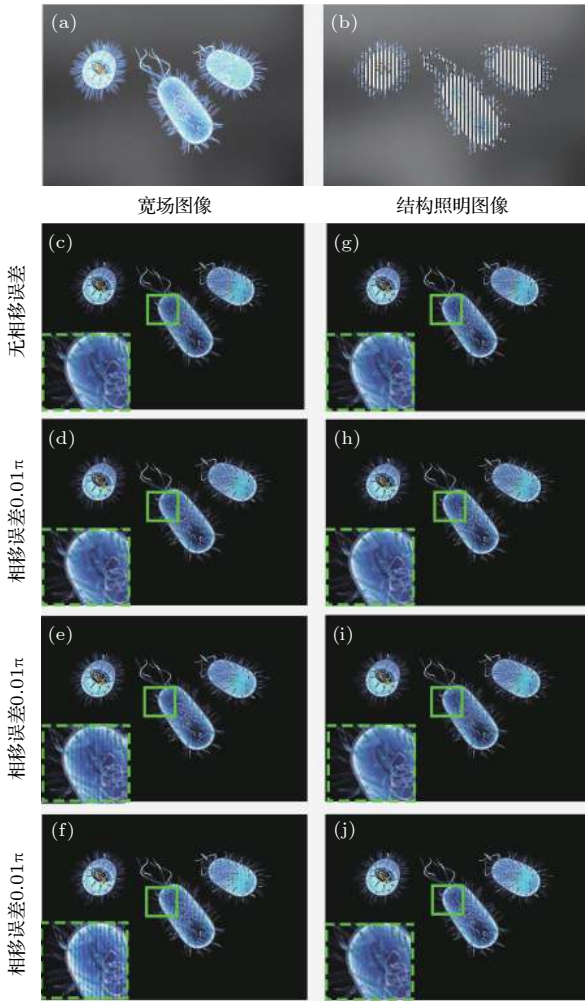


图 2 相移误差对三维光切片图像的影响 (a) 含有离焦背景的宽场图像; (b) 结构光照明图像; (c)—(f) 在不同的相移误差下, HSV-RMS 算法所复原的彩色光切片图像; (g)—(j) 不同相移误差下, HT-COS 算法所复原的彩色光切片图像

Fig. 2. Effect of phase-shift error on optical sectioning images: (a) Wide-field image with defocused background; (b) structured illumination image; (c)–(f) three-dimensional (3D) color optical sectioning images processed by HSV-RMS algorithm under different phase-shift errors; (g)–(j) 3D color optical sectioning images processed by HT-COS algorithm under different phase-shift errors.

利用 (8) 式计算可得在噪声环境下的光切片为

$$I_{\text{in}}(\text{noise}) = \sqrt{I_{\text{in}}^2 + \frac{5N_{\text{C}}^2}{4m^2}}. \quad (31)$$

由此可知, RMS 算法计算得到光切片图像的信噪比与结构照明光场的调制度有关, 调制度越高, 信噪比越高.

当利用希尔伯特变换的方法进行光切片处理时, 相移差为 π 的两幅图像相减可得

$$\begin{aligned} \Delta I(\text{noise}) &= I_0 - I_{\pi} \\ &\approx 2m \cos(2\pi px + \varphi_0) + N_{\text{C}}. \end{aligned} \quad (32)$$

对 (32) 式进行希尔伯特变换可得

$$\Delta \hat{I}(\text{noise}) = -2m \sin(2\pi px + \varphi_0) + N_{\text{C}}. \quad (33)$$

将 (32) 式和 (33) 式代入 (17) 式, 可得噪声环境下的光切片图像为

$$I_{\text{in}}(\text{noise}) = \sqrt{I_{\text{in}}^2 + \frac{N_{\text{C}}^2}{2m^2}}. \quad (34)$$

对比 (31) 式和 (34) 式, 希尔伯特变换方法在噪声环境下求得的光切片图像同样与结构照明条纹的对比度有关, 调制度越高信噪比越高. 在同样的噪声参数下, RMS 算法得到的光切片图像中的噪声项大于希尔伯特变换的方法, 因此, 希尔伯特变换算法相比于 RMS 算法, 具有更强的抗噪能力.

