

傅里叶叠层显微成像技术:理论、发展和应用

孙佳嵩^{1,2} 张玉珍² 陈 钱² 左 超^{1,2*}

¹南京理工大学智能计算成像实验室, 江苏 南京 210094

²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

摘要 高分辨率是光学显微技术发展至今不断追求的目标之一。然而随着当前显微镜系统功能与性能的不断革新,高分辨率与大视场难以同时兼顾的问题日益突出,这个问题极大地限制了其在许多领域的应用。傅里叶叠层显微成像技术(FPM)是近年来发展出的一种新型计算成像技术,其能通过同时恢复强度和相位分布来提供宽域高分辨率的成像能力。FPM虽然是在2013年才被提出,但是由于其融合了大视场、高分辨率、定量相位成像等诸多优点,近年来已经在光学显微、生物医学、生命科学等领域获得了大量研究和广泛关注。从基本原理、实验系统与成像模式、系统与算法的改进方法等几个方面对FPM的研究现状、应用领域和最新进展进行了综述,并讨论了现存的一些关键问题以及今后可能的研究方向。

关键词 成像系统; 计算成像; 显微成像; 相位恢复; 图像重建技术

中图分类号 O436 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201636.1011005

Fourier Ptychographic Microscopy: Theory, Advances, and Applications

SunJiasong^{1,2} Zhang Yuzhen² Chen Qian² Zuo Chao^{1,2}

¹Smart Computational Imaging Laboratory, Nanjing University of Science and Technology,
Nanjing, Jiangsu 210094, China

²Jiangsu Key Laboratory of Spectral Imaging & Intelligent Sense, Nanjing University of Science and Technology,
Nanjing, Jiangsu 210094, China

Abstract High resolution is one of the goals that optical microscopy techniques always pursue till now. Despite the current innovations of microscopy systems' functionality and performance, the confliction between high resolution and large field-of-view has become increasingly prominent, limiting its applications greatly in many areas. As a new-type computational imaging method, Fourier ptychographic microscopy (FPM) has been introduced in recent years, which provides a wide-field high-resolution imaging capability by recovering the intensity and phase distributions simultaneously. Although FPM has just been proposed in 2013, it has received extensive attention and researches in the field of optical microscopy, biomedicine, and life sciences because of its large field of view, high resolution, quantitative phase imaging and many other advantages. A review is given to introduce the research status, applications and some recent advances in FPM from its basic principles, experimental systems and imaging modalities, advanced recovery method of system and algorithm. The changeling problems as well as future research directions are also discussed.

Key words imaging systems; computational imaging; microscopy; phase retrieval; image reconstruction techniques

OCIS codes 110.1758; 110.0180; 100.5070; 100.3010

收稿日期: 2016-06-01; **收到修改稿日期:** 2016-08-11

基金项目: 国家自然科学基金(11574152, 61505081)、江苏省“六大高峰”人才项目(2015-DZXX-009)、江苏省“333工程”科研项目(BRA2015294)、江苏省光谱成像智能感知重点实验室开放基金(3092014012200417)、南京理工大学自主科研基金(3092014012200417)、南京理工大学“紫金之星”(第一类)项目

作者简介: 孙佳嵩(1990—),男,博士研究生,主要从事计算显微成像与快速三维传感等方面的研究。

E-mail: sjs0808402013@163.com

导师简介: 陈 钱(1964—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事光谱成像与智能感知等方面的研究。

E-mail: chenqian@njjust.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: surpasszuo@163.com

1 引 言

纵观诺贝尔奖的百年历史,与光学直接或间接相关的奖项已有 40 余项,而其中许多奖项都是与光学显微技术直接相关的。2014 年诺贝尔化学奖授予的超分辨率荧光显微镜^[1],再一次展现了光学显微技术在人类科学发展历程中以及未来科技发展方向上的重要性。尽管近年来显微成像技术已经取得了巨大的进步,但其成像系统的成像机制并没有产生根本性的变革,还是基于传统透镜式成像原理,即所见即所得的成像模式。这种传统成像模式虽然看似简单易行,但仍面临着许多瓶颈问题,对于解决新的应用需求所带来的挑战已显得力不从心。

1) 从成像系统角度看,为了实现高分辨率,必须增加显微物镜的数值孔径(NA),但空间分辨率的提高与视场的扩大往往是一对难以调和的矛盾^[2]。简言之,就是在低倍镜下可以看到被检物体的全貌,换成高倍物镜时,就只能看到被检物体的很小一部分。为解决这一矛盾,常规显微镜系统主要采用精密电动平台实现大范围空域扫描,并通过软件将显微镜下比较小的连续视野区域的图像进行图像拼接融合^[3-4]。然而该方法需要精密的机械扫描部件,因此必须依赖高度复杂的全电动平台显微镜,这也是显微镜系统价格日趋昂贵的主要因素之一。

2) 定量相位成像由于能够提供由样品物理厚度(三维形貌)和折射率系数所决定的定量相位信息,已成为目前最理想的无标记显微成像方法。但一方面,以数字全息为基础的干涉相位断层显微技术并没有撼动传统显微镜在生命科学界的地位,并带来预计的革命性成果和技术变革,究其原因,主要是在于传统干涉测量法依赖高度相干光源的干涉叠加,干涉装置复杂,测量环境要求苛刻,引入的散斑噪声极大地限制了传统干涉测量法在定量相位显微成像领域的应用。另一方面,光强传输方程(TIE)作为最具代表性的非干涉相位恢复方法之一,凭借非干涉方法的诸多优势,近些年来已在国内外得到广泛研究与关注,发展迅速、成果显著。2016 年,左超等^[5]从光强传输方程的基本原理、方程求解、光强轴向微分的差分估计、部分相干成像与光场成像等方面综述了光强传输方程在光学成像领域,特别是在定量相位显微成像领域的研究现状与最新进展。但是由于受到显微物镜的限制,该方法虽然能够实现无标记定量相位测量,但却不能同时获得大视场高分辨率的显微成像结果。

综上,同时实现大视场、高分辨率、定量相位测量是光学显微技术的一项发展目标,而采用常规的光学显微系统显然难以应对这一挑战,因此迫切需要引入新概念、新理论、新方法来推动光学显微技术的变革,最具代表性的就是傅里叶叠层成像技术(FPM)。傅里叶叠层成像技术是近年来发展出的一种大视场高分辨率定量相位计算显微成像技术^[2],该方法整合了相位恢复^[6-12]和合成孔径^[13-21]的概念,与其他相位恢复方法相似,傅里叶叠层成像技术的处理过程也是根据在空域中记录的光强信息和在频域中某种固定的映射关系来进行交替迭代的,特别是该技术借用了合成孔径叠层成像的思想,在传统的傅里叶叠层成像的系统中^[2,22],样品被不同角度的平面波照明并通过一个低数值孔径的物镜进行成像。二维的薄物体由来自不同角度的平面波照明,在物镜后焦面上物体的频谱被平移到对应的不同位置上。因此,一些本来超出物镜数值孔径的频率成分被平移到物镜数值孔径以内,从而能够传递到成像面进行成像。反过来看,不同角度的入射光可等效为在频谱上不同位置的交叠光瞳函数(子孔径),每次通过不同位置子孔径的频谱在频域上形成叠层,之后再利用相机拍摄到的一系列低分辨率图像在频域里迭代,依次更新对应的子孔径里的频谱信息,子孔径与子孔径交叠着扩展了频域带宽并恢复出超过物镜空间分辨率限制的高频信息(合成孔径),最终同时重构出物体的大视场高分辨率光强和相位图像(相位恢复)。这样就实现了使用一个低数值孔径、低放大率物镜,获得大视场和高分辨率的成像结果,最终重构的分辨率取决于频域中合成数值孔径的大小^[23]。

傅里叶叠层成像算法的名字来源于另一个相关的成像技术,叫做 ptychography,也叫做 ptychographical iterative engine (PIE),这里称之为空域叠层成像技术^[24-26]。空域叠层成像技术是一种无透镜相位恢复衍射成像方法,它最初是由 Faulkner 等^[24]在 2004 年实现并用于 X 射线和透射电子衍射显微成像。它用一束聚焦光束照明样品并在远场记录下一幅傅里叶衍射图案,之后机械地横向平移物体让聚焦光束扫描物体的不同位置,从而获得一系列傅里叶衍射图案。这些拍摄到的傅里叶衍射图案被逆衍射传播回物体平面进而恢复样品的复振幅分布。作为一种新近发展的无透镜成像技术,空域叠层成像技术在光学、X 射线和电子束等领域已经得到了广泛关注和大量研究。2016 年,姚玉东等^[27]针对 PIE 空域叠层成像技术进行了详细介绍,

并分析了它的理论背景、发展现状、应用领域以及未来的发展趋势。

显然,空域叠层成像技术和傅里叶叠层成像技术都是以一些低分辨率光强图像为约束,目的是求解出物体的高分辨率复振幅最优解。不同之处在于空域叠层成像每次只扫描物体的一小部分区域,所以是在空域中受到支持域约束,并在频域中进行振幅约束。与空域叠层成像技术相比,傅里叶叠层成像技术使用了物镜进行成像,它将空域和频域中的约束条件进行了互换,即傅里叶叠层成像是空域中利用拍摄到的光强图像进行振幅约束,并在频域中根据物镜的光瞳函数进行支持域约束。作为空域叠层成像技术的傅里叶对偶形式,傅里叶叠层成像技术由此而得名^[2]。

