

文章编号: 1001-3806(2007)05-0558-03

激光扫描共聚焦显微镜图像的计算机处理

汤 敏^{1,2}, 王惠南^{1*}

(1. 南京航空航天大学 自动化学院, 南京 210016 2. 南通大学 电气工程学院, 南通 226007)

摘要: 为了研究激光扫描共聚焦显微镜图像的计算机处理, 首先对图像进行预处理, 包括光线吸收和散射的补偿以及基于最大后验盲解卷积, 以提高图像质量。然后采用光线投射算法重建三维结构, 实现三维图像平移、旋转、缩放、光线设置等操作。实验结果表明, 该方法能够应用于普通配置计算机, 可以处理各大品牌激光扫描共聚焦显微镜拍摄的图像序列, 具有较快的处理速度和良好的人机交互等优点。

关键词: 图像处理; 科学计算可视化; 虚拟现实; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号: TP391 **文献标识码:** A

Computer processing and visualization of confocal microscopy images

TANG Min^{1,2}, WANG Hui-nan¹

(1. College of Automation Engineering Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing 210016, China 2. College of Electrical Engineering Nantong University, Nantong 226007, China)

Abstract The methodology was proposed for image processing and interactive visualization of confocal microscopy images. Firstly, an intensity compensation algorithm was applied to reduce noises resulted from light absorption and scattering by objects and particles in the volume through which light passes. Secondly, a deconvolution algorithm based on maximum a posteriori was applied to improve the image stacks quality. At last, the ray-casting algorithm was used to reconstruct the fine details in the volume. Furthermore, virtual reality technique was integrated with volume rendering in order to provide users an intuitive interface to view the cells and its structures through translation, rotation and zoom operations. The speed and versatility of the program allows for convenient, fast, interactive examination of unknown cell structures even on common PC. The program can be applied for different types of confocal microscopy data sets with good results.

Key words image processing; visualization; scientific computing; virtual reality; laser scanning confocal microscopy

引 言

激光扫描共聚焦显微镜是 20 世纪 80 年代发展起来的多功能生物医学分析仪器, 是在传统荧光显微镜基础上, 集激光扫描、荧光探针标记、计算机图像处理等技术于一身的新型显微镜系统。目前, 国外不少学者正在研究激光扫描共聚焦显微镜应用及其图像处理, 有关这方面的研究在主流期刊和国际会议上时有报道^[1~7]。但是, 由于激光扫描共聚焦显微镜购买及维护费用十分昂贵, 因此, 在国内并不普及, 涉及这方面图像处理的文献也极少。本文中研究了激光扫描共聚焦显微镜图像的计算机处理。首先对图像预处理, 改善图像质量, 包括对激光吸收和散射的补偿以及基于最大后验的图像盲解卷积。然后采用光线投射算法重建三维图像, 并且实现三维物体交互可视化和全方位多角度观测。

位多角度观测。

1 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理

工作原理参见图 1^[1,2]。由激光源发射的激光,

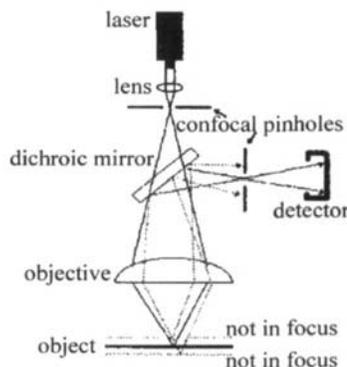


Fig 1 Principle of laser scanning confocal microscopy

经过照明针孔形成点光源, 通过激发滤片按照波长分离后的激光以不同的角度入射至二色分光镜, 反射后的激光经物镜聚焦于样品的焦平面, 焦平面上受到激发的点发射的荧光再次由物镜会聚并经二色分光镜选