在图 3 中, 模拟了均值为 0, 方差分别为 0.01, 0.02 和 0.03 时的高斯噪声对 HSV-RMS 算法以及 HT-COS 算法在彩色光切片处理时的影响, 所用正弦结构照明条纹的调制度 $m=0.8$. 高斯噪声方差为 0.01 时, 结构光照明图像, HSV-RMS 算法得到的光切片图像, HT-COS 算法得到的光切片图像的峰值信噪比 (peak signal-to-noise ratio, PSNR) 分别为 25.74, 22.93 以及 23.69; 当方差为 0.03 时, PSNR 分别为 23.62, 18.81 以及 21.91; 当方差为 0.05 时, PSNR 分别为 22.21, 17.35 和 20.51.

2.6 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法色彩复原保真度对比

在无噪声和无相移误差的条件下, 理论模拟了 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法计算所得彩色光切片图像的色彩复原保真度, 如图 4 所示. 图 4(a) 为原始的宽场图像, 为了更加直观地说明问题, 专门设计了一个含有 4 个色块的图像, 其中 4 个色块的 RGB 值分别为 (77, 187, 95), (230, 34, 207), (198, 209, 55) 和 (106, 56, 56). 图 4(b) 和图 4(c) 分别为 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法计算得到的彩色光切片图像, 图 4(d)—(f) 分别为 3 幅图像中各色块的 RGB 值. 与原始图像比, HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法计算得到的彩色光切片图像的色彩保真度均达到 99.4% 以上, 证明 HT-COS 算法和 HSV-RMS 算法都可以准确复原样品的三维全彩色光切片图像.

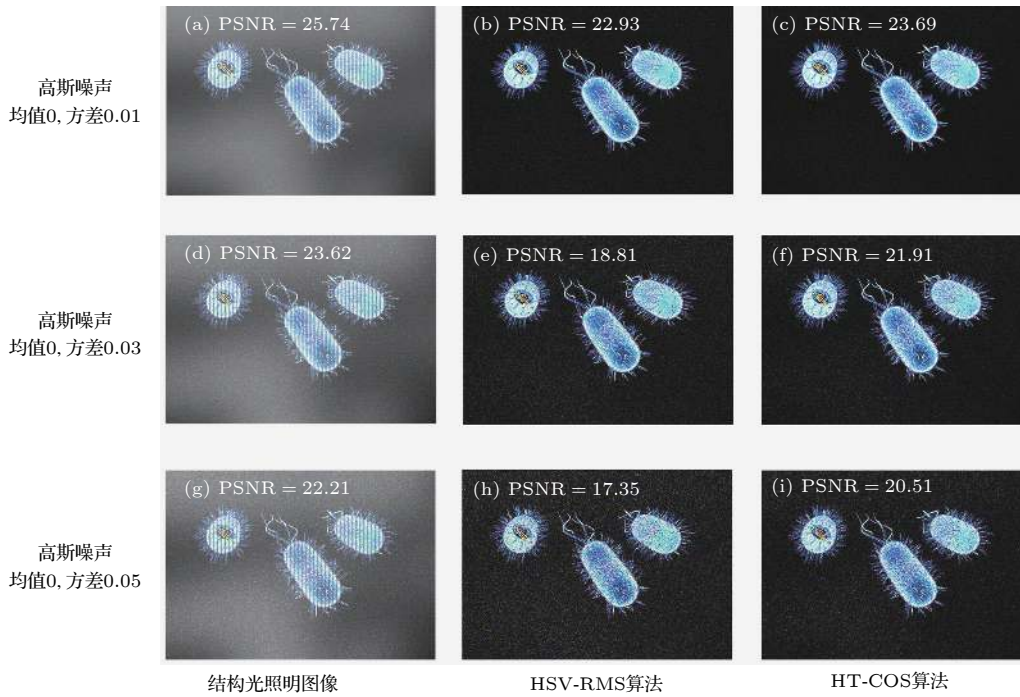


图 3 高斯噪声对光切片重构图像的影响 (a)—(c) 高斯噪声方差为 0.01 时的结构光照明图像、HSV-RMS 算法得到的光切片图像及 HT-COS 算法得到的光切片图像; (d)—(f) 高斯噪声方差为 0.03 时的结果; (g)—(i) 高斯噪声方差为 0.05 时的结果