正因为傅里叶叠层成像技术和空域叠层成像技术如此相似^[28],所以已有的空域叠层成像技术的改进优化方法都可以移植到傅里叶叠层成像技术中。比如,空域叠层成像技术中的光瞳波前恢复^[29-30]、三维多层衍射模型^[31-32]、扫描位置误差校正^[33]、稀疏采样原理^[34-35]、非相干混合态^[36]以及信息复用^[37-38]等方法都能直接移植到傅里叶叠层成像实验中,傅里叶叠层成像技术近年来的发展历程就很好地印证了这一点。自从2013年 Zheng 等^[2]提出傅里叶叠层成像技术以来,该技术在成像性能^[39-59]、实现方式^[60-74]、成像模式^[75-80]这三大方面都取得了较大的发展。近年来,本课题组也针对此方向开展了一系列研究工作,针对提高傅里叶叠层成像数据采集效率的问题,提出了使用 Hardamard 编码的傅里叶叠层成像技术^[81-82],按照 Hardamard 编码图案同时点亮几个 LED 单元,以此来减少图像采集的数量。另一方面,为了进一步提高重构精度,降低系统不确定性对结果的影响,对 LED 板在系统中的空间位置建立了模型,并提出了基于模拟退火法和非线性回归法的傅里叶叠层成像定位误差校正算法^[83],实现了在重构迭代过程中准确地校正系统中 LED 的位置误差。此外,还系统地分析了傅里叶叠层成像技术中空域和频域采样率对重构结果的影响^[84],针对不同改进的傅里叶叠层成像技术提出了最优空域采样率和频域子孔径交叠率,为设计傅里叶叠层成像系统和选择最佳的系统参数提供了指导,也为降低图像采集数量、提高实验数据采集速度提供了一条新的思路。

本文系统地回顾傅里叶叠层成像技术的相关研究成果与最新进展,讨论了传统傅里叶叠层成像技术的基本原理、重构过程、它与传统空域叠层成像技术以及部分相干显微成像技术的联系与区别,介绍了各种用来实现傅里叶叠层成像的实验系统以及这些傅里叶叠层成像系统能够实现的多种成像模式,综述近年来为了提高原始傅里叶叠层成像技术的数据采集效率以及重构精度所提出的多种改进方法,总结并讨论了现存的一些关键问题以及今后可能的研究方向。

2 基本原理

傅里叶叠层成像的重构过程是以采集到的低分辨率图像为约束,寻找物体的高分辨率复振幅解的过程。这一过程可以看成是一个优化问题,通过优化使由重构的物体复振幅在迭代过程中计算生成的低分辨率图像与拍摄到的低分辨率图像之差最小。传统的傅里叶叠层成像算法在空域和频域中交替迭代来重建物体高分辨率的复振幅信息,重构过程中利用到了两种约束:1) 在空域中,拍摄到的低分辨率图像被当作最优解的振幅约束;2) 在频域中,物镜受限的相干传递函数(一个圆形的光瞳孔径函数)被当作最优解的频谱支持域约束,并对应不同的照明角度,这个圆形孔径在频谱中扫描层叠合成一个更大的频率通带,从而恢复出物体的高频信息。

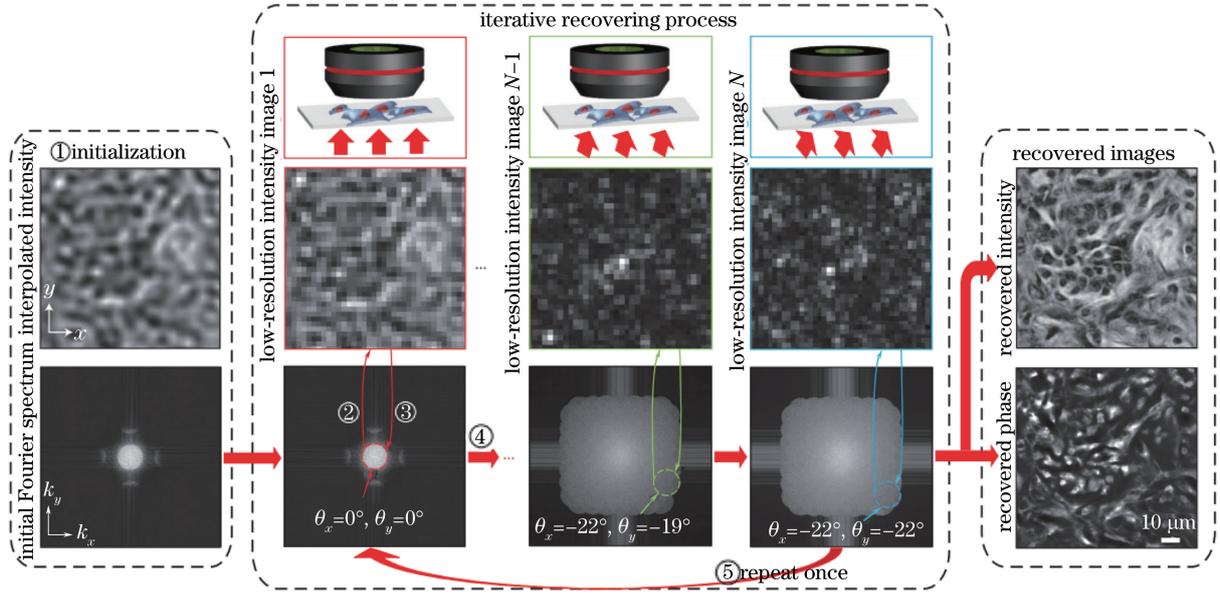
图 1 总结了传统傅里叶叠层成像的重构过程,主要可分为以下 6 步。

1) 在频域里生成一个高分辨率的初始解,为之后的迭代过程作好准备,一般选择垂直入射的平面波所对应的低分辨率图像进行插值作为物体的高分辨率光强图像,而物体的高分辨率相位图一般初始化为零。对物体的高分辨率频谱进行初始化的公式为

$$\mathbf{O}_0 = \mathcal{F}\{B(\mathbf{I}_{0,0})\} P_{u_{0,0}, \nu_{0,0}}, \quad (1)$$

式中 \mathbf{O}_0 为物体初始化的高分辨率频谱, $\mathcal{F}\{\dots\}$ 表示傅里叶变换求频谱, $B(\dots)$ 表示对一幅图像进行双线性插值, $\mathbf{I}_{0,0}$ 为第 0 行第 0 列的 LED 单元垂直照明时拍摄到的低分辨率图像, $P_{u_{0,0}, \nu_{0,0}}$ 为第 0 行第 0 列的 LED 单元对应的频谱里的孔径函数, $(u_{0,0}, \nu_{0,0})$ 表示第 0 行第 0 列的 LED 单元对应的频谱里的孔径中心的频域坐标。

2) 对应某一个入射角度,先利用物镜的圆形光瞳函数截取物体的初始高分辨率频谱中某一子孔径里的

图 1 傅里叶叠层成像的迭代重构流程图^[2]Fig. 1 Flow diagram of iterative reconstruction of Fourier ptychographic microscopy^[2]

频谱信息,生成一个低分辨率复振幅分布,称之为目标复振幅分布。目标复振幅生成公式为

$$\mathbf{O}_{j,m,n}^e(u,\nu) = \mathbf{O}_j(u - u_{m,n}, \nu - \nu_{m,n}) P_j(u,\nu), \quad (2)$$

$$\mathbf{o}_{j,m,n}^e(x,y) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathbf{O}_{j,m,n}^e(u,\nu)\}, \quad (3)$$

式中 $\mathbf{O}_{j,m,n}^e(u,\nu)$ 表示第 m 行第 n 列 LED 对应的频谱, (u,ν) 表示频域坐标, $(u_{m,n}, \nu_{m,n})$ 为第 m 行第 n 列的 LED 单元对应的频谱里的孔径中心的频域坐标, $\mathbf{o}_{j,m,n}^e(x,y)$ 表示第 m 行第 n 列 LED 对应的目标复振幅分布, $\mathcal{F}^{-1}\{\dots\}$ 表示逆傅里叶变换。下标 j 表示第 j 轮迭代,上标 e 表示待更新的目标频谱和目标复振幅。

3) 保持目标复振幅图像的相位不变,用相应照明角度下拍摄到的低分辨率图像去更新目标复振幅图像的振幅部分。复振幅更新公式为

$$\mathbf{o}_{j,m,n}^u(x,y) = \sqrt{I_{m,n}^c(x,y)} \frac{\mathbf{o}_{j,m,n}^e(x,y)}{|\mathbf{o}_{j,m,n}^e(x,y)|}, \quad (4)$$

式中 $\mathbf{o}_{j,m,n}^u(x,y)$ 表示第 m 行第 n 列 LED 对应的更新后的目标复振幅分布, $I_{m,n}^c(x,y)$ 为第 m 行第 n 列的 LED 单元对应的拍摄到的低分辨率图像。上标 u 表示更新后的目标频谱和目标复振幅,上标 c 表示拍摄到的图像。

4) 利用傅里叶变换求出更新后的目标复振幅图像的频谱,并用这个低分辨率频谱去更新物体高分辨率频谱中相应子孔径内的频谱成分。更新公式为

$$\mathbf{O}_{j,m,n}^u(u,\nu) = \mathcal{F}\{\mathbf{o}_{j,m,n}^u(x,y)\} P_j(u,\nu), \quad (5)$$

