

## 深度学习在超分辨显微成像中的研究进展(特邀)

鲁心怡<sup>1,2</sup>, 黄昱<sup>3</sup>, 张梓童<sup>4</sup>, 吴天筱<sup>1,2</sup>, 吴洪军<sup>1,2</sup>, 刘永焘<sup>1,2\*</sup>, 方中<sup>3\*\*</sup>, 左超<sup>1,2\*\*\*</sup>, 陈钱<sup>1,2</sup><sup>1</sup>南京理工大学电子工程与光电技术学院智能计算成像实验室, 江苏 南京 210094;<sup>2</sup>南京理工大学江苏省光谱成像与智能感知重点实验室, 江苏 南京 210094;<sup>3</sup>南京理工大学机械工程学院, 江苏 南京 210094;<sup>4</sup>深圳萨米医疗中心(深圳市第四人民医院)感染管理科, 广东 深圳 518118

**摘要** 超分辨显微成像技术打破了传统显微镜存在的衍射极限限制, 提供了前所未有的细节观察能力, 使人们得以观察到衍射极限以下的微观世界, 有力地推动了生物医学、细胞学、神经科学等领域的发展。然而, 现有的超分辨显微成像技术存在成像速度慢、重建图像含有伪影、对生物样品光损伤大、轴向分辨率低等缺陷。近年来, 得益于人工智能技术的快速发展, 深度学习被用于研究克服超分辨显微技术的各种缺陷, 突破了超分辨显微成像技术的发展瓶颈。聚焦于主流超分辨显微成像技术存在的缺陷, 总结了深度学习对超分辨显微技术的优化效果, 并根据超分辨显微成像技术原理的特异性, 介绍了不同网络在超分辨显微技术上的应用成效, 最后对深度学习在超分辨显微成像领域应用中存在的问题进行了分析, 并对其发展进行了展望。

**关键词** 深度学习; 图像重建; 显微成像; 超分辨

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP241455

## Advances in Deep Learning for Super-Resolution Microscopy (Invited)

Lu Xinyi<sup>1,2</sup>, Huang Yu<sup>3</sup>, Zhang Zitong<sup>4</sup>, Wu Tianxiao<sup>1,2</sup>, Wu Hongjun<sup>1,2</sup>, Liu Yongtao<sup>1,2\*</sup>,  
Fang Zhong<sup>3\*\*</sup>, Zuo Chao<sup>1,2\*\*\*</sup>, Chen Qian<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Smart Computational Imaging Laboratory, College of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China;<sup>2</sup>Key Laboratory of Spectral Imaging & Intelligent Sense, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China;<sup>3</sup>School of Mechanical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China;<sup>4</sup>Infection Management Department of Shenzhen Sami Medical Center (Shenzhen Fourth People's Hospital), Shenzhen 518118, Guangdong, China

**Abstract** Super-resolution microscopy imaging technology surpasses the diffraction limit of traditional microscopes, thereby offering unprecedented detail and allowing observation of the microscopic world below this limit. This advancement remarkably promotes developments in various fields such as biomedical, cytology, and neuroscience. However, existing super-resolution microscopy techniques have certain drawbacks, such as slow imaging speed, artifacts in reconstructed images, considerable light damage to biological samples, and low axial resolution. Recently, with advancements in artificial intelligence, deep learning has been applied to address these issues, overcoming the limitations of super-resolution microscopy imaging technology. This study examines the shortcomings of mainstream super-resolution microscopy imaging technology, summarizes how deep learning optimizes this technology, and evaluates the effectiveness of various networks based on the principles of super-resolution microscopy. Moreover, it analyzes the challenges of applying deep learning to this technology and explores future development prospects.

**Key words** deep learning; image reconstruction; microscopic imaging; super-resolution

收稿日期: 2024-06-07; 修回日期: 2024-06-27; 录用日期: 2024-07-02; 网络首发日期: 2024-07-05

基金项目: 国家自然科学基金(62275125, 62201267, 62275121, 12204239, 62175109)、国家重大科研仪器研制项目(62227818)、江苏省自然科学基金青年项目(BK20220946)、江苏省基础研究计划前沿引领专项(BK20192003)、江苏省科技计划重点国别产业技术研发合作项目(BZ2022039)、中央高校基本科研业务费专项资金(30922010313, 2023102001)、江苏省光谱成像与智能感知重点实验室开放基金(JSJGP202201)、深圳 Sami 医疗中心高级别临床研究启航团队(SSMC-2024-TB5)、南京理工大学青年人才培养专项(30922010313)

通信作者: \*Yongtao.Liu@njust.edu.cn; \*\*fangzhong@njust.edu.cn; \*\*\*zuocho@njust.edu.cn

# 1 引言

在人类探索生命奥秘的漫长过程中,显微镜发挥着不可忽视的作用。自 16 世纪显微镜诞生起,人类对生命活动的探索踏入了微观领域。1873 年,阿贝提出了阿贝衍射极限,指出传统光学显微镜分辨率不可超过入射波长的一半,因此对于生物成像而言,基于可见光的传统显微镜分辨率局限于 200 nm,难以分辨如线粒体、肌动蛋白、活细胞微管等微小结构。为了进一步探索微观世界,突破传统光学显微镜衍射极限的超分辨显微成像技术应运而生<sup>[1]</sup>。超分辨显微成像技术的出现,成功将光学显微镜的观测分辨率由微米级带入了纳米级,分辨率提升至 20~70 nm。如今,超分辨显微成像技术已经成为了人类探索和发现微观世界的重要手段<sup>[2]</sup>。

随着超分辨显微成像技术的不断发展,诞生了诸多超分辨方法,例如受激发射损耗荧光显微镜(STED)<sup>[3]</sup>、随机光学重构显微镜(STORM)<sup>[3]</sup>、光活化定位显微镜(PALM)<sup>[4]</sup>、结构光照明显微镜(SIM)<sup>[4]</sup>、多光子非线性超分辨率成像(MPUM)<sup>[5-8]</sup>等。每种超分辨显微技术利用了不同的手段突破了衍射极限,根据其成像原理,不同的超分辨技术存在着不同先天优势和固有缺陷<sup>[9]</sup>。在生物样品的显微成像过程中,空间分辨率决定了是否能区分两个精细结构,时间分辨率决定了显微镜是否能完整捕捉生命活动过程,成像深度决定了对生物深组织成像的质量,光漂白、光毒性决定了成像对生物样品所带来的损伤程度。因此对于不同的超分辨成像技术,应根据其特性以及生物成像

的需求进行针对性优化。

深度学习是机器学习的一个分支,其通过多层人工神经网络对数据进行计算处理,根据是否需要已标注数据进行训练进行区分,网络可以分为有监督学习和无监督学习两种学习方式。近年来,深度学习快速发展,产生了诸多神经网络框架,如:卷积神经网络(CNN)<sup>[10]</sup>、生成对抗网络(GAN)<sup>[11]</sup>、U-Net<sup>[12]</sup>、ResNet<sup>[13]</sup>、Faster R-CNN<sup>[14]</sup>网络等。神经网络具有极强的自适应性,可以通过反向传播算法对自身不断优化,实现更好的数据拟合,同时其具备端到端的学习能力,实现输入端到输出端的直接映射。基于深度学习的优秀特性,使其在图像超分辨、图像去噪、图像分割等方面表现出色,这吸引了超分辨显微成像领域研究者的注意,他们将深度学习与超分辨显微技术进行结合,进一步提升成像分辨率,并克服了传统方法的超分辨显微技术缺陷。

本文讨论了深度学习在超分辨显微成像领域中的研究进展,以主流超分辨成像技术为脉络,介绍了不同超分辨显微成像技术的成像原理,分析其存在的优点以及缺陷,利用深度学习的方法应对不同技术所存在的缺陷。对于 STED,着重降低其光毒性,提升其成像速度以及轴向分辨率;对于 STORM 和 PALM,着重提升其成像速度,以及分子定位精度,提高重建分辨率;对于 SIM,着重提升其成像质量,去除重建图像伪影,并进一步减少图像重建所需帧数,降低光损伤。图 1<sup>[15-27]</sup>总结了不同神经网络对超分辨成像技术的优化方法与优化效果。

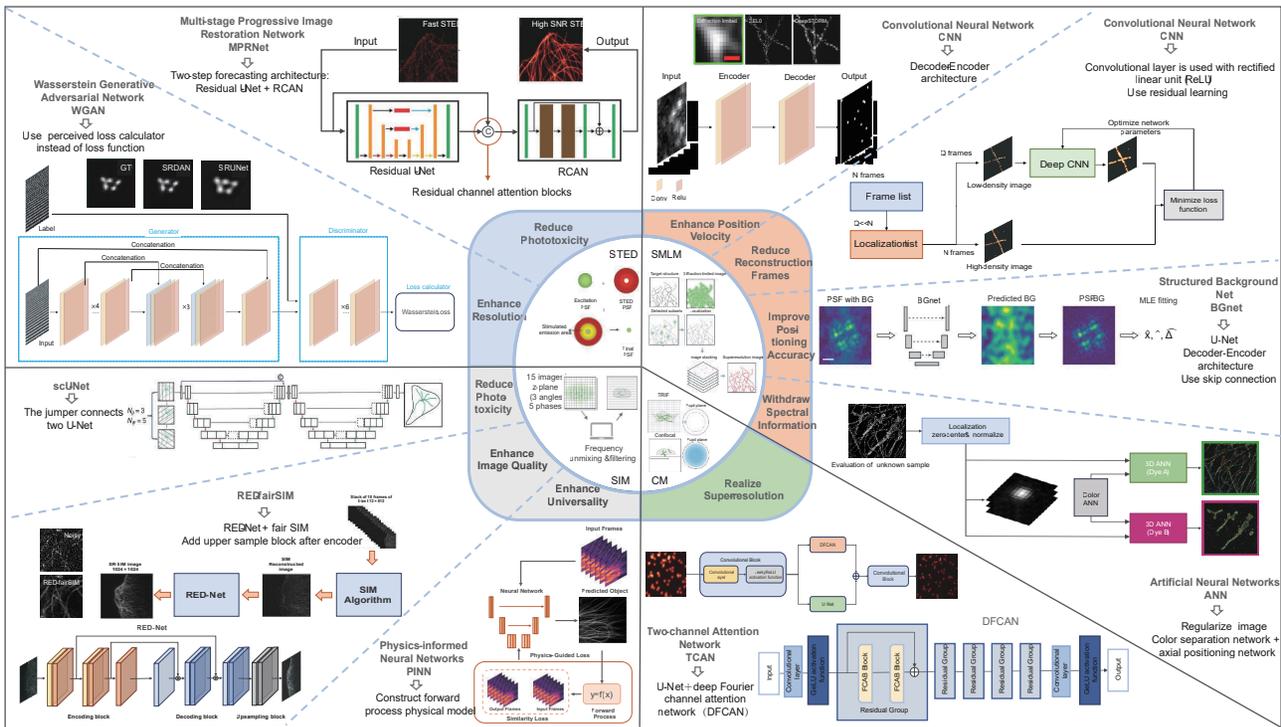


图 1 深度学习在超分辨率成像领域应用框架图<sup>[15-27]</sup>

Fig. 1 Framework of deep learning in super-resolution imaging<sup>[15-27]</sup>

## 2 深度学习在受激发射损耗显微术中的应用

STED 是目前主流的超分辨技术之一,如图 2<sup>[15,16,28]</sup>所示,STED 是先由一束高斯激发光经由物

镜照射到样品上,同时引入一束环形光束通过受激辐射将外围区域的荧光分子淬灭,两束激光精准对齐进而产生环形光中心未被淬灭的发射轮廓<sup>[29]</sup>。STED 凭借其空间分辨率高、实时成像、无需后期图像重建的优点得到科学家们的广泛关注。