Fig. 3. Influence of Gaussian noise on the reconstructed optical sectioning images. Structured illumination image, optical sectioning images calculated by the HSV-RMS algorithm and HT-COS algorithm, respectively, under the conditions of the Gaussian noise with variances of (a)–(c) 0.01, (d)–(f) 0.03, and (g)–(i) 0.05.

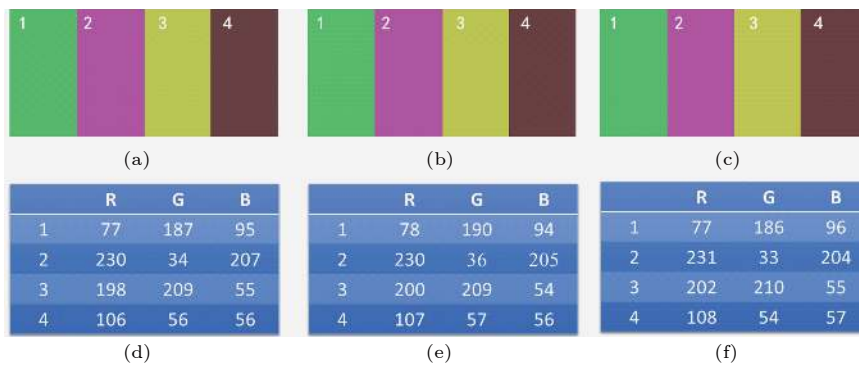


图 4 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法的色彩复原保真度比较 (a)—(c) 分别为原始图像、HSV-RMS 算法处理后的光切片图像及 HT-COS 算法处理后的光切片图像; (d)—(f) 3 幅图像各色块内的 RGB 值

Fig. 4. Comparison of color restoration fidelity between HSV-RMS algorithm and HT-COS algorithm: (a)–(c) Raw image, optical sectioning image calculated by HSV-RMS algorithm and optical sectioning image calculated by HT-COS algorithm, respectively; (d)–(f) RGB values for the four different regions of each image.

3 实验结果

3.1 实验系统

本文所有实验是均在自行设计的基于 DMD 和发光二极管 (light emission diode, LED) 照明的 SIM 系统上进行的, 如图 5 所示. 高亮度白光 LED 或者特定波长 LED 发射的光束经过特殊设

计的全内反射 (total internal reflection, TIR) 棱镜后照射 DMD 芯片, 经过 DMD 调制后的正弦条纹结构光场再经过 TIR 棱镜之后经由投影系统和物镜透射至样品表面, 样品的反射光或激发荧光经过二向色滤光片或 50/50 滤光片后被彩色相机收集. 样品被固定在三维电动位移台上, 用来实现轴向扫描和 X-Y 方向的视场拼接. 硬件同步控制、图像采集和处理软件均基于 C++ 自行设计开发.