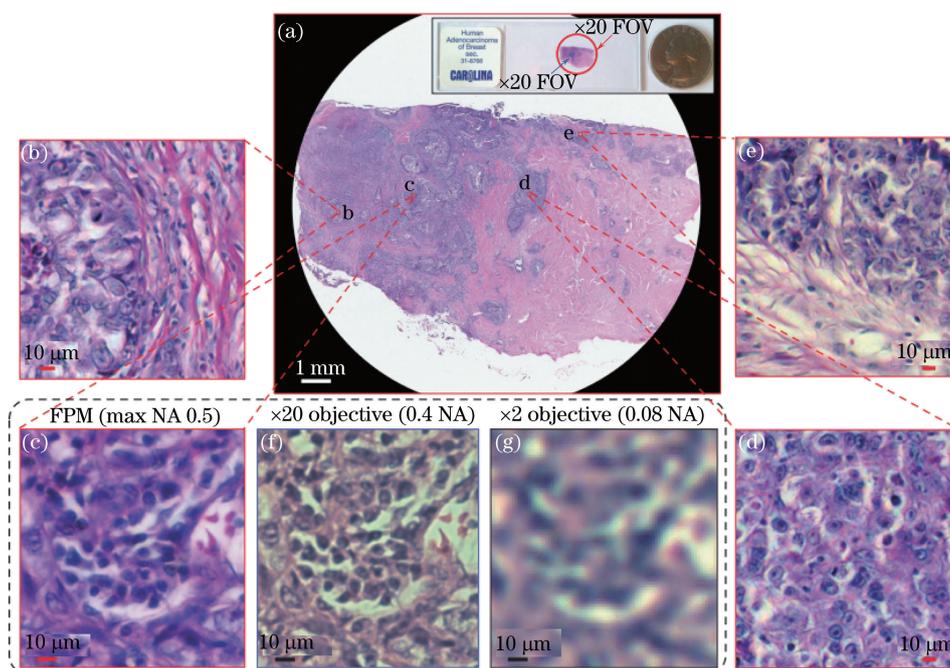
$$\mathbf{O}_j(u - u_{m,n}, \nu - \nu_{m,n}) = \mathbf{O}_j(u - u_{m,n}, \nu - \nu_{m,n}) + \mathbf{O}_{j,m,n}^u(u,\nu) - \mathbf{O}_{j,m,n}^e(u,\nu), \quad (6)$$

式中 $\mathbf{O}_{j,m,n}^u(u,\nu)$ 表示第 m 行第 n 列 LED 对应的更新后的目标复振幅分布的频谱。

5) 如果还有未更新的子孔径信息,则重复迭代 2)~ 4) 来更新其他照明角度所对应的频谱成分。

6) 当所有照明角度都更新过一遍之后,再重复迭代 2)~ 5),直到物体的高分辨率复振幅收敛,从而最终获得高分辨率复振幅最优解。

由此可见,傅里叶叠层成像技术与空域叠层成像技术非常相似,都是以一些低分辨率光强图像为约束,通过迭代的方法求解出物体的高分辨率复振幅最优解。图 2 所示是傅里叶叠层成像对染色细胞切片样品的重构结果,图 2(a)是全视场低分辨率原始图像,图 2(b)~(e)分别是傅里叶叠层成像对不同区域的重构结果图,图 2(f)是使用 20 倍物镜拍摄到的原始图像,图 2(g)是低分辨率图像直接插值放大的效果图。从图 2 中可以看出,使用 0.08 的数值孔径 2 倍放大率的显微物镜,通过傅里叶叠层成像实现了等效合成孔径为 0.5 的分辨率,重构分辨率甚至超过了 0.4 的数值孔径 20 倍放大率的显微物镜的分辨率,而其视场更是远大于 20 倍物镜拍摄到的视场。

图 2 傅里叶叠层成像的重构结果图^[2]Fig. 2 Reconstruction results of Fourier ptychographic microscopy^[2]

值得注意的是,与傅里叶叠层成像技术相比,虽然部分相干显微成像理论上能够达到相同的最高空间频率,但是傅里叶叠层成像技术却能实现更高的对比度和分辨能力。图 3 所示是当使用相同显微物镜时相干显微成像、部分相干显微成像和傅里叶叠层成像的光学传递函数(OTF)和成像结果,图 3(a)是三种成像方式的光学传递函数曲线图,图 3(b)为分辨率板在相干照明下拍摄到的全视场图像,图 3(c)~(e)分别是使用这三种成像方式对同一个分辨率板进行显微成像的实验结果局部放大图(对应图 3(b)的红框区域)。三组实验中使用的同一个 0.4 的数值孔径 20 倍放大率的显微物镜,照明光波长为 633 nm,部分相干照明和傅里叶叠层成像能够达到的最大倾斜照明角度所对应的数值孔径也均为 0.40。图 3(a)中横坐标为横向空间频率,纵坐标为光学传递函数幅度值,红色虚线表示相干照明情况下系统的光学传递函数,即相干传递函数(CTF),绿色虚线表示使用部分相干照明情况下的 OTF,蓝色实线表示傅里叶叠层显微成像的 OTF,记为傅里叶叠层传递函数(FPTF)。由图 3(a)可见,在相干照明情况下可达到的最高空间频率最低,仅为 633 mm^{-1} ,即可分辨的最小线宽为 790 nm,因此在图 3(c)中可以看到最多只能分辨第 9 组第 2 个元素。而使用部分相干照明时,可达到的最高空间频率等于 1266 mm^{-1} ,即理论可分辨的最小线宽为 395 nm,但是此时在可达到的空间频率范围内 OTF 并不是保持为 1,而是随着空间频率的增大而降低,因此使用部分相干照明时图像中高频细节的对比度就会很低,导致拍摄到的图像比较模糊。根据瑞利判据,部分相干照明时可分辨的最小线宽为 $1.22\lambda / (R_{AN,obj} + R_{AN,condenser})$,即 482 nm,因此在图 3(d)中可以看到最多只能勉强分辨第 10 组第 1 个元素。反观傅里叶叠层显微成像的 OTF,在达到相同的最高空间频率 1266 mm^{-1} 的同时,保持了所有空间频率都有最高的对比度,傅里叶叠层显微成像技术能够达到可分辨的最小线宽为 395 nm,因此在图 3(e)中可以看到最多能够分辨第 10 组第 2 个元素,而且相比于图 3(d),图 3(e)中的边缘细节更加锐利清晰。另外值得强调的是,使用 0.1 的数值孔径 4 倍放大率的显微物镜、最高 0.7 的数值孔径的照明光,配合傅里叶叠层显微成像技术同样能够达到 0.8 的合成数值孔径的成像分辨率,但相比于使用 0.4 的数值孔径 20 倍放大率显微物镜、0.4 的数值孔径聚光镜的部分相干成像结果而言,傅里叶叠层显微成像技术不仅能保证较高的对比度(分辨率),同时还将成像视场提高了 25 倍。更重要的是,傅里叶叠层显微成像技术还能同时实现定量相位成像,这是传统明场显微成像难以实现的。

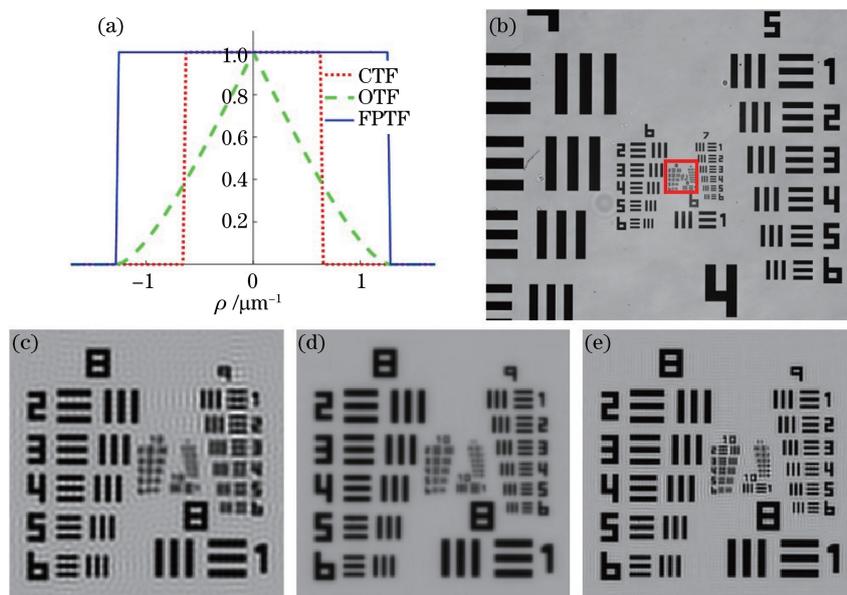


图3 相干显微成像、部分相干显微成像和傅里叶叠层成像的 OTF 和成像结果

Fig. 3 OTF and imaging results of coherent microscopy, partially coherent microscopy and Fourier ptychographic microscopy

3 实验系统与成像模式

在实验系统方面,最常见的傅里叶叠层成像系统是在传统光学显微镜的基础上进行改造的,使用 LED 阵列作为照明光源,例如,2013 年 Zheng 等^[2]搭建了第一套傅里叶叠层成像系统以及 2015 年 Horstmeyer 等^[69]搭建了基于 LED 阵列的傅里叶叠层成像数字化病理分析系统,另外,利用基于 LED 阵列的傅里叶叠层成像系统还可以进行肿瘤细胞计数^[64]和白细胞自动计数^[65]。2016 年, Pacheco 等^[74]搭建了基于 LED 阵列的反射式傅里叶叠层成像系统,实现了对反射样品的大视场快速表面检测。此外,不在传统光学显微镜的基础上进行改造,2014 年, Dong 等^[60]利用手机镜头配合 LED 阵列搭建了一套小型化低成本的傅里叶叠层成像系统,充分利用了傅里叶叠层成像技术的优势,使用低成本光学元件实现了高分辨率成像。除了最常见的基于 LED 阵列的系统,另外两种常见的傅里叶叠层成像系统分别是 2015 年由 Guo 等^[68]搭建了基于 LCD 屏的傅里叶叠层成像系统,以及同年由 Luo 等^[71]搭建了基于傅里叶叠层成像的无透镜片上实验系统。