作者简介: 汤 敏 (1977-), 女, 助教, 博士研究生, 主要研究三维医学图像可视化及成像。

* 通讯联系人。E-mail: wanghn_nuaa@sina.com

收稿日期: 2006-08-16 收到修改稿日期: 2006-11-06

通,然后穿过探测针孔到达光电探测器,获得与荧光强度成正比关系的电信号。虽然不处于焦平面上的样品也会受到激发产生荧光,但是由于探测针孔的空间定位作用,这些荧光无法到达光电探测器,也无法形成电信号。当载物台沿与样品断层垂直的方向微距移动时,系统就会连续获得不同层面的共焦显微图像,通过图像重建获得样品真实的三维结构。

2 算法关键技术

2.1 激光吸收和散射的补偿

由于生物体对光是很强的散射体,因此,生物体内光的衰减是吸收和散射共同作用的结果。假设单色平行光入射强度为 I_0 ,从起点 r_0 沿某一方向传播至终点,则根据 Lambert-Beer 法则,光强度的变化公式可以写作: $I(\lambda, r) = I_0(\lambda, r_0) \exp(-\alpha|r_0 - r|)$ (1) 式中, $|r_0 - r|$ 表示光线传播路径长度, α 表示单位长度上光线吸收和散射的能力系数。 α 是一个极其复杂的因素,其值由生物样品本身性质和封片剂、抗衰减剂、盖玻片等诸多因素决定。因为激光扫描共聚焦显微镜针孔孔径为毫米量级,有效观测距离为微米量级,故在实验中根据生物样品本身的性质将 α 简化为常数。

激光聚焦于焦平面之前,必然经过焦平面以上若干个生物体组织平面,这将导致部分激光被生物体组织吸收和散射,从而表现为整个图像序列中最后几幅图像亮度减弱,对比度和信噪比都较低。由于数字图像中像素点的灰度值也是图像光度学指标之一,因此,将激光到达焦平面以前经过的若干个生物组织平面的图像灰度分别乘以系数 α 并叠加起来补偿图像亮度的衰减,达到改善图像质量的目的。

2.2 基于最大后验的图像盲解卷积

由于激光扫描共聚焦显微镜获取单帧图像约为 1_s 而许多生理学过程发生速度更快,因此,只能通过增大针孔孔径来加快图像采集过程,然后使用解卷积方法改善图像质量。最大后验方法是一种基于统计学的图像复原方法,是在 Bayes 公式的基础上采用 Expectation Maximization 算法实现的。EM 算法的核心思想是根据已有数据来递归估计似然函数^[8]。定义变量 z 为完整数据, g 为图像模糊部分,则任务是估计最优的图像细节部分。首先,用假设数据填充图像细节部分,使之与模糊部分一起构成完整数据;然后,对完整数据采用最大似然法估计图像细节部分;重复上述过程,直至图像细节部分的迭代结果达到误差范围内。上述计算步骤用数学公式表达如下:

$$\begin{cases} E \text{ 步: } L(f) = E[\ln p(z|g)] \\ M \text{ 步: } \hat{f}^{(k+1)} = \arg \max [L(f) + \ln p(f)] \end{cases} \quad (2)$$

实验中采用维纳滤波和模糊图像来充当完整数据。定义 F 是希望得到的图像细节部分, G 是已知的图像模糊部分, H 是系统的点展函数, N 是图像噪声。计算流程归纳如下^[9]:

- (1) 输入初始数据 $F^0(\xi, \xi) = G(\xi, \xi)$, $H^{(0)}(\xi, \xi)$ 和 $N(\xi, \xi)$;
- (2) 求出功率谱 $\phi_F^{(0)} = \phi_G = \sum_{\xi_x} \sum_{\xi_y} |G(\xi, \xi)|^2$ 及 $\phi_N = \sum_{\xi_x} \sum_{\xi_y} |N(\xi, \xi)|^2$;
- (3) 计算:
$$F^{(k+1)}(\xi, \xi) = \frac{H^{(k)}(\xi, \xi)G(\xi, \xi)}{|H^{(k)}(\xi, \xi)|^2 + \phi_N(\xi, \xi)/\phi_F^{(k)}(\xi, \xi)} \quad (3)$$
- (4) 按下式迭代:
$$\begin{cases} \phi_F^{(k+1)}(\xi, \xi) = \phi_F^{(k)}(\xi, \xi) + \frac{1}{N^2} |F^{(k)}(\xi, \xi)|^2 \\ H^{(k+1)} = \frac{G(\xi, \xi)F^{(k+1)}(\xi, \xi)}{N^2 \phi_F^{(k+1)}(\xi, \xi)} \\ k = k + 1 \end{cases} \quad (4)$$