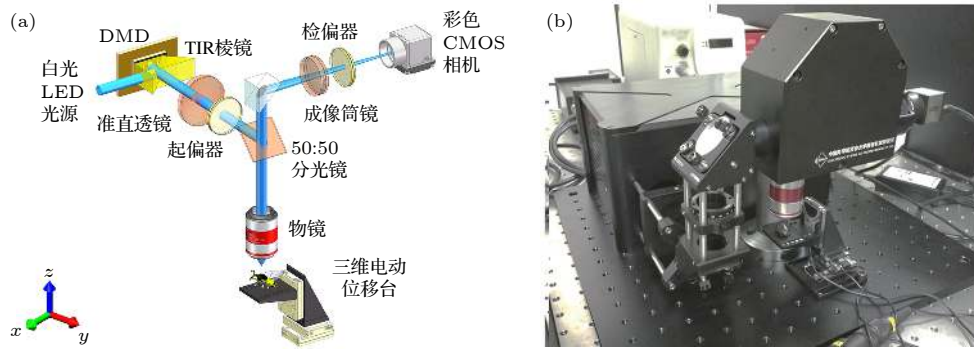


图 5 结构光照明彩色光切片实验光路及系统图 (a) 系统光路原理图; (b) 系统实物图

Fig. 5. Schematic diagram of structured illumination color optical sectioning system: (a) Light-path diagram; (b) apparatus diagram.

3.2 荧光样品实验

我们选取具有宽光谱自发荧光 (405 nm 激发波长) 的花粉样品进行彩色三维成像实验, 使用波长为 405 nm 的紫光 LED 光源和长通二向色镜 (LP425 nm). 在样品的每层以 20 ms 曝光时间分别采集相移差为 $\pi/2$ 的 3 幅原始结构光照明图像, 利用 HSV-RMS 算法进行处理. 随后从采集

的原始图像中选取相移差为 π 的两幅图像, 再利用 HT-COS 算法进行处理. 实验的结果如图 6 所示. 图 6(a) 为 HSV-RMS 算法处理后的三维彩色光切片图像, 图 6(b) 为 HT-COS 算法处理后的结果, 显然两种算法都可以得到样品的彩色三维荧光图像.

但由于 HSV-RMS 算法对 3 幅原始图像的相移差有严格的要求, 实验中的微小振动就会造成相

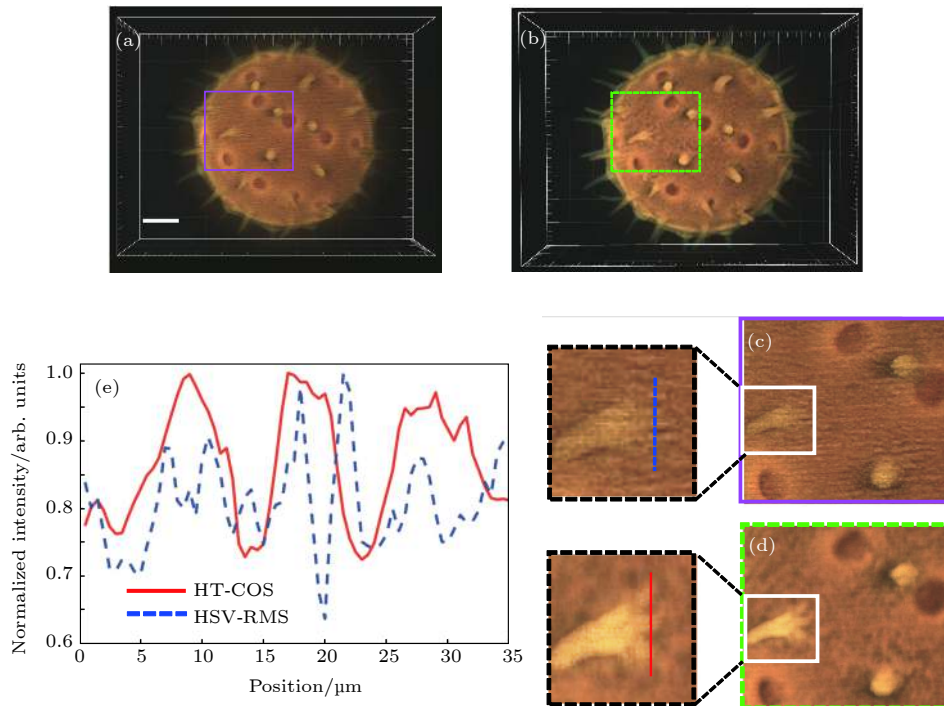


图 6 HSV-RMS 算法和 HT-COS 算法重构的花粉彩色三维光切片图像效果对比 (a) HSV-RMS 算法重构的三维图像; (b) HT-COS 算法重构的三维图像; (c) 图 (a) 紫色方框区域的放大图像; (d) 图 (b) 绿色方框区域内的放大图像; (e) 图 (c) 中蓝色虚线和图 (d) 中红色实线上的强度分布; 标尺: 30 μm