除了以上三种常见的实验系统以外,2014 年, Dong 等^[61]搭建了基于扫描孔径的傅里叶叠层成像系统,不对照明系统进行改造,转而在成像系统中对光场进行编码调制实现了三维重聚焦和超分辨率成像。在此基础上,2015 年, Xie 等^[72]通过在成像系统中加入一个相位调制器搭建了基于相位调制的扫描孔径傅里叶叠层成像系统,实验结果表明该系统对空间扫描精度以及相机噪声水平的要求得到了降低。利用激光作为照明光源,2014 年, Li 等^[63]搭建了基于傅里叶叠层成像技术的高分辨率全息成像系统。2015 年, Kuang 等^[70]搭建了基于激光照明和数字微镜阵列的傅里叶叠层成像系统。除此而外,借鉴了已有的结构光照明超分辨率荧光显微成像原理^[85-90], Dong 等^[62, 66-67]将结构光照明与傅里叶叠层成像相结合,搭建了非相干荧光成像系统,并以此为基础提出了若干减少图像采集数量和提高重构分辨率的改进方法。2016 年, Chung 等^[73]还搭建了相干荧光成像系统,并利用傅里叶叠层成像技术校正了像差,进一步提高了成像精度。

在成像模式方面,除了上述傅里叶叠层成像系统所能实现的明场和荧光成像模式之外,使用基于 LED 的傅里叶叠层成像系统,还能实现数字重聚焦^[75]、暗场^[75]、三维差分相衬^[76]、定量差分相衬^[79]、快速自动聚焦^[77]等多模式成像^[78]。若使用基于彩色 LCD 屏的傅里叶叠层成像系统,无需对细胞预先进行染色也无需增加任何光学元件,就能通过莱茵伯格显微成像模式轻松实现光学染色,即实现例如彩虹相差、彩虹暗场等多种新型成像模式^[80]。

3.1 基于 LED 阵列的实验系统

传统的傅里叶叠层成像系统使用一个 LED 板作为照明光源,图 4 为一套传统的傅里叶叠层成像系统原

理图。这里使用一个方形的 LED 阵列取代了传统光学显微镜中的光源和聚光镜。LED 阵列中的每一个 LED 单元从不同的角度照射样品,对应每一个照明角度相机拍摄到一幅低分辨率图像,这些图像最终被用来重构一幅高分辨率的复振幅图像。

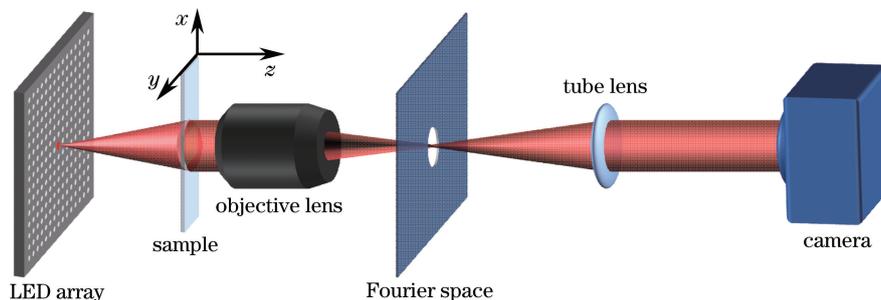


图 4 基于 LED 阵列的傅里叶叠层成像系统

Fig. 4 Fourier ptychographic microscopy system based on LED array

对于这种 LED 阵列照明的傅里叶叠层成像系统需要特别注意两个参数,即频域里相邻两个孔径之间的重叠率以及重叠的均匀性。对于一个方形的 LED 阵列,它在频域中对应于一个桶形的网格。这种采样方式导致了傅里叶叠层成像实现过程中的两个问题:1) 要进行准确的重构就需要拍摄大量的原始低分辨率图像,同时还要保证在频域中至少有 30% 的频谱重叠率;2) 重构过程中可能会产生栅格状误差。为了解决这一问题,Guo 等^[43]设计了一个环状照明的 LED 光源来产生非均匀的采样方式,如图 5 所示。这套系统中,频域的孔径重叠率从中心的 50% 降低到边缘的 15%,在保证重构精度的同时,降低了暗场采集图像的数量,提高了数据采集效率。此外,这种非均匀的照明方式不存在频域采样的平移对称性,因此能够解决重构出的栅格状误差问题。但是环状照明的 LED 分布复杂,不再像 LED 阵列那样规则分布,因此对校正和确定系统中每一个 LED 的位置提出了要求。

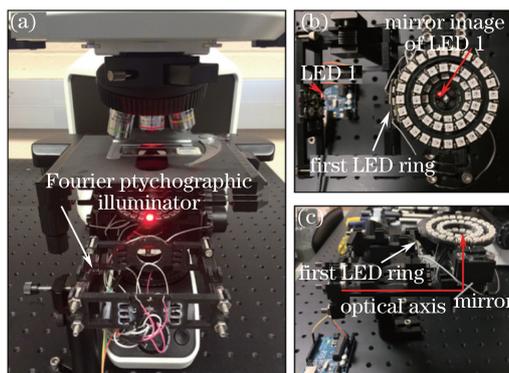


图 5 (a) 基于环状 LED 照明傅里叶叠层成像系统^[43]; (b) 俯视图; (c) 侧视图

Fig. 5 (a) Fourier ptychographic microscopy system based on LED rings^[43]; (b) vertical view; (c) side view

傅里叶叠层成像技术也可以通过使用落射照明系统实现对反射物体的测量。与透射成像系统类似,照明的数值孔径需要超过物镜所能接收的数值孔径,图 6 为 Pacheco 等^[74]设计的反射式傅里叶叠层成像系统原理图。一个 LED 环被安装在物镜的外围,落射照明光经过物体反射之后被物镜所接收。通过使用这种系统,可以实现高速傅里叶叠层暗场成像,即选择性地只拍摄高频分量的那些图像来减少图像采集时间。暗场傅里叶叠层成像技术虽然是明场傅里叶叠层成像技术的一个最直接的扩展,但是其可以在大视场中检测高速样品上的微小细节特征,因此主要应用在表面缺陷检测领域。

3.2 基于 LCD 屏的实验系统

使用 LED 阵列搭建的傅里叶叠层成像系统是一种简单、低成本的实现方案,但是它也有一些缺点:1) LED 照射物体的入射光不是平面波,在重构过程中,需要将样品分成一个个小区域分别进行重构,因为只有这些小区域里的入射光才能近似看成平面波;2) LED 照明的亮度可能随时间改变,这就增加了系统的不确定性因素;3) LED 阵列边缘的那些 LED 单元产生的大角度倾斜照明光的光照利用率很低。

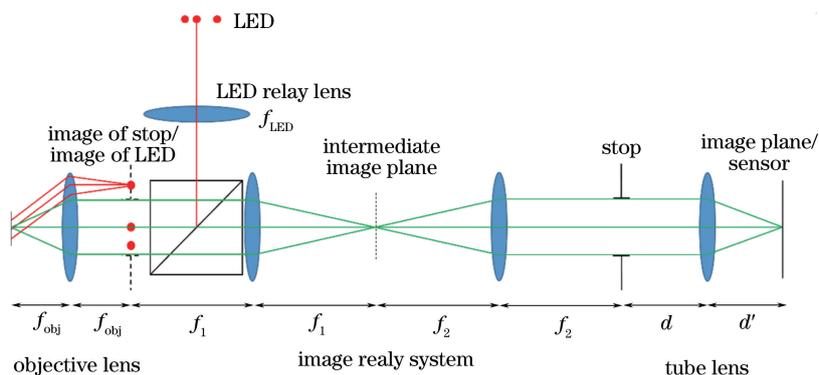


图 6 反射式傅里叶叠层成像系统原理图^[74]

Fig. 6 Schematic diagram of reflective Fourier ptychographic microscopy system^[74]

为了解决这些问题,一个有效的方法就是使用一个 LCD 面板作为照明光源的空间透射率调制器,如图 7 所示,在传统显微镜的聚光镜前焦面插入一块低成本的 LCD 屏,其余的光学系统不需要做任何修改。通过硬件电路控制 LCD 屏使其显示不同的二值图案来满足不同的成像要求。如要实现明场显微成像,只需要在 LCD 屏中央显示一个圆,让圆内的像素的透射率为 1,圆的半径可以根据物镜的数值孔径来确定。如要实现暗场显微成像,只需要显示一个与明场成像相反的圆形图案即可,即保证圆内像素的透射率为 0,并且圆的等效数值孔径要大于物镜的数值孔径。如要实现傅里叶叠层显微成像,只需要在 LCD 屏上显示一个扫描的小孔,然后使用拍摄到的一系列低分辨率图像进行重构即可。除此以外,使用基于彩色 LCD 屏的傅里叶叠层成像系统,无需对细胞预先进行染色也无需增加任何其他光学元件,只需对 LCD 屏进行编码,使其显示特定的彩色图案,就能通过莱茵伯格显微成像模式轻松实现光学染色,即实现例如彩虹相差、彩虹暗场等多种新型成像模式^[79]。

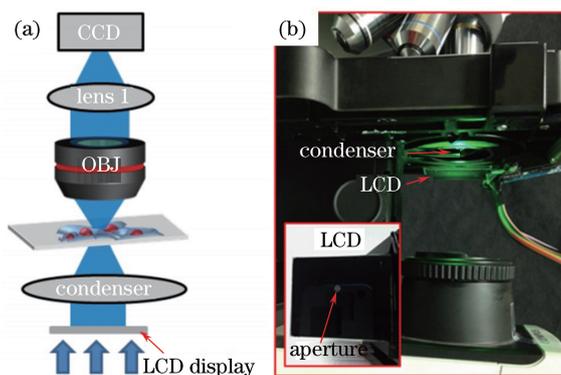


图 7 基于 LCD 屏的傅里叶叠层成像系统。(a) 系统原理图;(b) 系统实物图^[68]

Fig. 7 Fourier ptychographic microscopy system based on LCD screen. (a) System schematic diagram;

(b) picture of the actual system^[68]