(5) 如果 $k \neq 0$ 则跳转步骤 (3); 否则对 $F^{(k+1)}(\xi, \xi)$ 进行反傅里叶变换,并输出结果。

2.3 光线投射算法

光线投射算法(参见图 2^[10])是一种典型的基于图像空间顺序的体绘制算法。该算法对每个体素分配

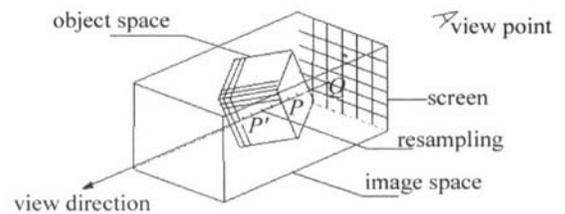


Fig 2 Principle of ray-casting algorithm

颜色值和不透明度来合成图像,有利于保留图像细节,绘制高品质图像,特别适合绘制区域特征模糊、体素特征相关性高的三维图像。该算法的主要计算步骤如下: (1) 将具有颜色值、不透明度的三维数据场由物体空间坐标转换为相应的图像空间坐标; (2) 重采样,即从屏幕上每个像素沿观察方向投射光线穿过三维数据场,在每一光线上采样,通过插值运算求出采样点的颜色值和不透明度; (3) 计算该射线上各个采样点的颜色值和不透明度,按照前后顺序合成该像素点的最终颜色值; (4) 将屏幕上各个像素点的颜色值逐一计算,得到并显示最终图像。

3 实验结果

图 3 是对 Leica 显微镜拍摄的一组心肌细胞图像的重建结果。图中各个微细结构都能清晰显示,并对

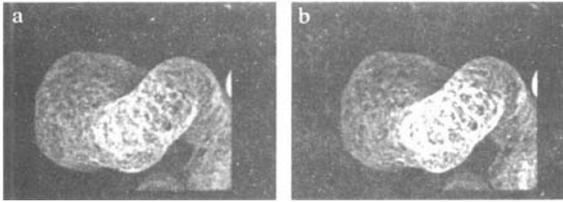


Fig 3 Reconstruction image and pseudocolor image of heart cell

图 3 是对 Zeiss 显微镜拍

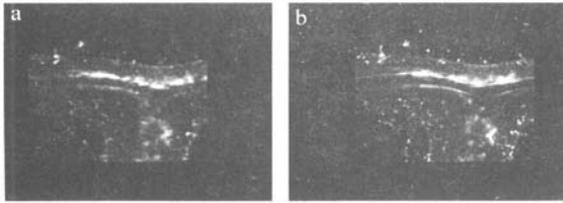


Fig 4 Reconstruction image of Zeiss confocal stack

摄的一组图像的重建结果, 区别在于图 4a 是直接重建的结果, 图 4b 是经过激光吸收和散射补偿以及基于最大后验的图像盲解卷积之后的重建结果。通过对比, 可以发现预处理之后重建的图像更为清晰, 图像对比度和微细结构都能得到较好体现。图 5 是对 Bio-Rad