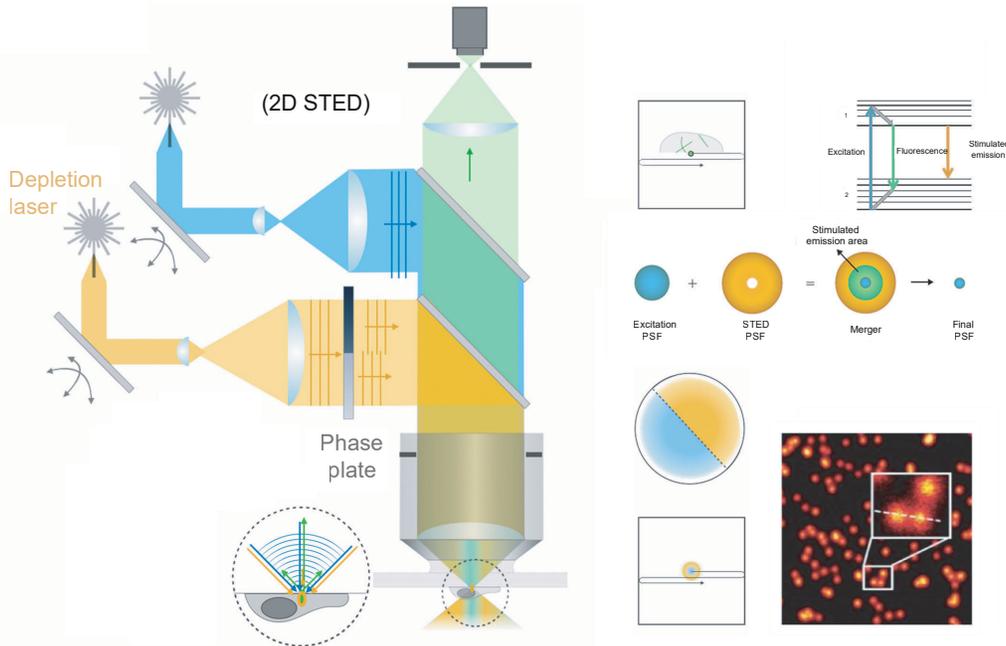


图 2 STED 光路原理图<sup>[15,16,28]</sup>

Fig. 2 Schematic diagram of STED<sup>[15,16,28]</sup>

STED 实现超分辨的关键在于损耗光的功率以及受激辐射与自发荧光相互竞争中的非线性效应,淬灭光功率越强,激发光斑的光斑外围受到的抑制越强,产生的有效荧光光斑越小,空间分辨率越高,但使用强耗损光的同时会带来光漂白、光毒性、光损伤等问题,这限制了 STED 活细胞中的应用<sup>[30-32]</sup>。此外,STED 使用点扫描成像,因此其成像速度慢,时间分辨率较低。同时,在应对厚样品时,其轴向分辨率仍有待进一步提升。

理论上,减少对生物样品的曝光时间即可降低光损伤<sup>[33]</sup>,但较短的像素驻留时间会导致较差的信噪比(SNR),进而降低图像分辨率<sup>[34]</sup>。为实现低 SNR 下的高质量超分辨率成像,美国佛罗里达大学的 Ebrahimi 等<sup>[17]</sup>在 2023 年提出使用多阶段渐进图像恢复(MPRNet)的方法,实现了 STED 的像素停留时间减小 1~2 个数量级,进而减少对样品的光漂白与光损伤。MPRNet 基于 U-Net 和残差通道注意力网络(RCAN)架构,使用 U-Net 网络架构进行上下采样,绕过低频信号,获取特征图像,然后使用 RCAN 网络进行图像重建,其网络框架图如图 3(a)所示,该方法可以精准重建低曝光图像,获得高信噪比超分辨图像,实现在保证原有分辨率的前提下将 STED 的像素停留时间减少至原本的 3.125%,成像速度极大提升。传统

STED 在  $1.0 \text{ mm} \times 0.78 \text{ mm}$  大小的区域记录 744 张大小为  $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$  的图像需要 12 h,而使用 MPRNet 仅需要 21 min。图 3(b)为 MPRNet 对噪声 STED 图像的恢复效果图。

2023 年 Chen 等<sup>[35]</sup>将寿命调谐分离(SPLIT)技术与 STED 技术相结合,使用时间分辨采集和相量分析成功区分有效荧光区域中心和外围发射的光子,实现了在不增加光损伤的同时提高分辨率。在此基础上,他们进一步将 SPLIT-STED<sup>[11]</sup>与 GAN 网络框架相结合,形成了基于 GAN 估计的荧光寿命成像网络(flimGAN),利用 GAN 网络对光子匮乏的相量图形去噪,以提供更高质量的相量图像,提升了 SPLIT 的重建水平,进而提升了系统的分辨率和鲁棒性,较单一 SPLIT-STED 实现了 1.45 倍的分辨率增强。图 3(c)、(d)为 flimGAN 网络框架图以及 Chen 等在实验中获得的一种耗尽激光强度下共聚焦、pSTED、pSTED、SPLIT 和 STED flimGAN 图像的比较。

理论上,STED 可以达到的最佳横向分辨率为 20 nm,但由于光毒性的限制,在实际活细胞的应用中横向分辨率往往只能达到 100 nm。为进一步提升横向分辨率,2020 年伦斯勒理工大学的 Li<sup>[18]</sup>提出深度对抗网络(DAN-based),根据 STED 原理,对较低分辨率图像使用物理建模进行计算,并输出对应的高分辨率

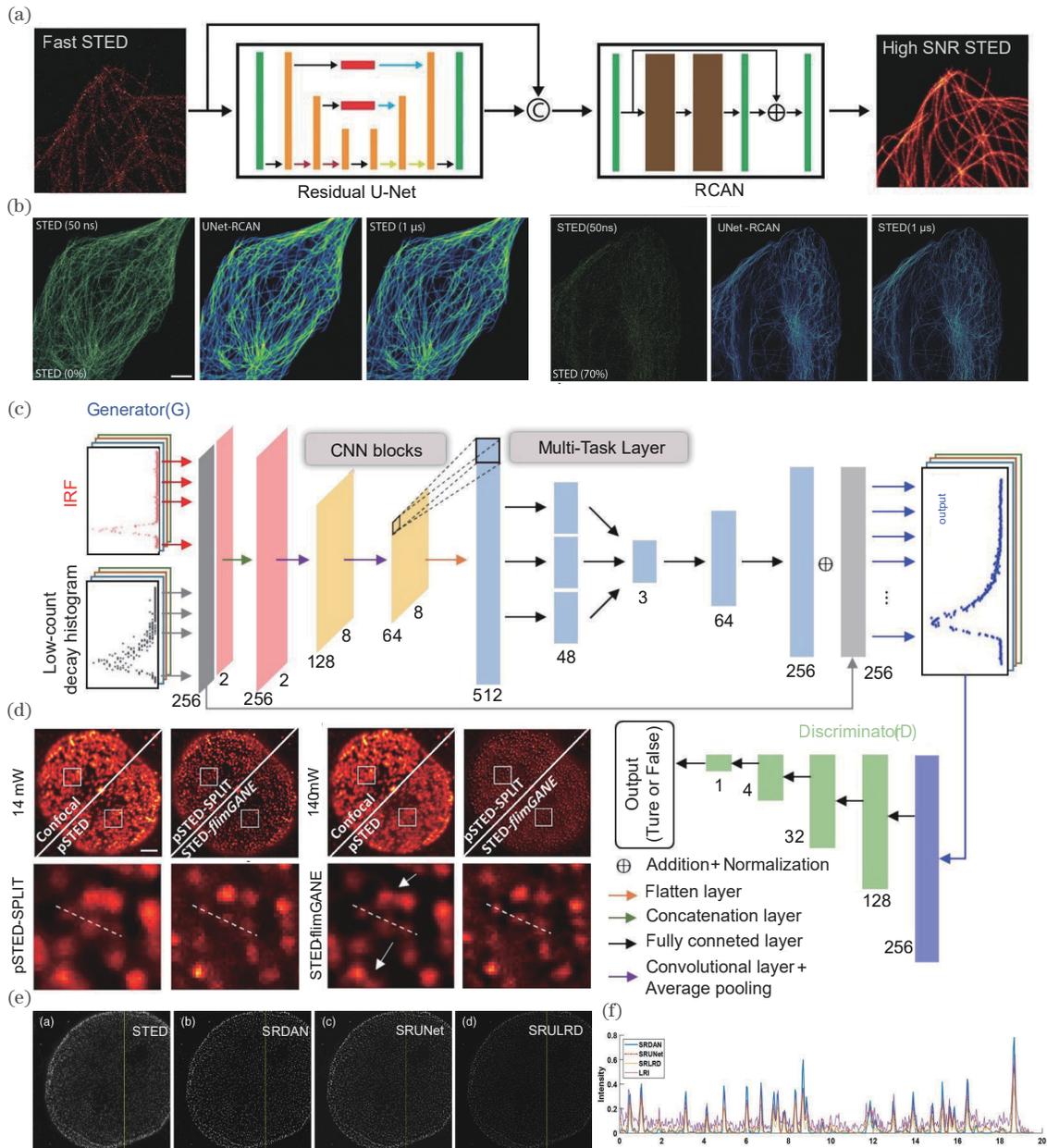


图 3 不同网络框架图和实验结果。(a) MPRNet 网络架构<sup>[17]</sup>；(b) U2OS 细胞中  $\beta$ -微管蛋白 (STAR635P) 的 MPRNet 重建图像<sup>[17]</sup>；(c) STED-flimGANE 网络结构图<sup>[35]</sup>；(d) 功率耗损极端条件下的强度图像<sup>[35]</sup>；(e) 低噪声 SRDAN 与其他方法的核孔成像对比图<sup>[18]</sup>；(f) 各算法核孔图像的线强度分布<sup>[18]</sup>

Fig. 3 Different network framework diagrams and experimental results. (a) MPRNet network architecture<sup>[17]</sup>; (b) MPRNet reconstruction images of  $\beta$ -tubulin (STAR635P) in U2OS cells<sup>[17]</sup>; (c) STED-flimGANE network structure diagram<sup>[35]</sup>; (d) intensity images under extreme conditions of rate depletion<sup>[35]</sup>; (e) comparison of nuclear hole imaging between low noise SRDAN and other methods<sup>[18]</sup>; (f) line intensity distribution of core hole images in each algorithm<sup>[18]</sup>

图像,并以此对网络进行训练,极大提高了网络模型的重建分辨率。同时,使用感知损失计算器替代了传统的均方误差损失函数,增强了网络对图像细节以及图像结构的提取能力,该网络模型可实现将 60 nm 的 STED 图像分辨率优化至 30 nm,图 3(e)、(f)为其成像效果图。

STED 成像作为一种点扫描成像方式,其实现三维 (3D) 成像需要使用 3D 扫描完成, Bessel-Bessel

STED (BB-STED) 实现了 STED 的 3D 扫描,但其图像仅是二维 (2D) 投影的结果,并没有实现轴向超分辨。目前,提升轴向分辨率、获取轴向信息的常用手段是使用螺旋点扩散函数,如单螺旋点扩散函数 (SH-PSF)<sup>[36]</sup> 和双螺旋点扩散函数 (DH-PSF)<sup>[37]</sup>,螺旋点扩散函数可将不同深度的荧光点扩展到不同的方位角,进而获取荧光点的轴向位置信息,提升轴向分辨率,但该方法无法准确分辨轴向密集荧光点。为

此, Ji 等<sup>[38]</sup>在 2024 年基于 BB-STED, 使用单螺旋点扩散函数并结合深度学习算法实现轴向超分辨。单螺旋点扩散函数相较于双螺旋点扩散函数具有更高的信噪比和更大的有效深度, 使用模拟密集单螺旋点图像对基于 CNN 的解码器-编码器网络进行训练, 将原始图像输入训练模型, 精确定位荧光点相对于光斑中心的方位角。在保证横向分辨率 50 nm 的同时, 该方法的轴向分辨率可达到 50 nm, 高于 4Pi-STED。同时, 在荧光点密度  $n=20$  的情况下, 该方法的轴向分辨率可达到 63 nm。

### 3 深度学习在单分子定位显微镜中的应用

单分子定位显微镜(SMLM)技术通过在多次循环中重复随机地激发稀疏分布的荧光分子, 并结合相关定位算法, 实现对不重叠荧光分子的精确定位, 最后

将定位图像集进行整合重建, 生成超分辨图像<sup>[39]</sup>, SMLM 成像原理如图 4<sup>[19]</sup>所示。SMLM 主要分为两种, 一种是 2006 年由哈佛大学庄小威团队首次提出的使用荧光小分子的随机光学重构显微镜(STORM)<sup>[3]</sup>; 另一种是同年由 Betzig 团队提出的使用荧光蛋白的光活化定位显微镜(PALM)<sup>[40]</sup>。由 SMLM 原理成像可知, SMLM 图像重建, 需要对样品进行大量的图像采集, 因此传统 SMLM 存在着时间分辨率低、无法实现活体动态成像、对样品存在光毒性和光漂白的问题。此外, 由于需要对采集的图像集进行分子定位和重建处理, 传统 SMLM 成像质量受制于分子定位算法精度, 成像时间受制于分子定位算法速度。而对于多色单分子定位成像, 则需要消除其在图像采集时的光谱串扰以及采集速度慢的问题。综上所述, 对于 SMLM 的优化主要集中在降低定位所需帧数、提高定位精度及速度、提升多色成像颜色区分水平上<sup>[41]</sup>。