傅里叶叠层成像技术不仅可以在照明端进行调控,还可以在成像端进行调控,这时只需要把孔径光阑放在相机成像透镜的前焦面上即可(如果使用显微系统,则把孔径光阑放在物镜的后焦面,即筒镜的前焦面)。孔径光阑在相机成像透镜前焦面上扫描不同位置并记录下相应的低分辨率图像,然后重构出高分辨率图像,这种成像方式称为基于孔径扫描的傅里叶叠层成像技术。在基于孔径扫描的傅里叶叠层成像系统中,可以使用一个机械平移台来扫描孔径光阑,也可以使用一块 LCD 屏对孔径平面的透射光场进行调控。但是, LCD 屏的傅里叶叠层成像技术中存在的一个最大的问题是 LCD 屏的消光比较低,导致基于 LCD 屏的傅里叶叠层成像系统受背景光影响较大,重构质量降低,通常为了提高消光比而选择使用偏振特性更高的 LCD 屏,但并不能完全解决这个问题。

3.3 无透镜片上实验系统

除了上述使用物镜成像的系统以外,傅里叶叠层成像技术还能通过无透镜片上系统实现。在无透镜片

上傅里叶叠层成像系统中,物体紧贴着放在片上成像探测器靶面上,用不同角度的照明光照射样品,与有透镜的傅里叶叠层成像技术类似,重构过程也是在空域和频域来回切换。在空域中,拍摄到的光强图被当作解的振幅约束;在频域,受限的圆形相干传递函数被作为解的支持域约束。只不过在空域和频域来回切换的过程中需要加入一步光场自由空间传播和像素合并的过程,而不像使用透镜的成像系统那样只需要作傅里叶变换即可。一旦恢复了探测器像面的高分辨率复振幅信息,就能把它经过数值衍射计算传播回物面从而得到物体的高分辨率光强和相位分布。无透镜片上傅里叶叠层成像方法系统原理如图 8 所示,与空域叠层成像技术以及有透镜傅里叶叠层成像技术类似,充足的频域孔径交叠率是能否准确重构物体高分辨率复振幅的关键所在。

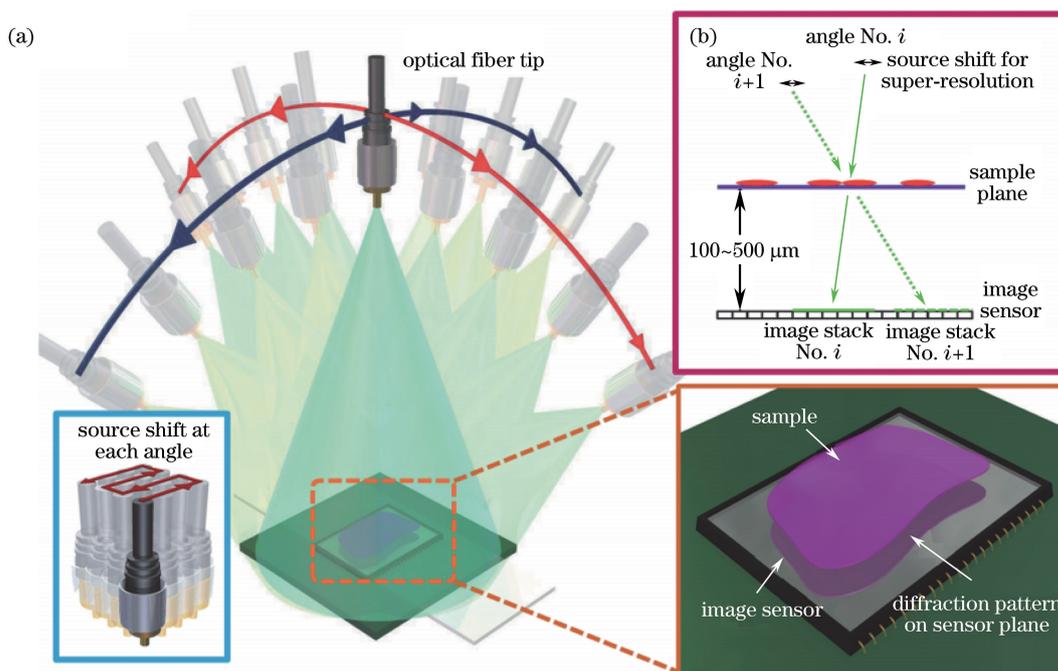


图 8 (a)无透镜片上傅里叶叠层成像系统原理图^[71]; (b)系统侧视图

Fig. 8 (a) Schematic diagram of lensless Fourier ptychographic microscopy system^[71]; (b) side view of the system

4 系统与算法的改进方法

由于传统傅里叶叠层成像技术需要依次点亮每个 LED 单元并拍摄对应的上百幅低分辨率图像,因此需要在图像采集过程中花费大量的时间,数据采集效率偏低,严重限制了其在多个领域中的应用。此外,傅里叶叠层成像系统中存在许多未知系统误差,例如每个 LED 单元照明亮度的不一致、显微物镜的像差、物面聚焦程度等,这些未知系统误差都会影响傅里叶叠层成像重构的图像质量。因此,为了进一步提高其成像性能,国内外许多学者提出了一系列改进方法,这些改进方法主要可以分为两大类:1) 减少低分辨率图像的采集时间,提高系统的数据采集效率;2) 进一步提高傅里叶叠层成像的重构精度和重构分辨率,实现三维的高分辨率复振幅恢复。

4.1 提高数据采集效率的改进方法

总的来说,提高数据采集效率的改进方法可分为两类:1) 减少采集图像的总数量;2) 降低拍摄每一幅图像的总曝光时间。2013 年,Zheng 等^[2]提出傅里叶叠层成像技术,2014 年,Dong 等^[40]将空域叠层成像技术中的稀疏采样原理^[34]移植到了傅里叶叠层成像中,利用掩模排除了过曝光的像素,既保证了重构精度,又解决了原始傅里叶叠层成像技术中需要多次曝光来获得高动态范围原始图像的问题,显著降低了拍摄每幅图像的总曝光时间。此后,Dong 等^[41]又将空域叠层成像技术中的信息复用思想移植到了傅里叶叠层成像中,通过同时点亮几个 LED 单元,用非相干的照明光照射样品,通过迭代重构过程将非相干态分解成多个相干态的组合,进而成倍地减少图像采集的数量,并且使用单色相机实现了白光照明下的彩色傅里叶叠层成

像。与此同时, Tian 等^[42]提出了类似的信息复用方法来提高单色傅里叶叠层成像的图像采集速度,图 9 为 Tian 等^[42]提出的照明角度随机复用的傅里叶叠层成像技术原理图。该方法对 LED 照明单元进行了随机复用编码,即随机同时点亮 N 个 LED,且每次随机点亮的 LED 不重复,因此当所有 LED 都亮过一次时,所拍摄到的图像的数量就比没有信息复用时拍摄到的图像数量少了 N 倍。如图 9 所示,一次同时点亮 4 个 LED,则采集图像的总数就减少了 4 倍,而此时拍摄到的一幅图像也不再对应一个 LED 照明时物体频谱中一个子孔径内的信息,而是对应着物体频谱中 4 个子孔径内的信息的混叠。与空域叠层成像技术类似,非相干混合态照明条件下拍摄到的图像可以在迭代重构过程中分解成 N 个相干态的叠加,然后再随着迭代更新将一幅图像中的 N 个相干态准确分解开来并最终重构出物体大视场高分辨率图像,使用该方法能够减少图像采集数量 4~8 倍。

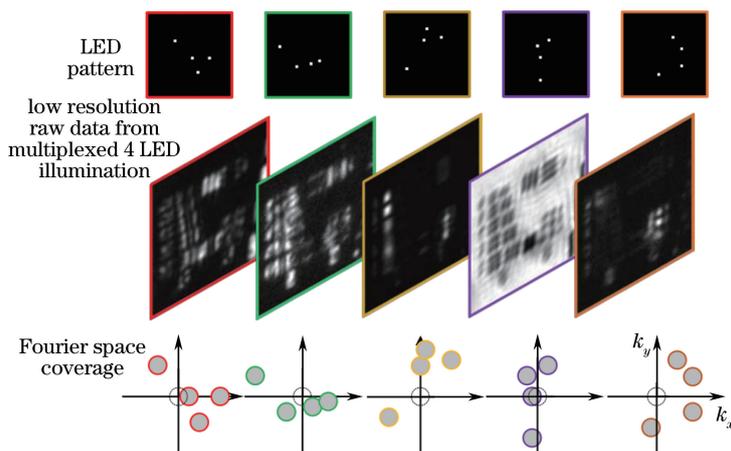


图 9 照明角度随机复用的傅里叶叠层成像技术原理图^[42]

Fig. 9 Schematic diagram of Fourier ptychographic microscopy with random illumination angle multiplexed^[42]