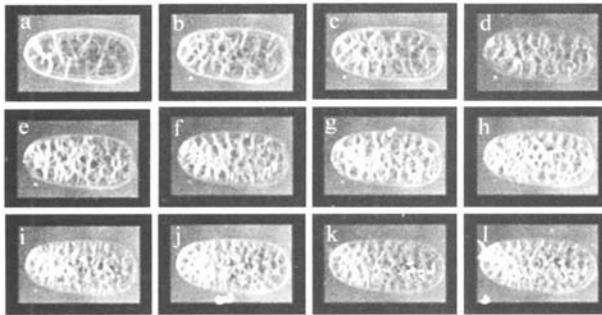


Fig 5 Reconstruction images of embryo undergoing cell fusion

显微镜拍摄的一组处于细胞融合状态的线虫胚胎图像的重建结果。在三维结构基础上根据时间顺序排列, 构成图像的四维显示, 并可以用电影放映的方式观察线虫胚胎的融合变化过程。

4 结 论

研究了激光扫描共聚焦显微镜图像的计算机处理。首先对图像进行光线吸收和散射的补偿, 弥补图

像序列随焦平面下移而出现的亮度、对比度减弱的问题。然后对图像进行基于最大后验的盲解卷积, 提高图像质量。最后采用光线投射算法重建三维结构, 并且实现三维图像平移、旋转、缩放、光线设置等操作, 更清晰全面地显示三维微细结构。实验表明: 该方法能够处理各大品牌激光扫描共聚焦显微镜 (Bio-Rad Leica, Zeiss) 拍摄的图像序列, 能够应用于普通配置计算机系统 (P4 2.93G CPU, 256M 内存、80G 硬盘、128M 显卡、Windows XP 操作系统), 具有较快的处理速度和良好的人机交互等优点。

参 考 文 献

- [1] SAKAS G, VICKER M G, PLATH P J Case study visualization of laser confocal microscopy datasets [A]. Proceedings of the 7th IEEE Visualization Conference [C]. San Francisco: IEEE Press, 1996: 375~379.
- [2] CLAXTON N S, FELLERS S J, DAVIDSON M W. Laser scanning confocal microscopy [EB/OL]. <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf> 2006-08-01.
- [3] SUN Y L, RAJWA B, ROBINSON J P. Adaptive image processing technique and effective visualization of confocal microscopy images [J]. Microscopy Research and Technique, 2004, 64(2): 156~163.
- [4] LEEUW W C, LIERE V R, VERSCHURE P J et al Visualization of time dependent confocal microscopy data [EB/OL]. <http://homepage.wi.nl/~winc/psgz/vis000.pdf> 2006-08-01.
- [5] GUAN Y Q, OPAS M, CAI Y Y et al Application of virtual reality in volumetric cellular visualization [EB/OL]. http://www.terarecon.com/download/products/vp_confocalimaging.pdf 2006-08-01.
- [6] RAZDAN A, PATEL K, FARN G E et al Volume visualization of multicolor laser confocal microscope data [J]. Computers & Graphics, 2001, 25(3): 371~382.
- [7] FANG S F, DAI Y, MYERS F et al Three-dimensional microscopy data exploration by interactive volume visualization [J]. Scanning, 2000, 22(4): 218~226.
- [8] RICHARD O D, PETER E H, DAVID G S. Pattern classification [M]. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001: 124~128.
- [9] YU D Y. Image processing and study on microscopy images [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2002: 23~35 (in Chinese).
- [10] YANG X S. Direct volume rendering of 3-D regular data sets [EB/OL]. <http://vis.cs.tsinghua.edu.cn/postdoctor/yxs/Course/visualization/materials/5-vr.ppt> 2006-08-01 (in Chinese).

简 讯

高能固体激光技术讨会在蓉召开

2007年 8月 15日, 由兵科院主办、西南技术物理研究所承办的“高能固体激光技术研讨会”在成都举行, 来自相关科研院所、大学的专家教授们会聚一堂, 就高能激光技术发展中的问题进行了研讨。大家分别对激光大气传输实验、激光跟踪、高能激光等领域做了最新的研究情况通报, 提出了急需解决的问题, 并展开演讲。与会专家认为, 这次研讨会将有利于推动高能固体激光技术的研究。

(西南技术物理研究所信息中心 供稿)