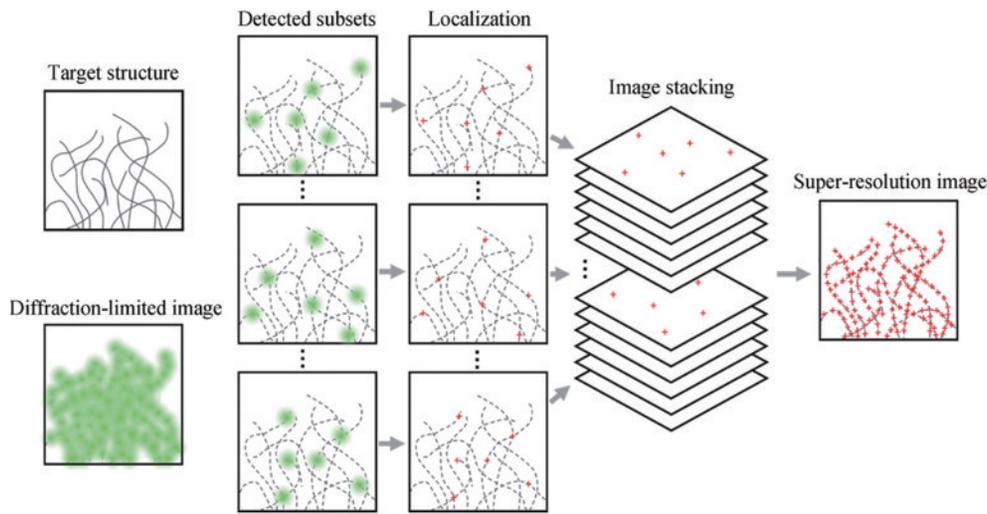


图 4 单分子定位显微成像原理<sup>[19]</sup>

Fig. 4 Principle of single molecule localization microscopy<sup>[19]</sup>

#### 3.1 提高重建速度

在单分子定位显微镜中, 单个荧光点的位置通常由高斯函数对 PSF 拟合来获取, 对于荧光点重叠密度高的区域, 其拟合过程更为复杂, 导致 SMLM 图像重建过程产生大量数据。因此, 传统 SMLM 计算成本极高, 成像速度缓慢, 且拟合重建精度依赖于对拟合参数调试, 专业性要求高。为了降低重建图像所需的计算成本, 提高成像速度, Nehme 等<sup>[20]</sup>在 2018 年提出了无参数超分辨率图像重建方法 Deep-STORM, 其网络基于传统的编码器(encoder)-解码器(decoder)架构和 CNN, 通过简单网络结构实现快速图像重建与无参数化。在荧光点与微管的重建实验中, Deep-STORM 已被证明比传统算法更快、更准确, Deep-STORM 对微管的重建效果如图 5(a)所示。但 Deep-STORM 算法高度依赖于训练数据, 因此在成像参数存在实质性差异时会产生伪影, 为此 Sahel 和 Eldar<sup>[42]</sup>提出了 Self-

STORM, 该网络使用自监督学习方案代替监督学习, 不再仅由原始图像映射到重建图像训练, 而是利用单个图像中信息的内部递归来组成编码器, 该编码器仅从低分辨率图片中学习, 不需要频繁调整优化参数, 降低了对外部训练样本的需求。该模型可以训练出与 Deep-STORM 成像质量相当的图像, 且泛用性更强, 其网络框架以及对比重建效果如图 5(b)、(c)所示。2021 年 Li 等<sup>[43]</sup>受 Deep-STORM 启发, 结合递归神经网络(RNN)提出了 Deep Recurrent-Supervised Network-STORM(DRSN-STORM), RNN 能够捕捉图像时序信息, 可以在不增加网络深度的情况下提取时间数据中的额外特征, 生成高效率模型。与经典的 Deep-STORM 方法相比, DRSN-STORM 的运行时间可以至少节省 40%, 其网络框架图和微管实验结果如图 5(d)、(e)所示。

为实现快速单分子 3D 定位, Boyd 等<sup>[44]</sup>于 2018 年

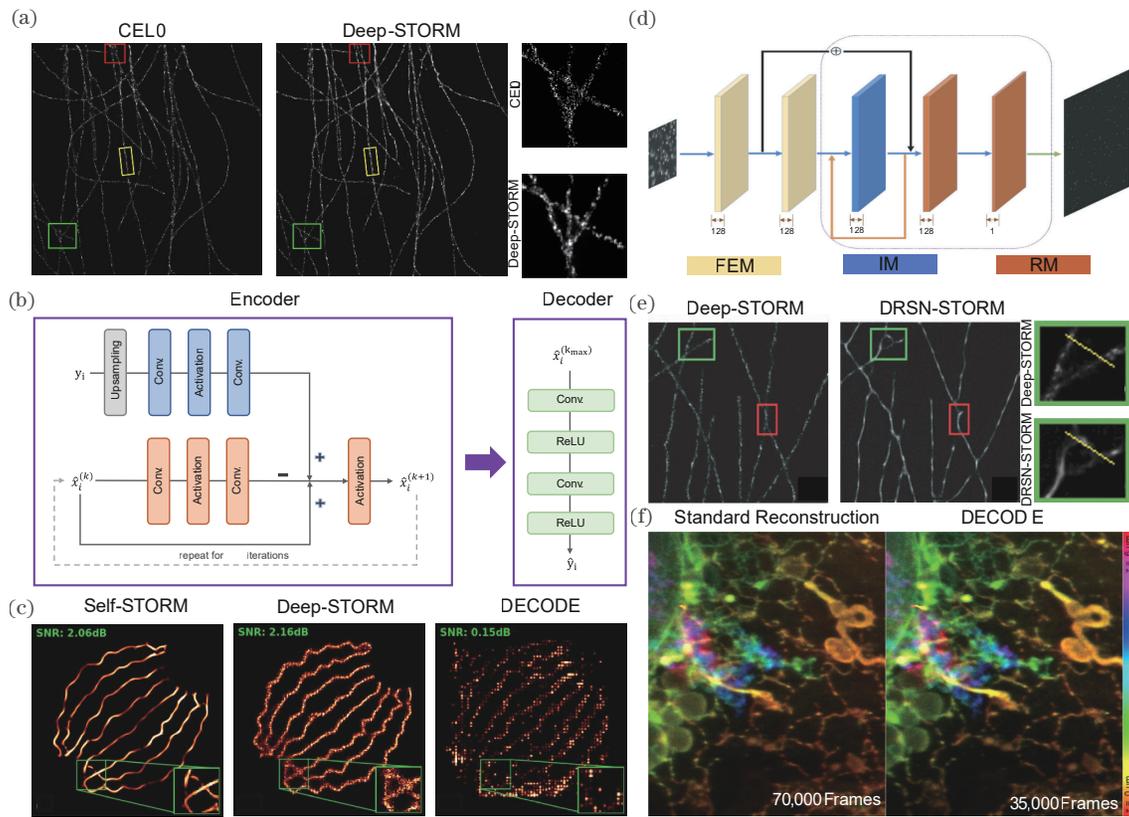


图5 提高图像重建速度相关网络与重建结果。(a) Deep-STORM 重建效果对比图<sup>[20]</sup>; (b) Self-STORM 网络架构<sup>[42]</sup>; (c) Self-STORM 重建效果对比图<sup>[42]</sup>; (d) DRNS-STORM 网络架构, 特征提取模块(FEM)、推理模块(IM)、重建模块(RM)<sup>[43]</sup>; (e) DRNS-STORM 微管图像重建效果<sup>[43]</sup>; (f) DECODE 重建效果图<sup>[46]</sup>

Fig. 5 Network and reconstruction results related to improving image reconstruction speed. (a) Deep-STORM reconstruction effect comparison<sup>[20]</sup>; (b) self-STORM network architecture<sup>[42]</sup>; (c) self-STORM rebuild effect comparison diagram<sup>[42]</sup>; (d) DRNS-STORM Network architecture, feature extracting module (FEM), inference module (IM), and reconstruction module (RM)<sup>[43]</sup>; (e) DRNS-STORM microtubule image reconstruction effect<sup>[43]</sup>; (f) DECODE reconstruct effect image<sup>[46]</sup>

提出了DeepLOCO网络架构。该网络基于经典CNN网络,使用残差连接防止产生梯度问题,并利用含不同种类噪声的模拟PSF训练网络,创新性地将最小化贝叶斯风险作为优化目标。该设计使得DeepLOCO具备了快速定位分子位置的能力,较传统算法实现了几个数量级的提升,且适用于不同噪声的图像。使用长序列微管蛋白数据集的进行重建测试,DeepLOCO在保证定位精度的前提下,在1 s内分析了20000帧的3D SMLM数据。

传统算法使用的最大似然估计(MLE)在重建过程中需要不断地调整参数以确保定位的精准度,在分子高密度标记的情况下极大地增加了重建难度。针对该问题,Zelger等<sup>[45]</sup>基于VGG16架构,对单帧图像实现了3D分子定位。该网络实现了与MLE相当的定位精度,定位速度可达 $22000\text{ s}^{-1}$ ,相较于传统的MLE算法速度提升了3个数量级以上。此外,Speiser等<sup>[46]</sup>于2021年利用深度学习对MLE方法进行了优化,提出了一种基于U-Net网络的Deep Context Dependent (DECODE)架构,通过U-Net网络将每一帧的荧光分子特征与前后帧特征相融合,获得更强的网络表达能

力,加快了网络重建图像的速度,减少了高密度分子标记下成像所需时间。Speiser等使用DECODE实现了超高标记密度的微管成像。在检测精度和定位误差方面,DECODE在12个数据集上的表现均优于其他常用模型,其在LLS-PAINT图像上的重建效果如图5(f)所示。

### 3.2 少帧重建

单分子定位显微镜重建对图像帧的稀疏性要求使得在分子高密度情况下,需要采集大量帧进行图像重建,为缩短图像采集时间,提升成像速度,应尽可能减少重建所需图像帧数。为此2018年Ouyang等<sup>[47]</sup>基于pix2pix<sup>[48]</sup>网络开发出了ANNA-PALM,相较于传统算法,ANNA-PALM利用生物图像的结构冗余,从采样帧数不足的SMLM数据中重建高质量图像。ANNA-PALM网络使用了三层损失函数设计:第一层使用多尺度结构相似指数(MS-SSIM)评价网络输出图像与密集PALM图像重建之间的差异;第二层引入CNN预测网络,生成模型输出的超分辨率图像对应的低分辨率宽场图像,并与实际宽场图像进行对比,评价二者的一致性;第三层使用cGAN鉴别器比较稀疏PLAM、

宽场图像与密集 PLAM 和网络输出图像之间的差异。该设计使得网络训练只需要少量的密集 PLAM 图像,且不会过度拟合。该网络模型实现了短时间采集情况下的高质量超分辨率图像重建,并且可以预测出重建可能出错的位置。在免疫染色微管成像实验中,

ANNA-PALM 使用宽场图像与 9 s 采集的 300 帧图像相结合作为输入,其重建图像达到了与使用 10 min 采集的 60000 帧图像重建的 PALM 相同水平,ANNA-PALM 实现了帧数减少两个数量级情况下的高质量图像重建,其架构与重建结果如图 6(a)、(b)所示。

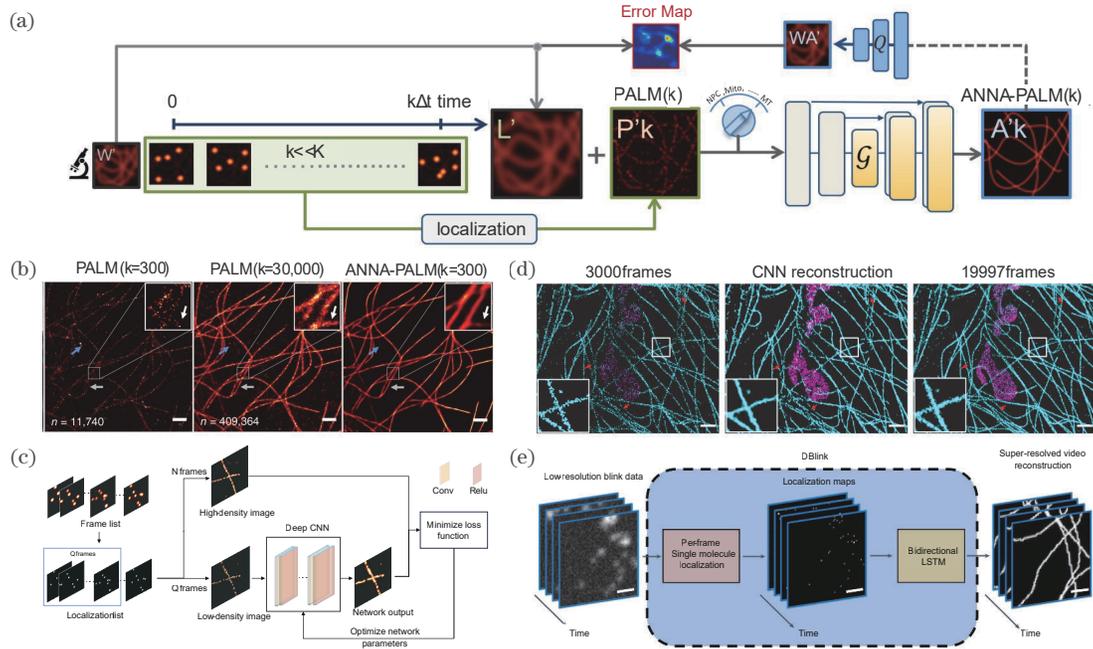


图 6 减少图像重建帧数相关的网络架构以及重建结果。(a) ANNA-PAM 网络架构<sup>[47]</sup>; (b) ANNA-PAM 重建与 PALM 对比<sup>[47]</sup>; (c) 多色单分子图像重建 CNN 框架<sup>[21]</sup>; (d) 多色单分子网络重建效果<sup>[21]</sup>; (e) DBlink 网络架构<sup>[49]</sup>  
 Fig. 6 Reduce the network architecture and reconstruction results related to the frame rate of image reconstruction. (a) ANNA-PAM network architecture<sup>[47]</sup>; (b) ANNA-PAM reconstruction compared with PALM<sup>[47]</sup>; (c) multi-color single molecule image reconstruction CNN framework<sup>[21]</sup>; (d) multicolor single molecule network reconstruction effect<sup>[21]</sup>; (e) DBlink network architecture<sup>[49]</sup>