2014 年, Bian 等^[39]根据自然场景图像频谱分布的稀疏性,即整幅频谱的能量主要集中在低频区域这一特性,提出了自适应采集能量大于一定阈值的低频成分对应的图像,舍弃包含信息较少的暗场图像,从而有效地将图像采集效率提高了一倍左右。随后,2015 年, Zhang 等^[45]在自适应傅里叶叠层成像技术的基础上提出了基于自学习方法的傅里叶叠层成像技术,成功地将所需的图像采集数量降低了 70% 以上。在照明系统方面, Guo 等^[43]舍弃了矩形排列 LED 阵列,设计了一套环形 LED 照明装置,通过降低暗场图像所对应频谱的采样密度和提高暗场图像所对应的 LED 照明亮度,有效地将图像采集效率提高了一倍左右。2015 年, Tian 等^[44]将差分相衬成像(DPC)与随机复用编码的傅里叶叠层成像技术结合起来,充分利用了可编程 LED 阵列照明系统的编码特性,使用差分相衬成像方法快速恢复样品的低频成分,并使用复用随机编码的傅里叶叠层成像技术恢复样品的高频成分,从而进一步提高了图像采集效率,实现了大视场高分辨率活细胞动态测量,测量速度可达 1.25 frame/s。图 10 是使用该方法对神经干细胞(NSCs)进行大视场高分辨率快速相位显微测量的实验结果图。图 10(a)是使用该照明编码的傅里叶叠层成像技术拍摄到的原始低分辨率图像以及它们在频域中对应的子孔径的位置,一共拍摄了 4 幅明场 DPC 图像和 17 幅随机复用编码的暗场图像,图像采集总时间约为 0.8 s。图 10(b)为使用 0.1 的数值孔径 4 倍显微物镜重构合成数值孔径达到 0.8 的全视场细胞相位图。图 10(c)为不同时刻对应图 10(b)中绿框区域的局部放大图,上一排为以系统最高帧频 0.8 s 为时间间隔记录下的动态细胞相位图,下一排为以 1 min 为时间间隔记录了 4.5 h 内 4 个时刻的动态细胞相位图。

针对已有的这些基于信息复用的傅里叶叠层成像技术提高数据采集效率的问题,本课题组也进行了系统的研究。2016 年, Sun 等^[83]分析了空域和频域采样率对重构结果的影响,针对不同的改进的傅里叶叠层成像技术提出了最优空域采样率和频域子孔径交叠率,为设计傅里叶叠层成像系统和选择最佳的系统参数提供了指导,也为降低图像采集数量、提高实验数据采集速度提供了一条新的思路。抛弃已有的同时点亮多个 LED 并在迭代算法中分解多相干混合态的过程,转而选择照明角度降采样,即在保证频域孔径交叠率足够的前提下,尽量增大 LED 之间间距,减少点亮 LED 的总个数,然后再一个一个点亮 LED 并使用传统的傅

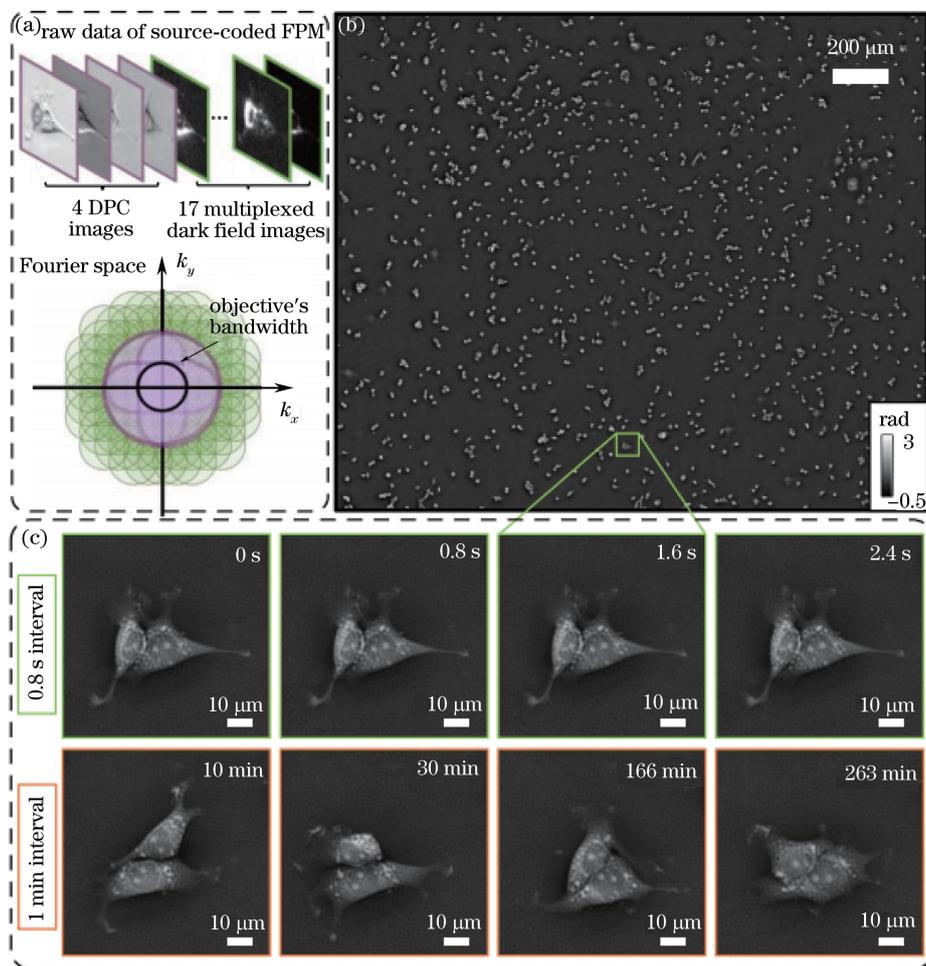


图 10 使用照明编码的傅里叶叠层成像技术对 NSCs 进行大视场高分辨率快速相位显微测量的实验结果图^[44]

Fig. 10 High speed phase microscopy measurement for NSCs with large field of view and high resolution using Fourier ptychographic microscopy with lighting coding^[44]

里叶叠层成像技术进行重构。图 11 是使用照明角度随机复用和照明角度降采样的傅里叶叠层成像技术分别对同一个分辨率板在不同频域子孔径交叠率的情况下获得的实验重构结果。图 11(a1)~(a4)是使用照明角度随机复用的傅里叶叠层成像技术在频域子孔径交叠率为 81.88%的情况下,同时点亮 4, 8, 16, 20 个 LED 获得的重构光强图,图 11(b1)~(b4)是其对应的频谱。随着随机复用 LED 个数的增加,图像重构质量越来越差,恢复的频谱中高频恢复误差也越来越大,这是因为 80%左右的频域孔径交叠率只够支持同时点亮 4~8 个 LED,当同时点亮的 LED 个数继续增加时,混合的相干态将无法在迭代过程中精确分解开,从而导致了高频的重构误差。图 11(c1)~(c4)是使用照明角度降采样的傅里叶叠层成像技术在频域子孔径交叠率分别为 64.18%、47.33%、31.81%、18.17%的情况下获得的重构光强图,图 11(d1)~(d4)是其对应的频谱。可以看到随着频域子孔径交叠率的降低,恢复的频谱中高频恢复误差并不明显,而且只有当频域孔径交叠率低于 30%时,图像重构质量才明显降低。这是因为当相机空间采样率足够,没有出现像素混叠的情况时,只要频域孔径交叠率达到一定阈值,就能非常精确地恢复物体的高分辨率图像,换句话说,傅里叶叠层成像技术对数据的冗余性有一定的要求,只有当原始数据的空间和频域冗余度达到一定阈值以后,才能达到最佳重构质量。纵向比较来看,图 11(a1)~(a4)对应的采集原始图像总数分别为 111, 56, 28, 23 幅,而图 11(c1)~(c4)对应的采集原始图像总数分别为 121, 49, 25, 25 幅,由此可见,在采集相同数量的原始图像时,使用照明角度降采样的傅里叶叠层成像技术能够更精确地恢复物体的高频信息。换句话说,照明角度随机复用的方法本质上并不能减少图像采集数量,因为它需要更高的频域孔径重叠率,即更多的 LED 总量,才能保证同时点亮多个 LED 后精确恢复物体的高分辨率图像。类似地,照明波长随机复用的傅里叶叠层成像技术

本质上同样不能减少图像采集数量,可以选择照明角度降采样的傅里叶叠层成像技术来减少图像采集数量并精确地恢复物体的颜色信息。当然考虑到数据采集速率由图像采集数量和单次曝光时间共同决定,同时点亮多个 LED 的方法可以降低曝光时间,可能更利于实现实时动态傅里叶叠层成像,但必须考虑降低曝光时间以后,原始图像中高斯噪声和泊松噪声对信息复用混合态方法的影响。