Fig. 6. Comparison of reconstructed result of pollen grain between HSV-RMS algorithm and HT-COS algorithm: (a) 3D reconstructed color image from HSV-RMS algorithm; (b) 3D reconstructed color image from HT-COS algorithm; (c) the enlarged image in the purple rectangular box in panel (a); (d) the enlarged image in the green rectangular box in (b); (e) normalized intensity distribution of the line-scan in panel (c) and (d), i.e. the “root-shaped” structure. Scale bar: 30 μm .

移差的变化,进而导致重构的光切片图像中产生残余条纹,对三维重建产生影响,为了实验验证这一结论,在实验中加入微小的相移扰动.图6(c)和图6(d)对比了HSV-RMS算法和HT-COS算法重构结果中的残余条纹.图6(c)为图6(a)中紫色方框内的放大图像,可以看出,图6(c)中存在比较明显的残余条纹;图6(d)为图6(b)中绿色方框内的放大图像,其中几乎没有残余条纹.图6(e)中曲线的强度分布也验证了HSV-RMS算法存在明显的残余条纹,花粉尖刺根部的“根状”结构被淹没在残余条纹之中,而经由HT-COS重构的光切片图像则没有残余条纹,“根状”结构清晰可见,这一实验结果进一步证实了HT-COS算法鲁棒性更高的结论.

3.3 反射式样品实验

为了进一步证明HT-COS算法在图像采集和重构的速度优势,对一种中华虎甲背部某区域进行了高分辨率三维成像.首先将光路中的二向色镜替

换为50:50分束镜,将405 nm波长LED替换为高亮度白光LED,并分别采用HSV-RMS算法和HT-COS算法对原始图像进行处理,结果如图7所示.该中华虎甲的三维尺寸大约为19.5 mm × 8.3 mm × 6.6 mm,对其整体进行了三维成像(使用4 ×, $NA = 0.2$ 物镜拍摄,空间分辨率1.5 μm),共采集84个视场进行拼接,如图7(a)所示.根据统计,使用4 ×, $NA = 0.2$ 物镜对样品进行三维成像时,共拼接84个视场(14行 × 6列,单视场尺寸2.5 mm × 2.5 mm),HSV-RMS算法所需原始图像的总图像采集时间约为1767 s,即84视场 × ((10 ms曝光时间 + 0.031 ms DMD刷新时间) × 3幅相移图像(相移差 $\pi/2$) × 350层 + 30 ms位移台稳定时间 × 349次轴向移动) + 83次横向移动 × 30 ms位移台稳定时间,而HT-COS算法只需要两步相移(相移差 π),因此图像采集时间为1472 s,提升约16.7%.两种方法的图像处理时间分别为13608和9744 s,可知HT-COS算法是具有更快的图像处理速度,提升约28.4%(Windows 7 SP1,