光谱单分子定位显微镜 (sSMLM) 可以同时提供单分子的位置信息和光谱信息,为单个样品提供纳米级的多色超分辨成像,然而这需要大于  $10^4$  的连续衍射帧才能实现高分辨率图像重建,长时间的图像采集,不仅会影响活细胞成像,同时会带来光漂白降低图像质量。针对该问题, Gaire 等<sup>[21]</sup> 基于 CNN 网络,首先使用分子定位算法对图像分子进行定位,再利用网络模型恢复光谱分类后的稀疏图像,生成高分辨率图像,最后再将不同光谱的图像合成,生成彩色高分辨率图像。在 COS-7 细胞双色成像实验中,该方法使用 3000 帧和 23300 个定位点进行图像重建,实现了与传统方法使用 19997 帧和 134900 个定位点相同的成像质量,极大减少了重建所需帧数,其架构与重建结果如图 6(c)、(d)所示。

单分子定位显微镜对重建帧数的高需求使其时间分辨率较低,极大地限制了其在样品动态成像中的应用。2023 年 Saguy 等<sup>[49]</sup> 将双向卷积神经网络 (CNN) 与长短期存储器 (CNN-LSTM) 相结合,提出了一种 Data Base Link (DBlink) 网络。该网络将超分辨定位

图的连续帧作为输入,通过捕捉不同输入帧之间的长期相关性,输出动态超分辨结构视频,实现了超时空分辨率的视频重建。在活细胞时空分辨率重建上,实现了微管和内质网 30 nm 空间分辨率和 15 ms 时间分辨率的超分辨率重建,其网络结构如图 6(e)所示。

### 3.3 提升定位精度

在单分子定位显微镜中,单分子的定位精度决定了图像的空间分辨率,而定位精度取决于拟合算法的优越性,因此使用深度学习优化拟合算法,提高单分子的定位精度,进而实现 SMLM 的空间分辨率提升。实现单分子的精确定位需要消除背景噪声的影响,对背景信号参数进行精确估计。然而,由于局部背景信号的变化,背景信号参数的估计过程往往较为困难<sup>[12]</sup>。为此, Möckl 等<sup>[22]</sup> 基于 U-Net 架构提出了 Background Net (BGNet) 网络。利用 U-Net 网络强大的图像分割能力,剥离原始图像背景,同时模拟生成不同轴向位置的不同形状 PSF 训练网络,提升背景分割的精准度。该网络模型对于标准开孔径 (OA) 点扩散函数、 $2 \mu\text{m}$  轴向范围的双螺旋 (DH) 点扩散函数和  $6 \mu\text{m}$  轴向范围的

四足点扩散函数 (Tetra6 PSF) 均可实现精准的背景去除,显著提升了分子定位精度。在微管成像实验中,用 BGNet 估计的结构化背景与恒定的背景相比,克服了严重伪影、虚假定位、细节丢失等缺陷,重建了高质量微管超分辨图像,其网络架构与去背景效果如图 7(a)、(b) 所示。此外,Cascarano 等<sup>[50]</sup>基于 DeepSTORM 和正则化反卷积 CEL0,提出了 DeepCEL0 网络,该网络将 CNN 网络作为骨架,并使用 CEL0 作为训练损失函数。该设计使得 DeepCEL0 网络成功集合了 CEL0 高精度分子定位和 DeepSTORM 重建速度快,无需参数计算的优势。与标准方法相比,DeepCEL0 可以在不影响计算成本的情况下提供高精度的定位图像,DeepCEL0 对 IEEE ISBI 微管数据集的重建结果如图 7(c) 所示。对于密集标记样品中单个荧光点的精确 3D 定位,Nehme 等<sup>[51]</sup>提出了

DeepSTORM3D,利用 CNN,对高密度荧光点进行精确定位,CNN 在高密度情况下的定位精度远远优于基于拟合删减的匹配追踪法,同时,Nehme 等联合优化 PSF 和定位网络,引入了一个可微的物理模拟层,该模拟层利用相位掩模调控显微镜 PSF,并将其 3D 荧光图像编码为对应的低分辨率 2D 图像,再将该图像传输给 CNN 网络,使用反向传播算法不断优化相位掩模和 CNN 参数,其流程图如图 7(d) 所示。该方法所学习的产生 PSF 在低密度情况下与四足 PSF 效果相当,但当荧光点密度大于  $0.2 \mu\text{m}^{-2}$  时,学习 PSF 重建效果优于四足 PSF,荧光点密度为  $0.197 \mu\text{m}^{-2}$  时的四足 PSF 和学习 PSF 的定位结果如图 7(e) 所示。对 U2OS 细胞核内端粒进行成像实验,在  $20 \mu\text{m}^2$  的细胞核内含有的数十个端粒,在轴向范围  $3 \mu\text{m}$  内,四足 PSF 的 CNN 网络仅能恢复 62 个端粒中的 49 个,而使用学习 PSF 的

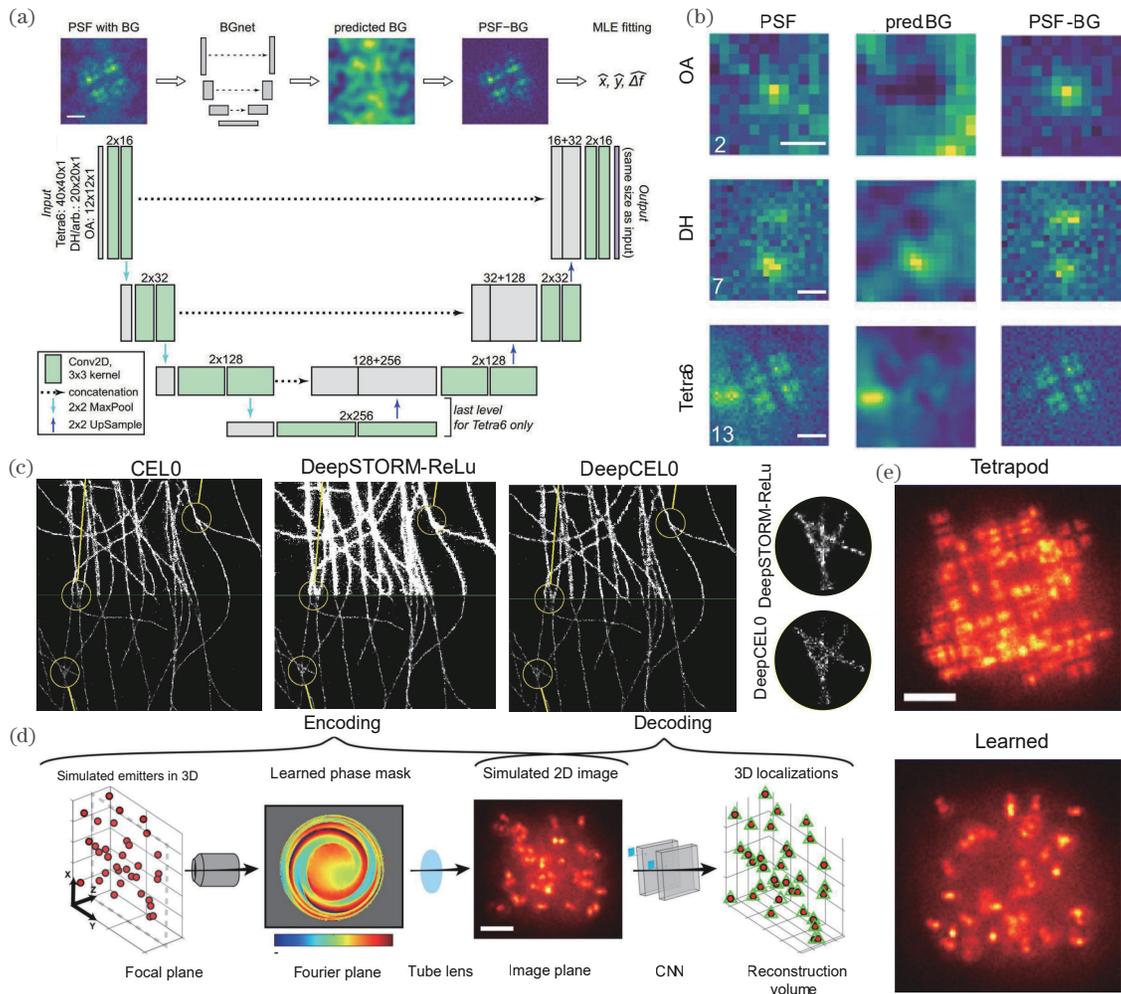


图 7 高精度分子定位相关网络与重建结果。(a) BGNet 网络架构<sup>[22]</sup>; (b) BGNet 对三种 PSF 成像方式的背景估计<sup>[22]</sup>; (c) 各算法在 IEEE ISBI 微管数据集的重建结果对比,上半部分为二值化图像,下半部分为标准化图像<sup>[50]</sup>; (d) 物理模拟反馈流程<sup>[51]</sup>; (e) 四足 PSF 和学习 PSF 的定位结果<sup>[51]</sup>

Fig. 7 High precision molecular localization related networks and reconstruction results. (a) BGNet network architecture<sup>[22]</sup>; (b) background estimation of three PSF imaging methods using BGNet<sup>[22]</sup>; (c) reconstruction results of IEEE ISBI microtubule data set are compared, the top half is binary image, and the bottom half is standardized image<sup>[50]</sup>; (d) physical simulation feedback flow<sup>[51]</sup>; (e) tetrapod and learned PSF localization results<sup>[51]</sup>

CNN 网络能够恢复 57 个, 仅有两个呈假阳性。

### 3.4 提取光谱信息

点扩散函数中包含了丰富的信息, 如: 分子位置、荧光发射波长等。同时, 分析单分子发光模式对于探索分子标记目标的结构和生理信息, 以及进一步清楚地了解它们的相互作用和细胞环境至关重要。近年来, 人们通过深度学习, 实现了从衍射受限图像中提取 PSF 的隐藏信息。2018 年, Zhang 等<sup>[52]</sup>提出了一种用于多路单分子分析的深度神经网络 Single-Molecule Net(smNet), 该网络由卷积层、残差块和全连接层组成, 由于光子在小区域内的分布体现了 PSF 的额外特征, 为准确提取特征信息, Zhang 等在初始层

内使用较大内核, 堆叠多层卷积层和残差块, 尽可能准确地捕获特征信息。同时, 设定单分子测量误差与每个训练图像的 Cramér-Rao lower bound(CRLB) 理论极限的相对差值作为系统的损失函数, 使得 smNet 能够提取到大范围的探测光子以及背景水平的相关信息。在三维单分子开关纳米显微镜图像重建实验中, 传统高斯方法的重建结构存在大量的伪影, 而 smNet 通过读取 PSF 中的额外信息, 获得像差等额外参数并依次建模, 使得其在样品不同深度均实现了高精度, 无伪影的图像重建, 其网络架构与重建的 COS-7 细胞中线粒体蛋白 TOM20 的超分辨率成像结果如图 8(a) 所示。