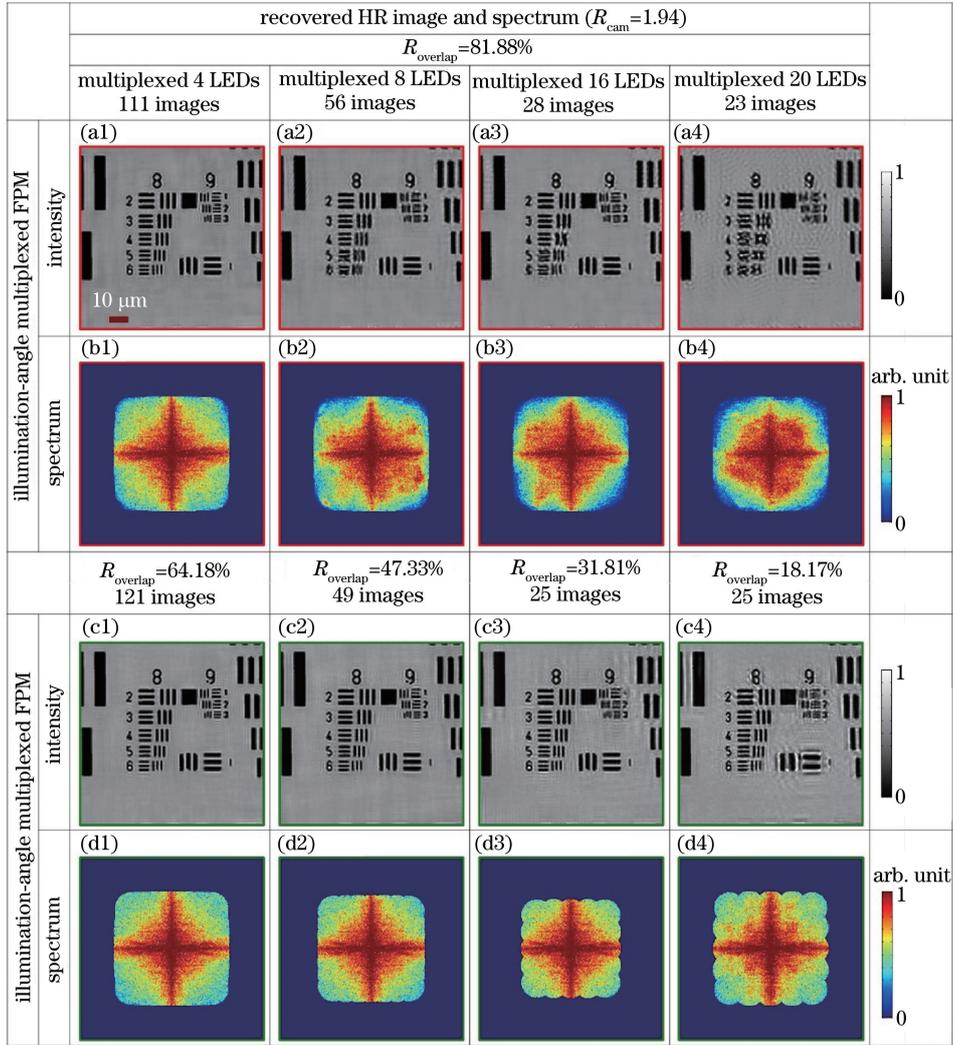


图 11 使用照明角度随机复用和照明角度降采样的傅里叶叠层成像技术分别对同一个分辨率板在不同频域子孔径交叠率的情况下获得的实验重构结果^[84]

Fig. 11 Experimental reconstruction results using the random illumination angle multiplexed and the illumination-angle subsampled Fourier ptychographic microscopy with same resolution plate and different aperture-overlapping-rate respectively^[84]

4.2 提高重构精度的改进方法

为了进一步提高傅里叶叠层成像的重构精度、重构分辨率和重建维度,国内外学者提出了许多改进方法,大致可分成三类:1) 校正系统误差对测量精度的影响;2) 优化迭代更新算法;3) 将二维重构拓展到三维。2013年, Bian 等^[46]提出一种自适应校正傅里叶叠层成像系统未知误差的方法,该方法可以校正每个 LED 单元照明亮度的不确定性、显微物镜像差的不确定性、物面聚焦的不确定性、LED 板与物面间距的不确定性以及照明光波长的不确定性。此后, Ou 等^[49]借鉴了空域叠层成像技术中的光瞳函数波前恢复的思想,提出了在傅里叶叠层成像重构过程中嵌入光瞳函数校正过程的方法,使用该方法能有效地提高重构精度,消除物镜像差带来的影响。类似地, Horstmeyer 等^[47]将这种想法移植到扫描孔径的傅里叶叠层成像系统中,成功地校正了成像透镜的像差畸变。此外, 2014年, Jiang 等^[48]研究了成像系统中色差对迭代重构结果的影响,提出了一种针对彩色傅里叶叠层成像技术的色差校正方法。2015年, 谢宗良等^[55-56]分析了光瞳大小、频

谱采样密度等关键参数对重构精度的影响,并提出了相应的优化策略,进一步提高了重构精度。此外,本课题组也对其进行了针对性的研究,2016年,Sun等^[83]分析了LED板的空间定位误差对重构结果的影响,然后对LED板在系统中的空间位置建立了模型,并提出了基于模拟退火法和非线性回归法的傅里叶叠层成像LED位置校正算法(pcFPM)。该方法在开始迭代更新后,先利用模拟退火法校正频域中每一个LED对应的子孔径中心位置,然后利用LED板的空间位置模型以及非线性回归算法对LED板的定位参数进行更新,最终实现了在重构迭代过程中准确地校正系统中每个LED的位置误差的目的。图12所示是使用传统傅里叶叠层成像和位置校正的傅里叶叠层成像技术对人体肾脏血管细胞切片样品进行成像获得的实验重构结果。图12(a)是相机拍摄到的细胞样品全视场图像,图12(b1)~(b3)分别是视场中一个小区域的直接放大图、使用两种傅里叶叠层成像技术对应的重构结果图,图12(c1)~(c3)分别是视场中另外一个小区域的直接放大图、使用两种傅里叶叠层成像技术对应的重构结果图。对比图12(b2)(b3)和(c2)(c3)可以发现,使用传统傅里叶叠层成像技术获得的重构结果极易受到LED板的空间定位误差的影响,出现大量条纹状的低频重构误差,而使用了傅里叶叠层成像LED位置校正算法以后,完全去除了条纹状的低频重构误差,物体的重构准确度得到了显著提升。因此,傅里叶叠层成像LED位置校正算法能够提高对LED板的空间定位误差的稳健性,有效保证重构精度。

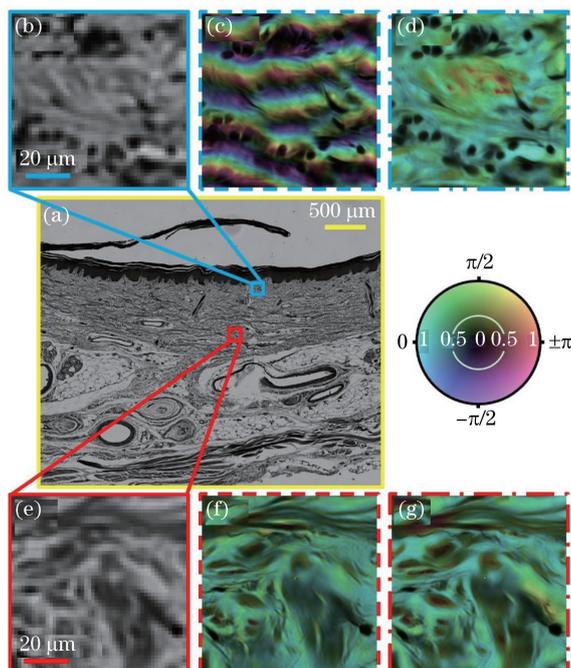


图12 使用传统傅里叶叠层成像和位置校正的傅里叶叠层成像技术对人体肾脏血管细胞切片样品进行重构的实验重构结果^[83]

Fig. 12 Experimental reconstruction results of a human kidney vessel cells sample reconstructed with conventional Fourier ptychographic microscopy and position correction Fourier ptychographic microscopy^[83]

另一方面,为了达到更高的重构分辨率,2015年,Ou等^[53]使用高数值孔径的物镜实现了傅里叶叠层成像并研究了其成像特性,最终使用非油浸物镜实现了油浸物镜才能够达到的超过1的合成数值孔径。之后的一段时间内,根据迭代优化过程的最优化理论,发展出了一系列针对傅里叶叠层成像技术的新迭代优化算法,其中包括Wirtinger Flow优化算法^[50]、凸松弛优化算法(相位提升法)^[51]、非线性优化算法^[59]、全局牛顿优化算法^[57]。Yeh等^[57]还分析了这些新的迭代优化算法与传统的迭代优化算法(包括Gerchberg-Saxton法^[22]和顺序高斯-牛顿法^[43])的优劣性并研究了一些关键参数(例如成像噪声、光瞳像差、LED阵列位置误差等)对傅里叶叠层成像重构精度的影响。他还发现优化算法目标函数的选取对最终成像结果的影响至关重要:基于振幅最优的目标函数与泊松似然率最优目标函数相吻合,在泊松噪声条件下可获得较好的重构结果;而基于光强最优的目标函数与高斯似然率最优目标函数相吻合,在高斯噪声条件下可获得更优的重构信噪比。对于实际傅里叶叠层成像系统而言,大部分暗场图像受泊松噪声影响较大,因此应选择振幅最优作为

目标函数的更新算法以便获得最佳重构质量。2016年, Zuo 等发现顺序迭代的傅里叶叠层成像算法可以看作是一种增量梯度下降优化算法, 其与传统梯度下降算法的最大区别在于前者需要在迭代过程中逐步缩小迭代步长以保证算法能够收敛到全局最优解。基于这个性质, 通过对 Gerchberg-Saxton 引入自适应步长, 不但保持增量梯度法初始迭代时的快速收敛, 而且显著提升了算法对噪声的稳健性。图 13 为对同一组分辨率板的原始图像数据使用多种迭代更新方法进行傅里叶叠层成像的不同重构结果, 可以看出自适应步长法不但给出了低噪声、高分辨的重构结果, 而且相比较之下具有快速收敛、运算量低的优点。

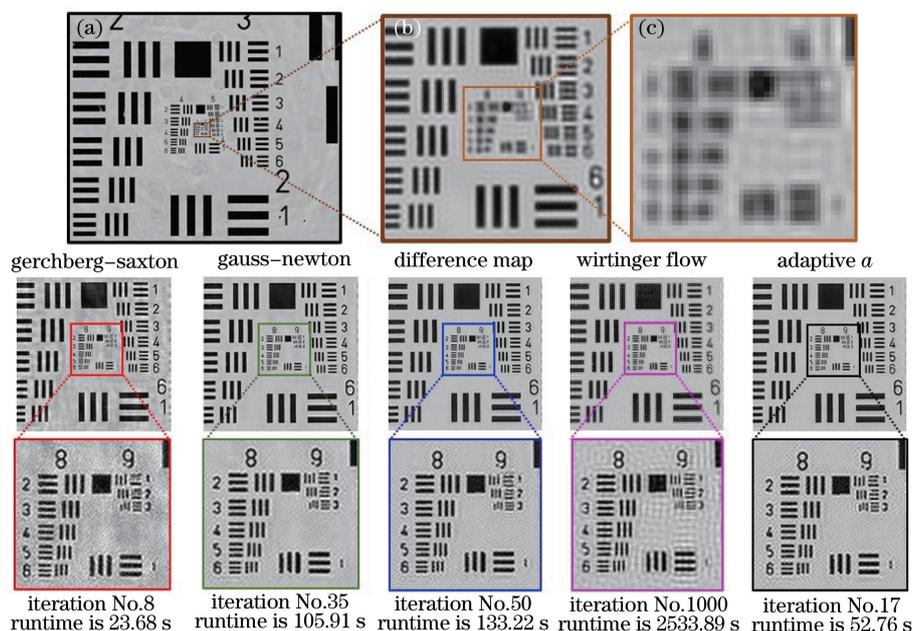


图 13 对同一组分辨率板的原始图像数据使用多种迭代更新方法进行傅里叶叠层成像的不同重构结果^[58]