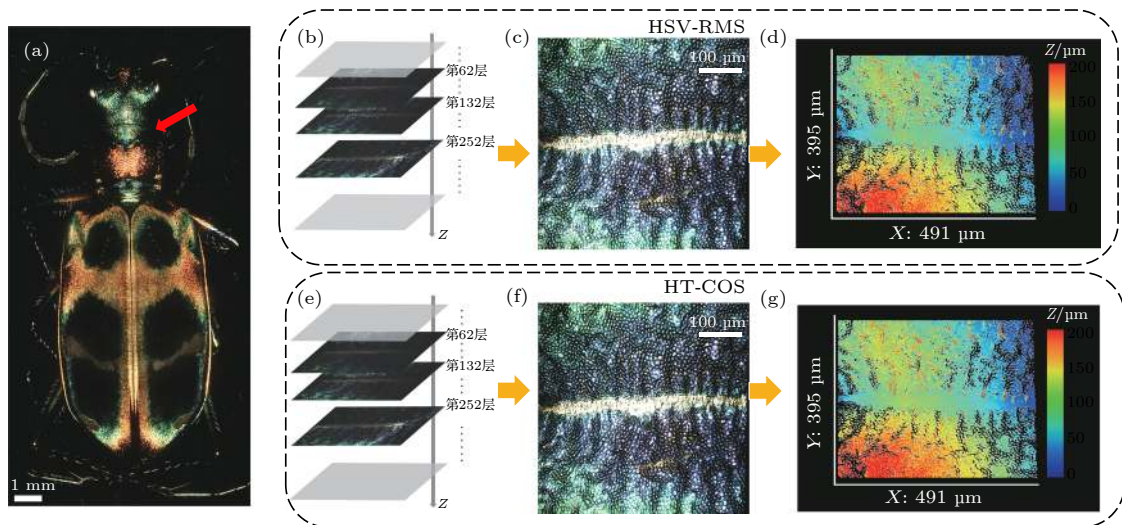


图7 一种中华虎甲背部的三维彩色SIM成像结果 (a) 该中华虎甲样品完整三维图像的二维最大值投影,使用4 ×, $NA = 0.2$ 物镜拍摄,共拼接84个视场,单视场轴向扫描350层;(b)样品轴向进行三维叠加重构的示意图,每一层都是经过HSV-RMS算法处理后的光切片图;(c)图(a)中红色箭头所指区域局部放大的三维光切片最大值投影图像,使用HSV-RMS算法进行图像处理,20 ×, $NA = 0.45$ 物镜拍摄;(d)图(c)的三维形貌分布;(e)样品轴向进行三维叠加重构的示意图,每一层都是经过HT-COS算法处理后的光切片图;(f)图(a)中红色箭头所指区域局部放大的三维光切片最大值投影图像,使用HT-COS算法进行图像处理,20 ×, $NA = 0.45$ 物镜拍摄;(g)图(f)的三维形貌分布

Fig. 7. 3D color imaging result of a Chinese tiger beetle: (a) Maximum intensity projection image of the tiger beetle under 4 ×, $NA = 0.2$ objective lens, the 3D volume is rendered from 84 data sets stitching and sliced 350 layers; (b) schematic diagram of 3D reconstruction in axial direction after imaging processing with HSV-RMS algorithm; (c) maximum intensity projection images of the area pointed by the red arrow in panel (a) processed with HSV-RMS algorithm. The images are captured under 20 ×, $NA = 0.45$ objective lens; (d) 3D height map of panel (c); (e) schematic diagram of 3D reconstruction in axial direction after imaging processing with HT-COS algorithm; (f) maximum intensity projection images of the area pointed by the red arrow in (a) processed with HT-COS algorithm. The images are captured under 20 ×, $NA = 0.45$ objective lens; (g) the 3D height map of panel (f).

表 1 两种 SIM 彩色光切片算法的性能比较

Table 1. Performance comparison of two algorithms for color optical sectioning SIM.

	视场个数	图像采集总时间/s	图像处理总时间/s	图像数据容量/GB	三维数据总像素数/pixels
HSV-RMS算法	84	1767	13608	1000	10^{10}
HT-COS算法	84	1472	9744	670	10^{10}

16GB RAM, Intel core i5-3470@3.2 GHz, Matlab R2017a). 表 1 对比了两种方法的图像采集时间和图像处理时间, HT-COS 算法 84 个视场的图像采集时间和图像处理时间分别减少了 295 和 3864 s, 这一提升对于需要视场拼接的高分辨率三维成像而言是十分可观的. 因此 HT-COS 算法更加适用于大尺寸样品的高分辨率三维成像, 可以大幅减小实验所需时间.