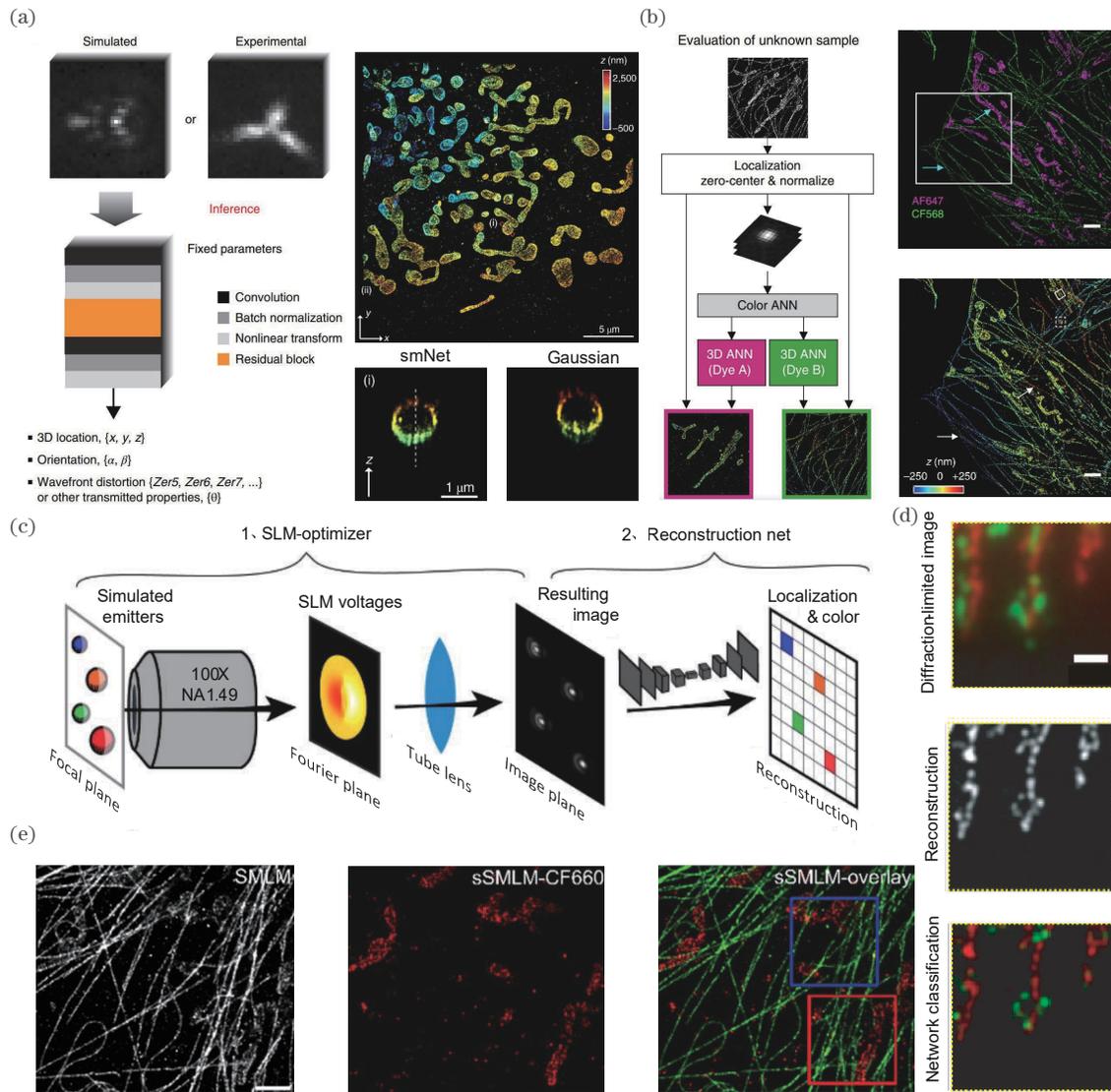


图 8 深度学习从 PSF 中提取附加光谱信息的网络及成像结果。(a) smNet 网络架构和重建效果图<sup>[52]</sup>; (b) 颜色分离与轴向定位架构与重建效果<sup>[23]</sup>; (c) 优化相位掩模的图像颜色分类过程图<sup>[53]</sup>; (d) 荧光标记的 HeLa 细胞成像图<sup>[53]</sup>; (e) COS-7 细胞的颜色分类图像<sup>[57]</sup>

Fig. 8 Deep learning extracts additional spectral information from PSF networks and imaging results. (a) smNet network architecture and reconstructed image<sup>[52]</sup>; (b) color separation and axial positioning architecture and reconstruction effects<sup>[23]</sup>; (c) image color classification process diagram of optimized phase mask<sup>[53]</sup>; (d) fluorescent-labeled HeLa cell imaging<sup>[53]</sup>; (e) color classification image of COS-7 cells<sup>[57]</sup>

多色显微成像常使用的方法是在多个传感器之间划分发射光谱,使用光谱滤波片进行光谱分类需要对通道之间进行精确配准,否则将影响重建图像精度,而使用单色光源对样品依次成像进行光谱分类则无法对生物样品进行动态成像,且其较慢的采集过程易使重建图像产生伪影。为实现多色超分辨显微成像, Kim 等<sup>[23]</sup>使用颜色区分网络和轴向定位神经网络从 PSF 中分别预测单个分子的轴向位置和荧光颜色,每当输入一个单分子图像,模型会先将单分子图像定位在二维平面中并进行颜色区分,然后对颜色分离的单分子图像进行轴向定位,再将所得颜色信息和轴向位置信息与每个分子的二维定位相结合,最终生成多维 SMLM 数据。该网络输入的全部数据通过一次成像采集,因此该方法规避了传统多色图像重建过程中的对准问题,其方法架构与重建效果如图 8(b) 所示。在 COS-7 细胞双色染色实验中,该方法在光子数为 3000 的情况下,实现了图像的高精度分色重建,且优于传统方法在 5000 光子数下的重建水平,其重建结果如图 8(c) 所示。此外,2019 年 Hershko 等<sup>[53]</sup>利用神经网络对多色超分辨成像进行了两步优化:首先,其利用神经网络构建灰度图像颜色分类模型,由灰度图像实现高精度的颜色分类;然后,利用神经网络并结合相位调制算法,予以不同波长不同的相位延迟,生成编码 PSF,以便颜色分类模型对于荧光点进行精确的颜色区分,提高颜色分类模型的分类精度。该网络在四色荧光点分类实验中,正确预测分类了  $96.8\% \pm 2.1\%$  的荧光点,在对荧光标记的 Hela 细胞成像实验中,成功区分了不同荧

光标记的微管和线粒体结构,其网络架构及成像效果如图 8(c)、(d) 所示。

为获得额外的光谱信息,研究人员将单分子显微镜与光谱收集通道相结合,构成了光谱单分子定位显微镜(sSMLM)。每个被系统收集到的光子只能随机进入一个光谱通道,因此光谱收集通道的增加会导致每个光谱通道内的光子数减少<sup>[54-56]</sup>,进而导致光谱间分类错误率较高,光谱信息获取困难。为解决该问题, Zhang 等<sup>[57]</sup>利用机器学习分析荧光分子的全谱图,其网络使用全连接层,并将交叉熵作为损失函数,并使用 Adam 算法对网络进行优化。与传统的光谱质心(SC)法相比,该方法提高了 10 倍的分色正确率和 2 倍的光谱数据利用率。在微管蛋白与线粒体的双色成像实验中,传统 SMLM 方法难以识别出线粒体结构,而该网络模型清晰分辨了两种结构,且未发生光谱串扰的现象。其网络架构与对光谱分类效果如图 8(e) 所示。

#### 4 深度学习在结构光照明显微术的应用

结构光照明显微镜(SIM)使用图案照明激发荧光,通过横向相移和旋转不同的离散角度,获取一系列原始图像,并利用图像重建算法生成超分辨图像。这种超分辨显微方法利用了摩尔条纹的拍频原理,将难以观测的高频信息转移到低频空间中,并在傅里叶域中分离低频信息和高频信息,将分离的信息移动到正确位置并重新组合,从而实现两倍的分辨率增强,其原理图如图 9<sup>[58-60]</sup>所示。SIM 相较于其他的超分辨显微

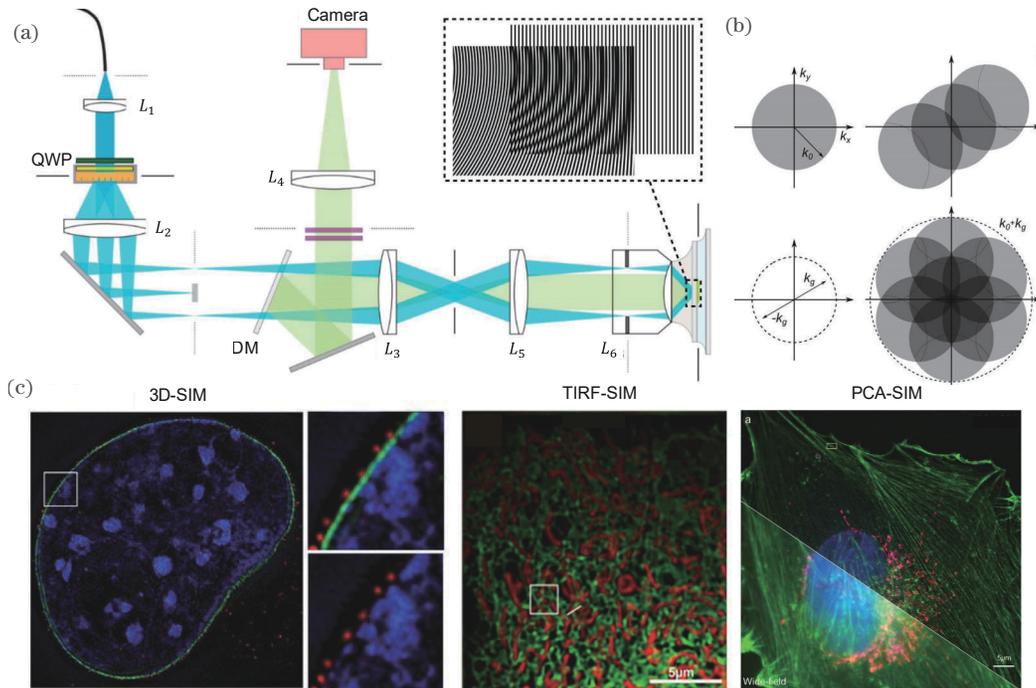


图 9 SIM 成像光路以及原理图。(a) SIM 成像光路图<sup>[58]</sup>; (b) SIM 的光谱扩展<sup>[58]</sup>; (c) SIM 成像图<sup>[58-60]</sup>

Fig. 9 SIM imaging optical path and schematic diagram. (a) SIM imaging optical path diagram<sup>[58]</sup>; (b) spectrum extension of SIM<sup>[58]</sup>; (c) SIM imaging image<sup>[58-60]</sup>

技术,具有极高的光子利用效率,因此其可以降低激发荧光所需的光功率,且成像速度快,这些特性使得 SIM 非常适合应用于活细胞成像。但是,由于多次采集不同角度和相位图像的需求, SIM 仍存在着光漂白和光损伤的问题,影响荧光光强稳定性及其图像重建效果,限制了其在生物样品中的进一步应用。此外, SIM 图像重建算法对计算资源要求高,对噪声敏感,因此在成像过程中的光照畸变、采样速率不足、参数估计错误等会导致重建图像产生伪影。综上所述,对于 SIM 的优化主要集中在进一步减少成像所需帧数、提高定位精度以及定位速度、去除重建图像伪影上<sup>[61, 62]</sup>。

#### 4.1 降低光毒性

在传统的 SIM 方法中,为了分离原始图像中的低频信息和高频信息,往往需要在同一方向上的三张移动照明图像,同时,为了提高同性分辨率还需要至少在三个角度上获得移动照明图像,因此重建超分辨 SIM 图像至少需要 9 张图像,而对于 3D-SIM 图像重建每个轴向切片则需要 15 张图像,因此传统 SIM 方法仍存在着较强的光漂白和光毒性。为进一步减少成像所需要的光剂量,增强 SIM 在生物样品中的应用,最直接的办法就是减少 SIM 重建所需的原始图像。在过去,研究人员开发了多种算法对 SIM 的图像重建进行提升,但这些方法需要对图像形成进行假设,受环境及噪声影响

较大,不仅需要使用者具备先验知识,且泛用性较差。因此,2020 年 Jin 等<sup>[24]</sup>利用深度学习的方法,基于 U-Net 网络,使用堆叠 U-Net 将 15 张原始 SIM 图像作为输入,并使用传统 SIM 重建的超分辨率图像作为真值进行训练,得到了 U-Net-SIM15,使用该网络对未输入过网络的陌生细胞结构进行成像得到了与传统 SIM 重建水平相当的结果。此外, Jin 等在此基础上进一步减少了原始图像的输入量,通过使用三张原始 SIM 图像对网络进行训练,得到了与 U-Net-SIM15 相当的成像质量,该方法被称为 U-Net-SIM3。为最大化降低光损伤, Jin 等降低了所使用的激光功率以及曝光时间,并训练了另一个 U-Net 网络用于获取低曝光图像中的信息,并将该网络的输出结果导入 U-Net-SIM15,利用 skip layer 连接这两个网络形成了新的网络架构,得到了 scU-Net-SIM。该网络可恢复低曝光原始图像,获得与传统 SIM 成像质量相当的成像结果,相较于传统 SIM 其所用原始图像减少为 1/5,光子数减少为 1/100,其网络架构与 scU-Net 重建对比如图 10(a)、(b)所示。类似地, 2020 年 Ling 等<sup>[63]</sup>提出使用 CycleGAN 网络实现由三张具有单向相移的原始结构光图像重建出与传统算法相同水平的超分辨率图像。该网络的特点是在训练时不需要训练集与真值集一一对应,相较于 Jin 等使用的 U-Net 网络训练效率更高,极大地减少了成像使用的光子

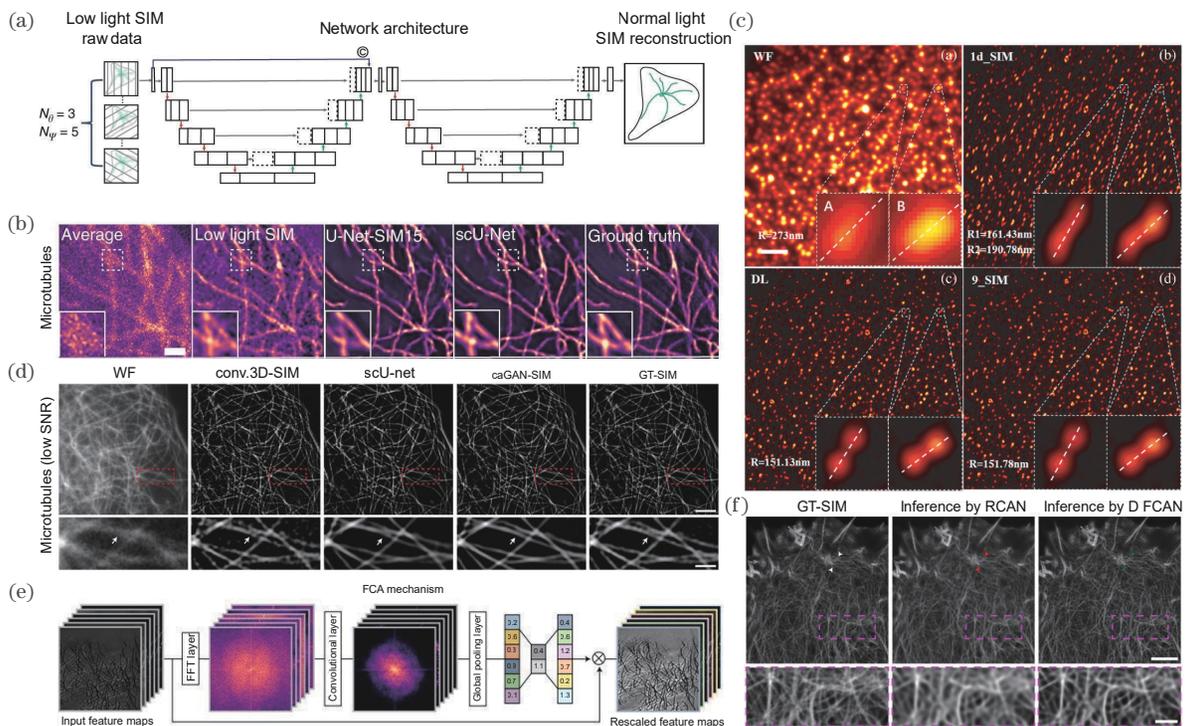


图 10 深度学习在结构光超分辨显微成像中的成像结果。(a) U-Net-SIM3 网络架构<sup>[24]</sup>; (b) 弱光条件下 U-Net-SIM5 和 scU-Net 的重建结果<sup>[24]</sup>; (c) 使用 CycleGAN 网络的 SIM 纳米珠成像图<sup>[63]</sup>; (d) 低信噪比下 caGAN 微管成像<sup>[64]</sup>; (e) DFCAN 的傅里叶注意机制原理示意图<sup>[65]</sup>; (f) DFCAN 重建 f-肌动蛋白细胞骨架图像<sup>[65]</sup>

Fig. 10 Imaging results of deep learning in structured light super-resolution microscopy imaging. (a) U-Net-SIM3 network architecture<sup>[24]</sup>; (b) reconstruction results of U-Net-SIM5 and scU Net under low light conditions<sup>[24]</sup>; (c) SIM nanobead imaging using CycleGAN network<sup>[63]</sup>; (d) caGAN microtubule imaging under low signal-to-noise ratio<sup>[64]</sup>; (e) schematic diagram of the Fourier attention mechanism principle of DFCAN<sup>[65]</sup>; (f) DFCAN reconstruction of f-actin cytoskeleton images<sup>[65]</sup>

数,其对纳米珠重建效果如图 10(c)所示。

对于 3D-SIM, Qiao 等<sup>[64]</sup>于 2021 年基于 GAN 网络架构,建立了一种通道注意力网络(caGAN)用于进行 3D-SIM 重建。使用该方法对微管和溶酶体的动态相互作用进行成像,在记录了 200 个时间点后,样品没有出现明显的光漂白现象,在生物样品上表现优秀。caGAN-SIM 最大的优势在于它可以在图像数量相较于传统 SIM 减少为 1/7.5、总光子数减少为 1/15 的情况下依旧保证良好的成像质量,其微管图重建效果如图 10(d)所示。同年, Qiao 等<sup>[65]</sup>基于傅里叶域中不同特征映射的功率谱特征提出了傅里叶通道注意力网络(DFCAN)并结合生成对抗网络构建 DFGAN,傅里叶通道注意力机制可以依照功率谱中包含的频率分量综合贡献自适应地调整每个特征映射,相较于空间通道注意力机制,可以更精确地推断出精细结构。对于传统 SIM,线粒体的动态成像过程中需要长时间曝光或高强度照明获得多张原始图像,这会对线粒体造成强光毒性,难以获取完整线粒体的运动过程。而 DFCAN 和 DFGAN 成功实现了对线粒体的超微结构运动的成像。因为 DFCAN 对于单帧的光子数要求远低于传统 SIM,可以长时间对活细胞进行成像,可获取的成像帧数超过 1000 帧,成像时间较传统 SIM 提高了 10 倍,其原理与 f-肌动蛋白细胞骨架重建如图 10(e)、(f)所示。

在 2022 年, Cheng 等<sup>[66]</sup>利用深度学习进一步减少了 SIM 重建所需的图像帧数,他们提出的快速轻量级 SIM 超分辨率网络(FLSN)可以实现将任何角度或相位拍摄的原始帧 SIM 图像转化成相应的超分辨率结果,该方法称为 SF-SIM。SF-SIM 相较于传统的 SIM,其成像速度提升了 14 倍,其中 FLSN 中设计的多内核多尺度网络可以帮助 SF-SIM 适应不同的样本,同时基于 Haar 小波设计,可以使网络更好地去除图像的噪声。

## 4.2 提升成像质量

优秀可靠的算法是获得高分辨 SIM 重建图像的重要途径, SIM 的图像重建算法是 SIM 领域的研究热点, 研究者们开发了诸多算法用于对原始图像进行高分辨率重建, 例如 fairSIM<sup>[67]</sup>、CC-SIM<sup>[68]</sup>、OpenSIM<sup>[69]</sup> 等, 但这些算法对重建原始图像的信噪比要求较高。在实际成像过程中, 由于样品光漂白、成像时间过短、激发光功率较低等问题, 原始图像信噪比较低, 重建结果分辨率下降, 重建图像出现伪影。针对这一问题, 2021 年 Shah 团队<sup>[25]</sup>提出将经典的计算重建方法 fairSIM 与残差编码器-解码器网络(RED-Net)相结合, 并将该工作流程称为 RED-fairSIM。他们对 RED-Net 网络进行了改进, 在其编码块后增加了一个上采样块, 使其能够对输入的图像在较低维度时进行去噪, 减少了训练时间。研究发现, 将 fairSIM 重建后图像输入使用了高噪声原始图像训练后的 RED-Net 网络, 最终的成像结果解决了 fairSIM 无法重建高分辨率的图

像和重建图像存在伪影的问题。该方法在不同噪声程度的骨肉瘤细胞微管上得以验证, 无论是在低噪声水平还是高噪声水平的原始图像上都出色地完成了高质量图像重建任务, 其网络架构与对 U2OS 骨肉瘤细胞重建效果如图 11(a)、(b)所示。

传统的 SIM 图像重建, 需要原始图像的高对比度, 这对实验所使用的光源以及实验的光学精准度要求较高, 为了克服该问题, Chen 等<sup>[70]</sup>在 2024 年于 *Optics Express* 上提出基于残差神经网络构建的 CR-SIM。该网络的训练集包含了低对比度图像, 在对具有较大背景噪声以及厚度的样品测试时, CR-SIM 的图像重建质量显著高于传统的 fairSIM、IM-SIM<sup>[71]</sup>。除此之外, Chen 等还发现该网络可以很好地弥补数字微镜器件结构照明显微镜(DMD-SIM)所存在的缺陷。DMD-SIM 具有结构紧凑、成本低, 成像质量高度依赖于原始图像对比度的特点, 将 CR-SIM 网络用于 DMD-SIM, 在 huFIB 细胞微管极低对比度成像实验中, Fair-SIM、IM-SIM 算法均因为投影系统的低通滤波特性, 其调制曲线抑制了高频条纹对比度, 无法正确计算出图像的相位以及频率, 但 CR-SIM 的特殊设计可以使其避开高频调制的限制, 提高成像质量。此外, 在不同样品的成像测试中, CR-SIM 表现出了极好泛用性, 在微观、网格蛋白包覆凹坑、f-肌动蛋白和线粒体结构中均成功实现了高质量图像重建, 且没有引入伪影的现象, 其对细胞微管重建效果如图 11(c)所示。

对于多焦点结构照明显微镜(MSIM), 其重建过程包含了针孔成像、局部缩放、求和与反卷积, 因此对于 MSIM 而言, 高效的重建算法非常重要。针对这一特点, 2023 年 Liao 等<sup>[72]</sup>提出使用 CNN 网络, 直接建立原始 MSIM 图像与重建后的 MSIM 的映射关系, 对图像重建过程进行加速。该方法实现了将 MSIM 的原始图像帧数减少 3/4, 在不增加光毒性和光漂白情况下提高 MSIM 体内成像的时间分辨率, 且网络对低噪声和高噪声的原始图像都具有一定的重建能力, 使得网络只需要训练一次, 所得训练权重可以适用于不同的噪声水平的原始数据。在深度为 100  $\mu\text{m}$  的斑马鱼活体内成像实验中, Deep-MSIM 相较于传统的 MSIM, 实现了成像时间由 162.63 s 到 72.87 s 的提升, 其对细胞微管重建效果如图 11(d)所示。

传统的 SIM 重建仅在横向分辨率上实现了超分辨, 轴向分辨率仍有待提升, 2008 年 Gustafsson 等<sup>[73]</sup>提出使用三束相干光束实现 SIM 重建图像的轴向分辨率两倍提升的 3D-SIM, 在此基础上, Burns 等<sup>[26]</sup>于 2021 年提出使用 RCAN 网络实现从 2D-SIM(两束相干光, 三个角度)重建达到 3D-SIM 的轴向分辨率, 不仅去除了高图像计数引起的伪影, 同时降低了样品光漂白。该网络以 2D-SIM 图像作为输入, 以波长减小

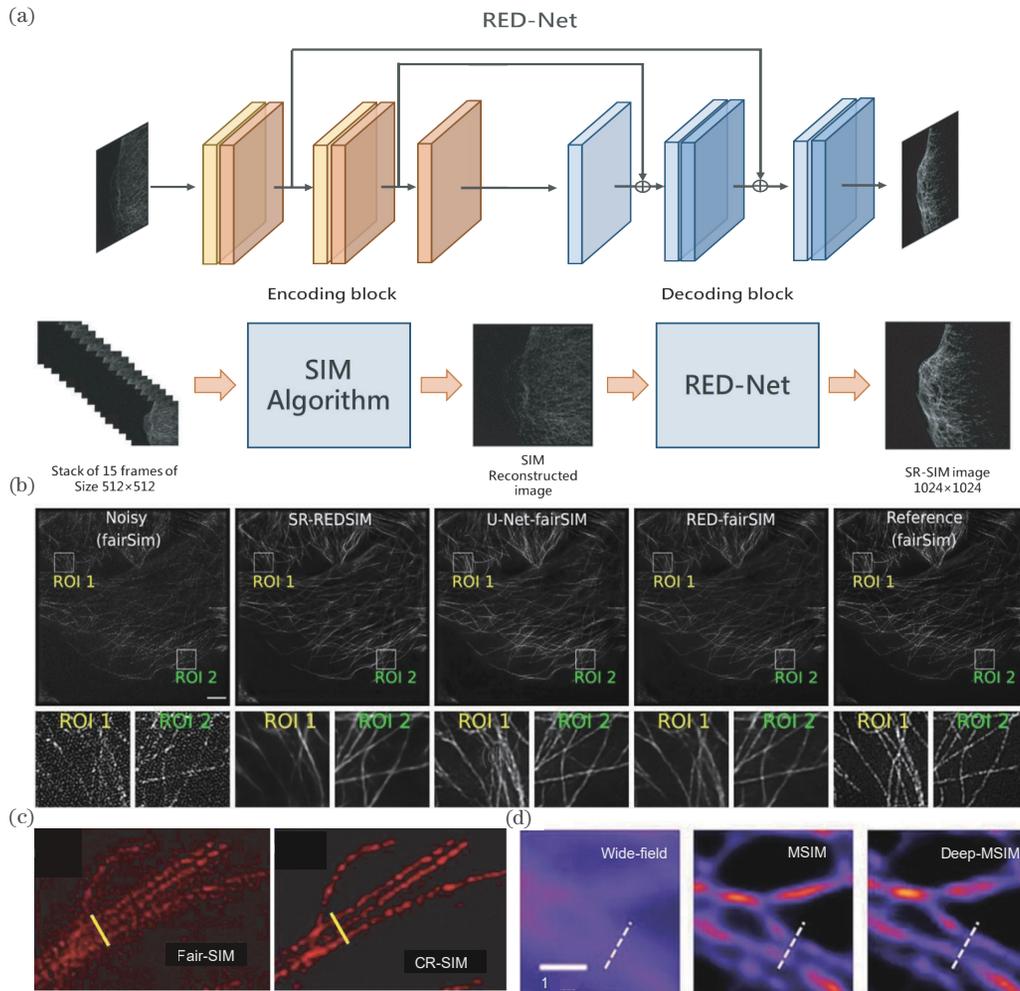


图 11 提升 SIM 图像重建质量的网络架构以及重建结果图。(a) RED-fairSIM 深度学习网络架构图<sup>[25]</sup>；(b) U2OS 骨肉瘤细胞 RED-fairSIM 成像结果图<sup>[25]</sup>；(c) CR-SIM huFIB 细胞微管成像图<sup>[70]</sup>；(d) Deep-MSIM 微管成像效果图<sup>[72]</sup>