在样品某区域 (图 7(a) 中红色箭头指向区域) 利用 $20\times$, $NA = 0.45$ 物镜进行局部放大并进行了两种方法的比较实验. 对比图 7(c) 和图 7(f) 可以看出, 在没有相移误差的条件下, HT-COS 算法在图像对比度、色彩还原度以及图像分辨率方面与 HSV-RMS 算法相比并无明显差异.

由于 SIM 三维光切片成像结果消除了离焦背景的干扰, 因此在恢复物体表面三维形貌高度中具有十分显著的优势, 利用“shape from focus”算法, 可以在横向实现高分辨率的形貌解析度^[21,23,24]. 对于三维图像中的某一点 (x, y, z) , 其在每一层光切片图像中都对应同一个像素坐标 (x, y) , 根据光切片层数的不同, 该像素坐标 (x, y) 的光强也不同, 只有当该点处于焦面位置时才有光强的最大值. 通过寻找亮度的最大值, 即可获得该点的高度信息, 即:

$$h(x, y) = \arg_z \max[I(x, y, z)], \quad (35)$$

其中, $h(x, y)$ 代表 (x, y) 坐标处的高度; $I(x, y, z)$ 代表 (x, y, z) 处的光强; $\arg_z \max$ 代表取光强最大时的轴向位置, 即高度信息. 利用 (35) 式分别计算图 7(c) 和图 7(f) 的三维形貌分布并进行定量对比, 图 7(d) 和图 7(g) 是对应的三维形貌分布图, 图中不同的颜色代表不同的高度. 两种算法计算得到的形貌分布完全一致, 但 HT-COS 算法具有更快的图像处理速度, 因此更适合大尺寸物体的三维成像.

4 结 论

本文提出了一种基于希尔伯特变换的结构光照明快速彩色三维显微成像方法 (HT-COS), 与已

有的 HSV-RMS 算法相比, HT-COS 算法图像采集量减少了 1/3, 图像处理时间节约了约 28%. 实验结果表明, 该方法在图像对比度、色彩还原度及形貌高度恢复等方面与 HSV-RMS 算法并无明显差异, 该方法对大尺寸样品的高分辨率三维彩色成像具有重要的意义, 将进一步扩展 SIM 的应用范围.

感谢中国科学院动物研究所白明研究员提供的昆虫样品.

参考文献

- [1] Liu F, Dong B, Liu X, Zheng Y, Zi J 2009 *Opt. Express* **17** 16183
- [2] Shevtsova E, Hansson C, Janzen D H, Kjærandsen J 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** 668
- [3] Kinoshita S, Yoshioka S 2005 *Chem. Phys. Chem.* **6** 1442
- [4] Conchello J A, Lichtman J W 2005 *Nat. Methods* **2** 920
- [5] Helmchen F, Denk W 2005 *Nat. Methods* **2** 932
- [6] Michels J 2007 *J. Microscopy* **227** 1
- [7] Mahou P, Vermot J, Beaurepaire E, Supatto W 2014 *Nat. Methods* **11** 600
- [8] Dunn K W, Sandoval R M, Kelly K J, et al. 2002 *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **28** C905
- [9] Gustafsson M G 2000 *J. Microscopy* **198** 82
- [10] Shao L, Kner P, Rego E H, Gustafsson M G 2011 *Nat. Methods* **8** 1044
- [11] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, Winoto L, Gustafsson M G 2009 *Nat. Methods* **6** 339
- [12] Neil M A, Juškaitis R, Wilson T 1997 *Opt. Lett.* **22** 1905
- [13] Thomas B, Momany M, Kner P 2013 *J. Opt.* **15** 094004
- [14] Mertz J 2011 *Nat. Methods* **8** 811
- [15] Dan D, Lei M, Yao B, et al. 2013 *Sci. Rep.* **3** 1116
- [16] Karadaglić D, Wilson T 2008 *Micron* **39** 808
- [17] Patorski K, Trusiak M, Tkaczyk T 2014 *Opt. Express* **22** 9517
- [18] Dan D, Yao B, Lei M 2014 *Chin. Sci. Bull.* **59** 1291
- [19] Zhou X, Lei M, Dan D, Yao B, Qian J, Yan S, Yang Y, Min J, Peng T, Ye T 2015 *PLoS One* **10**
- [20] Qian J, Lei M, Dan D, Yao B, Zhou X, Yang Y, Yan S, Min J, Yu X 2015 *Sci. Rep.* **5** 14513
- [21] Qian J, Dang S, Wang Z, Zhou X, Dan D, Yao B, Tong Y, Yang H, Lu Y, Chen Y, Yang X, Bai M, Lei M 2019 *Opt. Express* **27** 4845
- [22] Zhou X 2018 *Ph. D. Dissertation* (Xi'an: Xi'an Jiaotong University) (in Chinese) [周兴 2018 博士学位论文 (西安: 西安交通大学)]
- [23] Nayar S K, Nakagawa Y 1990 *Proceedings, IEEE International Conference on Robotics and Automation* Cincinnati, USA, May 13–18, 1990 p218
- [24] Nayar S K, Nakagawa Y 1994 *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **16** 824

Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform*

Qian Jia¹⁾²⁾ Dang Shi-Pei¹⁾²⁾ Zhou Xing¹⁾ Dan Dan¹⁾ Wang Zhao-Jun³⁾
Zhao Tian-Yu¹⁾²⁾ Liang Yan-Sheng³⁾ Yao Bao-Li¹⁾²⁾† Lei Ming²⁾³⁾‡

1) (*State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China*)

2) (*School of Optoelectronics, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

3) (*School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China*)

(Received 9 March 2020; revised manuscript received 2 April 2020)

Abstract

As a wide-field microscopy, structured illumination microscopy (SIM) enables super-resolution and three-dimensional (3D) imaging. It has recently received lots of attention due to the advantages of high spatial resolution, short image recording time, and less photobleaching and phototoxicity. The SIM has found numerous important applications in time-lapse imaging of living tissues and cellular structures in the field of biomedical science. Color information is an important physical quantity describing the characteristics of living creatures and reflects the differences in its microstructure and optical property to some extent. Although HSV (hue, saturation, value) color space based structured illumination full-color 3D optical sectioning technique can recover the full color information on the surface of the samples without color distortion. However, for each optical sectioning, three raw images with fixed phase shift are required to calculate the sectioning images by the root mean square (RMS) algorithm. This will dramatically increase the data acquisition time and data storage space, especially for a large-scaled sample that needs image stitching strategy. The image processing progress operated in HSV color space need to run the RMS algorithm three times in each channel of HSV space for every section, and transform the images between RGB (red-green-blue) space and HSV space twice. This will absolutely extend the data processing time and put forward higher requirements for computer hardware and software for data storage and processing. To this end, in this paper, a fast 3D color optical sectioning SIM algorithm based on Hilbert-transform is proposed. The Hilbert-transform has proved to be a powerful tool in digital signal and image processing and has successfully applied to the SIM. Here, only two raw images with structured illumination are needed to reconstruct a full-color optical sectioned image for each slice. This fast 3D color sectioning method has the advantage of insensitivity to phase-shift error and has better adaptability to noise, high quality color sectioning images can be obtained under the phase-shift error or noise disturbed environment. The image acquisition data are reduced by 1/3 and the color optical sectioning reconstruction time is saved by about 28%, this new method effectively improves the efficiency and speed for 3D color imaging and will bring a wider application range for SIM.

Keywords: three-dimensional imaging, structured illumination, color, microscopy

PACS: 87.64.M-, 42.66.Ne, 87.85.Pq, 42.79.-e

DOI: 10.7498/aps.69.20200352

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 91750106, 61905189, 81427802) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2017YFC01101000).

† Corresponding author. E-mail: yaobl@opt.ac.cn

‡ Corresponding author. E-mail: ming.lei@mail.xjtu.edu.cn