Fig. 11 Network architecture and reconstruction result graph for improving the quality of SIM image reconstruction. (a) RED-fairSIM deep learning network architecture diagram<sup>[25]</sup>; (b) RED-fairSIM imaging results of U2OS osteosarcoma cells<sup>[25]</sup>; (c) CR-SIM huFIB cell microtubule imaging image<sup>[70]</sup>; (d) Deep-MSIM microtubule imaging effect<sup>[72]</sup>

$1/\sqrt{2}$  的共聚焦图像作为真值图像,并通过减少共聚焦图像堆栈中的切片厚度来实现真值图像的轴向分辨率提升。该方法在 24 个看不见的模拟染色质结构的测试中,RCAN 重建的半峰全宽(FWHM)为 436.8 nm (标准差为 21.8),对比传统 SIM 平均值的 669.67 nm (标准差为 207.2),轴向分辨率得到了显著提升。

### 4.3 增强神经网络的泛用性

深度学习在 SIM 领域被广泛应用,但神经网络的泛用性仍有待提升,一是深度学习在各研究小组里的广泛应用,二是神经网络在不同样品上的泛用性。

2021 年 Qiao 等在 *Nature Methods* 上发文,讨论了深度学习在具体什么水平的原始图像重建时,深度学习的方法要优于传统 SIM 技术,同时他们搭建了多模态 SIM 系统,该系统包含了 TIRF-SIM、GI-SIM、非线性 SIM 以及在宽信噪比内获得一一匹配的低分辨率和高分辨率图像。Qiao 等<sup>[65]</sup>使用该系统对网格蛋白包覆凹坑、内质网、微管和肌动蛋白成像,对每一样品

记录 10 种不断提升的激发强度下的 50 组原始 SIM 图像,并保证在最高激发光强下所有原始 SIM 图像具有足够高的信噪比,足以重建高质量 SIM 图像。该成像数据集被命名为 BioSR,如图 12(a)所示,并可以公开获取。在此基础上,Qiao 等对卷积神经网络(SRCNN)、增强型深度神经网络(EDSR)、条件图像转换生成对抗神经网络(Pix2Pix)和跨模态生成对抗神经网络(CMGAN)进行了重建分析,并以归一化均方根误差、多尺度结构相似性指数以及分辨率作为评价标准,划定了在不同样品下传统 SIM 的适用范围,以及每一神经网络重建效果优于传统 SIM 的范围。他们的工作为后续的深度学习 SIM 网络提供了训练数据,为评估深度学习超分辨显微网络提供了高质量基准。

目前应用于超分辨显微成像领域的深度学习神经网络大多数采用有监督学习的方法,这些网络结构存在两个缺陷:1)需要训练集和真值集,且大部分网络需

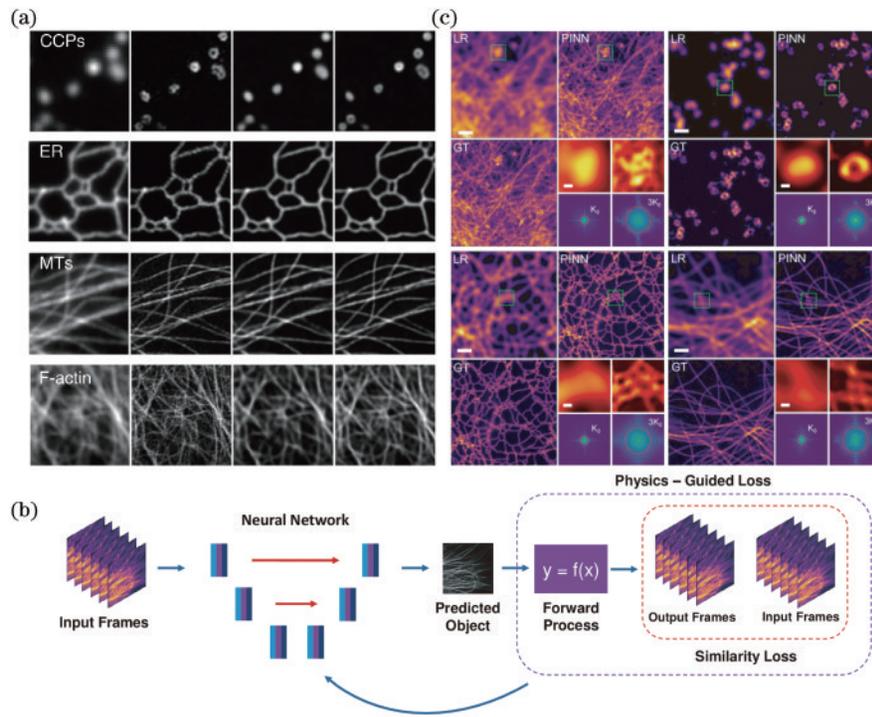


图 12 BioSR 数据集和 PINN 网络相关图像。(a) BioSR 数据集<sup>[65]</sup>; (b) PINN 网络架构<sup>[26]</sup>; (c) 基于 PINN 的非线性 SIM 分辨率在多种对象类型上的优化结果图<sup>[26]</sup>

Fig. 12 BioSR data set and PINN network related images. (a) BioSR data set<sup>[65]</sup>; (b) PINN network architecture<sup>[26]</sup>; (c) optimization results of nonlinear SIM resolution based on PINN for multiple object types<sup>[26]</sup>

要配对的训练集和真值集,但高分辨率的真值图像往往获取困难,通常需要使用其他的超分辨率技术获取; 2) 监督训练的网络对应用对象类别的敏感度较高,当训练网络应用于不同对象时,重建图像可能会表现出训练集特征。为进一步提升深度学习模型的泛用性,2023 年加利福尼亚大学的 Burns 等<sup>[26]</sup>在 *Optics Express* 上提出将深度学习网络与 SIM 正演模型相结合,构建出物理信息神经网络 (PINN),其网络架构与在多种对象类型上的优化效果如图 12(b)、(c) 所示,在不使用训练集和真值集的情况下,对有限分辨率的图像直接进行优化。该网络为一个类似于 U-Net 网络框架,低分辨率图像输入网络后,通过 SIM 照明调制后输出一个图像,该图像再经过 SIM 的正向过程生成一系列的子图像,并对比该图像与之前的输入图像,直至二者之间的损失函数趋于稳定,实现高分辨率图像输出。该网络在线性 SIM、非线性 SIM,以及 f-肌动蛋白、网格蛋白包被凹坑 (CCP)、内质网和微管等不同结构上均表现优秀,提高了成像分辨率,且不需要对网络进行多次训练,具有鲁棒性。

## 5 跨模态超分辨成像

除去在现有超分辨率技术使用深度学习克服其缺陷使其达到更好的成像效果的方法外,研究者们还尝试使用深度学习将非超分辨成像技术所成图像直接转换为超分辨图像,即跨模态超分辨成像 (CM)。由于在

相同的成像质量下,共聚焦显微镜的激发功率比 STED 所需的激发功率低 1/10~1/3,如果能在该情况下使共聚焦显微镜获得与 STED 相同的分辨率,则可以极大地降低成像所需的光剂量,进而减少光漂白和光毒性。为此 Wang 等<sup>[74]</sup>于 2018 年在 *Nature Methods* 上提出利用深度学习实现荧光显微镜的跨模态转换,他们使用 GAN 实现了共聚焦图像与 STED 相匹配的分辨率,全内反射荧光显微镜 (TIRF) 图像获得与基于 TIRF 的结构光照明显微镜相匹配的分辨率。该方法降低了超分辨成像的门槛,使超分辨显微成像可以在更多系统上普及,其网络框架、共聚焦到 STED 的跨模态转换图像以及对纳米珠重建效果如图 13(a)、(b) 所示。

2023 年 Huang 等<sup>[27]</sup>提出一种双通道注意力网络 (TCAN),该网络基于条件生成对抗网络 (cGAN),生成器使用了 U-Net 和深度傅里叶通道注意力网络 (DFCAN),这样的设计使得该网络不仅可以提高跨不同数据集的预测性能,还可以精准地学习图像的高频信息,获得更精准的映射结果。该方法在直径 23 nm 的纳米珠测试实验中由 TCAN 输出的共聚焦网络图像 PSF 的 FWHM 达到了  $(58 \pm 1)$  nm,而传统 STED 图像仅为  $(83 \pm 9)$  nm。在 HeLa 细胞核成像实验中,TCAN 比 STED 图像能更好地解析密集标记的核孔复合物 (NPC),并降低了背景噪声,在保留有用信息和去噪之间实现了折中。最后,在多种生物结构以

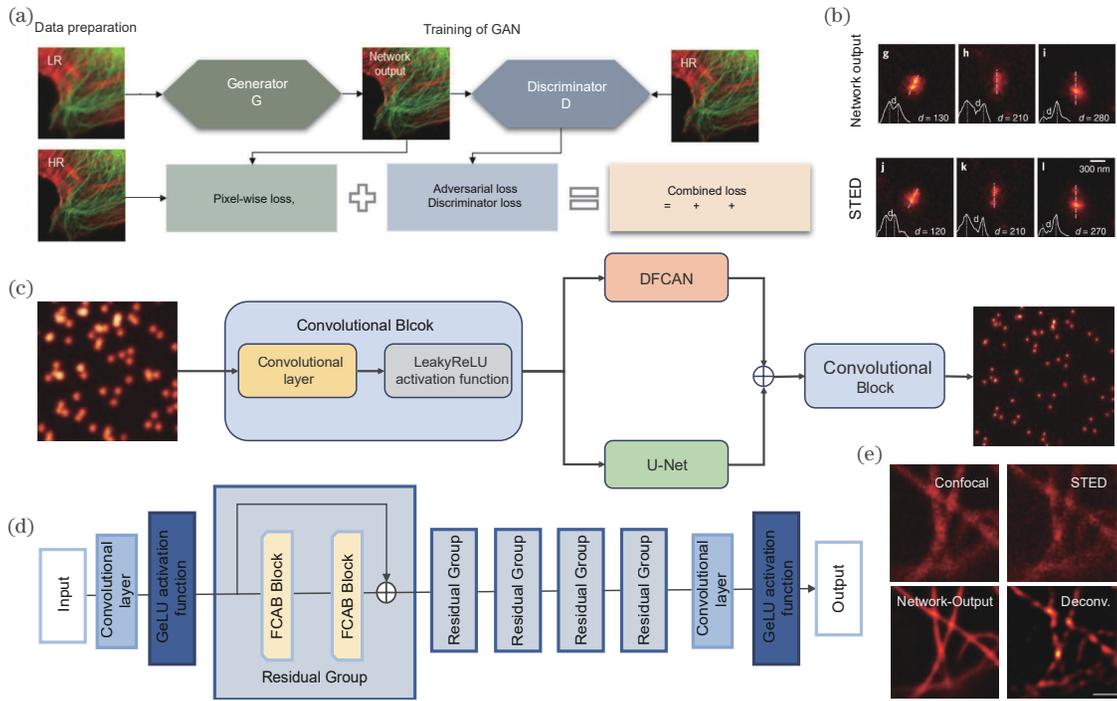


图 13 深度学习实现跨模态转换网络结构图以及结果图。(a)深度学习实现荧光显微镜的跨模态转换网络框架<sup>[74]</sup>；(b)从共聚焦到 STED 的跨模态图像转换结果图<sup>[74]</sup>；(c) TCAN 网络生成器部分网络结构图<sup>[27]</sup>；(d) DFCAN 机制网络图<sup>[27]</sup>；(e) TCAN 对微管进行超分辨率成像结果图<sup>[27]</sup>

Fig. 13 Deep learning implements cross modal transformation network structure diagram and result diagram. (a) Deep learning implementation of cross modal transformation network framework for fluorescence microscopy<sup>[74]</sup>; (b) results of cross modal image conversion from confocal to STED<sup>[74]</sup>; (c) partial network structure diagram of TCAN network generator<sup>[27]</sup>; (d) DFCAN mechanism network diagram<sup>[27]</sup>; (e) TCAN super-resolution imaging results of microtubules<sup>[27]</sup>

及肌动蛋白微观双色成像实验中,将双色共聚焦图像的分辨率从 230 nm 提升到 110 nm,其网络架构以及对微管重建效果如图 13(d)、(e)所示。

## 6 结束语

现有的超分辨显微技术由于其成像原理而存在着成像速度慢,重建图像存在伪影,对生物样品光损伤大等问题,使用传统物理方法或算法解决这些问题往往较为复杂,或者难以取得期望效果。深度学习以其优秀的解决图像重建逆问题能力而极大地克服了超分辨显微成像技术中存在的各种缺陷,但深度学习方法在超分辨显微成像领域中的应用仍面临着一系列的挑战:1) 目前在超分辨显微成像领域使用的神经网络主要还是以有监督学习为主,为获取精确高质量模型,需要使用大量一一对应的低分辨率图像和高分辨率图像,但高分辨率图像往往获取困难,这限制了深度学习方法在超分辨显微成像领域中的广泛应用。2) 深度学习模型训练成本高,神经网络越深越复杂,其训练模型的准确性越高,但这需要使用大量的计算资源,训练时间较长。3) 深度学习模型重建图像的可信度有待提升。深度学习模型不同于传统的具有严密理论推导与证明的光学理论模型,其直接建立图像间的特征映射的特点使其更像一个“黑盒”,因此在学界缺乏理论说服力。

针对以上几种挑战,可以从如下几个方面寻求解决方法:1) 建立高质量、样本种类丰富的公共数据集,促进深度学习的广泛应用。如 Qiao 等<sup>[65]</sup>建立的 BioSR 的 SIM 数据集,包含多样的样本和对应的高低分辨率图像,以供研究人员共享和使用。2) 根据训练任务设计神经网络,轻量化网络模型,使用特殊设计减少神经网络的层数,减少计算资源的使用和训练所需要的时间。3) 提高网络的泛用性。推进无监督网络模型在超分辨显微成像领域的进一步应用,降低模型训练的高分辨率图像需求,同时增强网络鲁棒性,也可以借鉴迁移学习的方法,将在一个样本上学到的特征映射迁移到另一个相关任务上,使得网络适用于不同的应用场景。4) 提高模型的可解释性。通过可解释性机制,深度学习模型的决策过程更加透明。采用可视化技术、注意力机制和可解释性网络设计等方法,使用户可以更清晰地了解到模型网络的机制,提高网络的可信度。

综上所述,深度学习目前已经在超分辨显微成像领域取得了诸多优秀的成果,尽管其仍存在一定的问題,但可以预见的是,随着深度学习理论进一步完善以及实践的不断进步,这些问题将被逐步解决,深度学习技术将大力推动着超分辨显微成像技术的持续进步,创造更多优秀的成果!

## 参 考 文 献

- [1] Chen X D, Zou C L, Gong Z J, et al. Subdiffraction optical manipulation of the charge state of nitrogen vacancy center in diamond[J]. *Light: Science & Applications*, 2015, 4(1): e230.
- [2] Yang T J, Luo Y R, Ji W, et al. Advancing biological super-resolution microscopy through deep learning: a brief review[J]. *Biophysics Reports*, 2021, 7(4): 253-266.
- [3] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-795.
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] Chen C H, Wang F, Wen S H, et al. Multi-photon near-infrared emission saturation nanoscopy using upconversion nanoparticles[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3290.
- [6] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [7] Liu Y T, Wang F, Lu H X, et al. Super-resolution mapping of single nanoparticles inside tumor spheroids[J]. *Small*, 2020, 16(6): e1905572.
- [8] Liu Y T, Wen S H, Wang F, et al. Population control of upconversion energy transfer for stimulation emission depletion nanoscopy[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(20): e2205990.
- [9] Cao Y Y, Li X P, Gu M. Super-resolution nanofabrication with metal-ion doped hybrid material through an optical dual-beam approach[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 105(26): 263102.
- [10] Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton G E. ImageNet classification with deep convolutional neural networks[J]. *Communications of the ACM*, 2017, 60(6): 84-90.
- [11] Friedrich M, Gan Q, Ermolayev V, et al. STED-SPIM: stimulated emission depletion improves sheet illumination microscopy resolution[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(8): L43-L45.
- [12] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-Net: convolutional networks for biomedical image segmentation [M]//Navab N, Hornegger J, Wells W M, et al. Medical image computing and computer-assisted intervention-MICCAI 2015. Lecture notes in computer science. Cham: Springer, 2015, 9351: 234-241.
- [13] He K M, Zhang X Y, Ren S Q, et al. Deep residual learning for image recognition[C]//2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), June 27-30, 2016, Las Vegas, NV, USA. New York: IEEE Press, 2016: 770-778.
- [14] Ren S Q, He K M, Girshick R, et al. Faster R-CNN: towards real-time object detection with region proposal networks[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2017, 39(6): 1137-1149.
- [15] 王佳林, 严伟, 张佳, 等. 受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展[J]. *物理学报*, 2020, 69(10): 108702.
- [16] Wang J L, Yan W, Zhang J, et al. New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(10): 108702.
- [17] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [18] Ebrahimi V, Stephan T, Kim J, et al. Deep learning enables fast, gentle STED microscopy[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 674.
- [19] Li M Z. Deep adversarial network for super stimulated emission depletion imaging[J]. *Journal of Nanophotonics*, 2020, 14(1): 016009.
- [20] 安莎, 但旦, 于湘华, 等. 单分子定位超分辨显微成像技术研究进展及展望(特邀综述)[J]. *光子学报*, 2020, 49(9): 0918001.
- [21] An S, Dan D, Yu X H, et al. Progress and prospect of research on single-molecule localization super-resolution microscopy (invited review) [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2020, 49(9): 0918001.
- [22] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning[J]. *Optica*, 2018, 5(4): 458-464.
- [23] Gaire S K, Zhang Y, Li H Y, et al. Accelerating multicolor spectroscopic single-molecule localization microscopy using deep learning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(5): 2705-2721.
- [24] Möckl L, Roy A R, Petrov P N, et al. Accurate and rapid background estimation in single-molecule localization microscopy using the deep neural network BGNet[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(1): 60-67.
- [25] Kim T, Moon S, Xu K. Information-rich localization microscopy through machine learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1996.
- [26] Jin L H, Liu B, Zhao F Q, et al. Deep learning enables structured illumination microscopy with low light levels and enhanced speed[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1934.
- [27] Shah Z H, Müller M, Wang T C, et al. Deep-learning based denoising and reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy images[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(5): B168-B181.
- [28] Burns Z, Liu Z W. Untrained, physics-informed neural networks for structured illumination microscopy[J]. *Optics Express*, 2023, 31(5): 8714-8724.
- [29] Huang B Y, Li J, Yao B W, et al. Enhancing image resolution of confocal fluorescence microscopy with deep learning[J]. *Photonix*, 2023, 4(1): 2.
- [30] Wang Y F, Kuang C F, Gu Z T, et al. Time-gated stimulated emission depletion nanoscopy[J]. *Optical Engineering*, 2013, 52(9): 093107.
- [31] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [32] Heller I, Sitters G, Broekmans O D, et al. STED nanoscopy combined with optical tweezers reveals protein

- dynamics on densely covered DNA[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(9): 910-916.
- [31] Liu Y T, Zhou J J, Wen S H, et al. On-chip mirror enhanced multiphoton upconversion super-resolution microscopy[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(12): 5514-5519.
- [32] Takasaki K T, Ding J B, Sabatini B L. Live-cell superresolution imaging by pulsed STED two-photon excitation microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 104(4): 770-777.
- [33] Kilian N, Goryaynov A, Lessard M D, et al. Assessing photodamage in live-cell STED microscopy[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(10): 755-756.
- [34] Tortarolo G, Castello M, Diaspro A, et al. Evaluating image resolution in stimulated emission depletion microscopy[J]. *Optica*, 2018, 5(1): 32-35.
- [35] Chen Y I, Chang Y J, Sun Y S, et al. Spatial resolution enhancement in photon-starved STED imaging using deep learning-based fluorescence lifetime analysis[J]. *Nanoscale*, 2023, 15(21): 9449-9456.
- [36] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, et al. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [37] Lew M D, Lee S F, Badieirostami M, et al. Corkscrew point spread function for far-field three-dimensional nanoscale localization of pointlike objects[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(2): 202-204.
- [38] Ji Y H, Chen D N, Wu H Z, et al. Localizing axial dense emitters based on single-helix point spread function and deep learning[EB/OL]. (2024-02-10) [2024-05-06]. <http://arxiv.org/abs/2402.06863v2>.
- [39] Pan W H, Li W, Qu J H, et al. Research progress on organic fluorescent probes for single molecule localization microscopy[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2019, 36: 269-281.
- [40] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [41] Colabrese S, Castello M, Vicidomini G, et al. Machine learning approach for single molecule localisation microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(4): 1680-1691.
- [42] Sahel Y B, Eldar Y. Self-STORM: deep unrolled self-supervised learning for super-resolution microscopy[EB/OL]. (2024-03-25) [2024-05-06]. <http://arxiv.org/abs/2403.16974v1>.
- [43] Li J Y, Tong G, Pan Y N, et al. Spatial and temporal super-resolution for fluorescence microscopy by a recurrent neural network[J]. *Optics Express*, 2021, 29(10): 15747-15763.
- [44] Boyd N, Jonas E, Babcock H, et al. DeepLoco: fast 3D localization microscopy using neural networks[EB/OL]. (2018-02-16) [2024-05-06]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/267096v1>.
- [45] Zelger P, Kaser K, Rossboth B, et al. Three-dimensional localization microscopy using deep learning[J]. *Optics Express*, 2018, 26(25): 33166-33179.
- [46] Speiser A, Müller L R, Hoess P, et al. Deep learning enables fast and dense single-molecule localization with high accuracy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(9): 1082-1090.
- [47] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460-468.
- [48] Isola P, Zhu J Y, Zhou T H, et al. Image-to-image translation with conditional adversarial networks[C]// 2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), July 21-26, 2017, Honolulu, HI, USA. New York: IEEE Press, 2017: 5967-5976.
- [49] Saguy A, Alalouf O, Opatovski N, et al. DBlink: dynamic localization microscopy in super spatiotemporal resolution via deep learning[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(12): 1939-1948.
- [50] Cascarano P, Comes M C, Sebastiani A, et al. DeepCELO for 2D single-molecule localization in fluorescence microscopy[J]. *Bioinformatics*, 2022, 38(5): 1411-1419.
- [51] Nehme E, Freedman D, Gordon R, et al. DeepSTORM 3D: dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 734-740.
- [52] Zhang P Y, Liu S, Chaurasia A, et al. Analyzing complex single-molecule emission patterns with deep learning[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 913-916.
- [53] Hershko E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning[J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6158-6183.
- [54] Jeong D, Kim D. Super-resolution fluorescence microscopy-based single-molecule spectroscopy[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2022, 43(3): 316-327.
- [55] Kim G H, Chung J, Park H, et al. Single-molecule sensing by grating-based spectrally resolved super-resolution microscopy[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2021, 42(2): 270-278.
- [56] Zhang Z Y, Kenny S J, Hauser M, et al. Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 935-938.
- [57] Zhang Z Y, Zhang Y, Ying L, et al. Machine-learning based spectral classification for spectroscopic single-molecule localization microscopy[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(23): 5864-5867.
- [58] Brunstein M, Wicker K, Héroult K, et al. Full-field dual-color 100-nm super-resolution imaging reveals organization and dynamics of mitochondrial and ER networks[J]. *Optics Express*, 2013, 21(22): 26162-26173.
- [59] Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1332-1336.
- [60] Turcotte R, Liang Y J, Tanimoto M, et al. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the

- living brain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(19): 9586-9591.
- [61] Ma Y, Wen K, Liu M, et al. Recent advances in structured illumination microscopy[J]. Journal of Physics: Photonics, 2021, 3(2): 024009.
- [62] Saxena M, Eluru G, Gorthi S S. Structured illumination microscopy[J]. Advances in Optics and Photonics, 2015, 7(2): 241-275.
- [63] Ling C, Zhang C L, Wang M Q, et al. Fast structured illumination microscopy via deep learning[J]. Photonics Research, 2020, 8(8): 1350-1359.
- [64] Qiao C, Chen X Y, Zhang S W, et al. 3D structured illumination microscopy via channel attention generative adversarial network[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2021, 27(4): 6801711.
- [65] Qiao C, Li D, Guo Y T, et al. Evaluation and development of deep neural networks for image super-resolution in optical microscopy[J]. Nature Methods, 2021, 18(2): 194-202.
- [66] Cheng X, Li J, Dai Q, et al. Fast and lightweight network for single frame structured illumination microscopy super-resolution[J]. IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, 2022, 71: 5007711.
- [67] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, et al. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10980.
- [68] Wicker K, Mandula O, Best G, et al. Phase optimisation for structured illumination microscopy[J]. Optics Express, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [69] Delp S L, Anderson F C, Arnold A S, et al. OpenSim: open-source software to create and analyze dynamic simulations of movement[J]. IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering, 2007, 54(11): 1940-1950.
- [70] Chen Y B, Liu Q Q, Zhang J F, et al. Deep learning enables contrast-robust super-resolution reconstruction in structured illumination microscopy[J]. Optics Express, 2024, 32(3): 3316-3328.
- [71] Cao R Z, Chen Y H, Liu W J, et al. Inverse matrix based phase estimation algorithm for structured illumination microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(10): 5037-5051.
- [72] Liao J H, Zhang C S, Xu X C, et al. Deep-MSIM: fast image reconstruction with deep learning in multifocal structured illumination microscopy[J]. Advanced Science, 2023, 10(27): e2300947.
- [73] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [74] Wang H D, Rivenson Y, Jin Y Y, et al. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2019, 16(1): 103-110.