Fig. 13 Fourier ptychographic reconstruction results of a test object with different algorithms using the same experimental dataset^[58]

此外, 以空域叠层成像技术中的三维多层模型为基础, 结合光场成像理论, 2015年, Tian 等^[54]提出了傅里叶叠层成像的多层模型, 实现了三维高分辨率复振幅测量。随后, Li 等^[52]基于三维多层模型将倾斜照明与传统空域叠层成像的思想结合起来也实现了基于傅里叶叠层成像技术的三维多层成像。

5 结束语

回顾并讨论了近年来傅里叶叠层成像技术的研究现状, 总的来说, 与基于机械扫描和图像拼接的大视场高分辨率光学显微系统以及空域叠层成像技术相比, 傅里叶叠层成像技术具有其特有的优势。

1) 无需任何精密机械扫描装置, 无需进行空域的扫描, 通过在频域里扫描照明孔径, 傅里叶叠层成像技术能够高效地重构一幅分辨率远超过物镜数值孔径限制的高分辨率光强和相位图像。

2) 在傅里叶叠层成像重构过程中, 物镜的像差可以用一个光瞳函数来表示并不断迭代更新, 因此傅里叶叠层成像技术能够数字化地校正许多光学系统未知的像差, 例如最终迭代得出的光瞳函数中有一个二阶因子, 那么它在迭代过程中就补偿了物镜的离焦像差。基于此, 可以大大提高显微系统的轴向聚焦范围。也正因为傅里叶叠层成像重构过程中物镜的像差能够得到准确的补偿, 所以一些成像质量较低的光学系统利用傅里叶叠层成像技术也能大幅提高成像质量, 而基于机械扫描和图像拼接的显微系统则必须使用相对比较昂贵的高质量光学物镜来保证成像质量。

3) 与基于机械扫描和图像拼接的传统明场光学显微系统相比, 傅里叶叠层成像技术最大的优势就在于它不仅能重构样品的高分辨率光强图像, 而且能恢复样品的高分辨率相位分布。而基于机械扫描和图像拼接的传统明场显微系统本身是无法恢复样品的相位信息的, 除非使用该系统配合一些其他的相位恢复方法, 例如基于光强传输方程的非相干定量相位成像技术。

4) 空域叠层成像技术通过逆衍射过程来恢复物面的复振幅信息,这就要求整个光学系统都要保持很高的空间相干性。在傅里叶叠层成像技术中透镜的使用带来了像差,但并不会影响重构图像的准确度,反而还提高了信噪比,降低了对光源相干性的要求。换句话说,空域叠层成像技术要求光源对于整个成像探测器都要保持非常高的空间相干性,而高空间相干性的照明光是较难实现的,且大多用在 X 射线显微成像或电子透射显微成像中。但是傅里叶叠层成像技术只需要在物面上保持点扩展函数尺度的空间相干性即可。虽然目前已有文献证明使用非相干混合态的空域叠层成像技术同样能够精确恢复物面的复振幅信息,但其对光源相干性的要求依旧高于使用非相干混合态的傅里叶叠层成像技术。

5) 一幅图像的傅里叶频谱一般都有很高的动态范围,频谱中心低频成分的幅度一般都是频谱外围高频成分幅度的几千倍以上,零频成分的幅度甚至可以达到上万倍。因此,空域叠层成像系统需要使用一个具有高动态范围(例如 16 bit)的成像探测器来精确拍摄每一幅傅里叶衍射图像。但是傅里叶叠层成像系统直接拍摄空域图像,所以整幅图像的信号强度只会随着照明光入射角度的不同而变化,当入射光角度在物镜数值孔径以内时则为明场图像,而当入射光角度在物镜数值孔径以外时则为暗场图像。针对图像不同的信号强度来设定傅里叶叠层成像系统中的曝光时间,即在成像系统条件受限的情况下,可以使用一个普通动态范围(例如 8 bit)的相机通过提高暗场成像时的曝光时间来精确拍摄暗场图像,而无需担心在提高暗场图像曝光时间的同时出现图像过曝光的情况。当然,为了降低图像噪声并提高图像采集效率,建议使用高信噪比高动态范围的成像探测器以减少暗场成像所需的曝光时间。

虽然近三年来,傅里叶叠层成像技术已在光学显微、生物医学、生命科学等领域取得了丰硕的成果,但其重构结果依然受限于所采集原始图像的图像质量。傅里叶叠层成像技术利用一组低分辨率图像来恢复出一幅高分辨率复振幅图像,如果拍摄到的原始图像存在误差,则傅里叶叠层成像的重构结果必将受到影响。当照明光倾斜角度较大时,拍摄到的是暗场图像。暗场成像时显微物镜能接收到的能量很小,和明场图像相比,暗场图像的动态范围只集中在灰度很小的一段区域,而由于相机的暗电流噪声等多种噪声的综合影响,暗场图像的成像质量一般较差,严重影响傅里叶叠层成像的重构结果。目前常见的解决方法有三个:1) 使用高动态范围、低噪声的相机以保证成像质量;2) 对拍摄到的图像进行预处理,在重构前滤掉一部分噪声,但同时也会滤掉一部分有效信号;3) 改进迭代更新算法,提高其对噪声的稳健性,但这些方法并不能完全解决这个问题。

傅里叶叠层成像技术虽然被证明能够恢复出光瞳函数与显微物镜的像差,但恢复出的物镜像差与物镜实际真实的像差是否精确一致,目前还鲜有文献对此进行定量研究。事实上,傅里叶叠层成像系统中存在的各种微小系统误差,例如每个 LED 单元照明亮度的不一致、相机成像的噪声、小区域内的平面波近似程度等系统未知实验误差都有可能影响最终的重构质量。傅里叶叠层成像迭代过程是一个最优化过程,虽然使用恢复光瞳函数的傅里叶叠层成像迭代算法能够提高重构质量,但是恢复出的光瞳函数到底是物镜像差还是物镜像差与其他多种系统实验误差的混合,这一点仍值得进一步深入研究和探讨。

另外,使用傅里叶叠层成像技术进行大视场高分辨率成像时有一个必要的前提条件,那就是假设待测样品是一个二维薄物体,因为只有对二维薄物体进行倾斜照明时,才相当于平移它的二维频谱,而对于一个三维厚物体,这条性质将不再适用。那么待测样品的厚度到底在多大的范围内才能使用薄物体假设来确保傅里叶叠层成像结果的准确性,换句话说,当待测样品的厚度超过多少时就必须考虑成三维物体了,目前还鲜有文献对此进行定量研究。更进一步,傅里叶叠层成像技术虽然说是个定量相位测量方法,但是用它来进行定量相位测量时相位的精确测量范围到底有多大,弱相位近似和缓变相位近似对定量相位测量精度的影响也并不明了。

除了解决上述关键问题以外,针对尚未成熟的傅里叶叠层显微成像技术,还有几个未来较有前景的研究方向值得进一步研究和拓展。1) 目前傅里叶叠层显微成像技术能够实现的最高合成数值孔径大约为 1.5,但那是在 20 倍物镜下得到的重构结果,因此成像视场缩小了很多。对于使用更低倍率的物镜在保证大视场的前提下,进一步提高最高合成数值孔径至 1.5 以上甚至 1.8,从而实现更高分辨率的大视场光学显微成像,结果目前还未见报道,将是今后一个可能的研究方向。2) 傅里叶叠层显微成像技术需要拍摄大量低分辨率图像来重构一幅高分辨率图像,导致其在实现实时动态测量时有一定困难,目前能够达到的最高帧频仅为

1.25 Hz,有继续改进系统和算法的可能,需要进一步提高照明亮度和光能利用率,努力降低曝光时间和减少图像采集数量,争取实现大视场高分辨率实时动态测量。3)以三维多层模型为基础,结合光场成像的理论,Tian等^[54]提出了傅里叶叠层成像的多层模型,实现了三维高分辨率复振幅的测量,但其本质是将三维厚物体分解成多层二维薄物体的叠加再分别重构每一层的高分辨率复振幅,值得考虑能否将傅里叶叠层成像系统与光学层析成像原理相结合,尝试恢复出物体三维频谱分布,以实现三维精确折射率层析成像。

综上所述,傅里叶叠层显微成像技术是一个极具发展前景的高分辨率计算成像方法。它把高分辨率显微成像中对光学系统较高的硬件需求转化为一个可以通过计算解决的问题,同时还融合了高分辨率、大视场、相位恢复等多项技术优势。可以预见,不止在光学显微和生物医学领域,傅里叶叠层显微成像技术将在其他许多领域取得更加广泛的研究和关注,同时,也必将推动生物医学等诸多领域的进一步发展。

参 考 文 献

- 1 Leung B O, Chou K C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology[J]. *Applied Spectroscopy*, 2011, 65(9): 967-980.
- 2 Zheng G, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739-745.
- 3 Appleton B, Bradley A P, Wildermoth M. Towards optimal image stitching for virtual microscopy[J]. *Proceedings of the Digital Image Computing on Techniques and Applications*, 2006.
- 4 Ma B, Zimmermann T, Rohde M, *et al.* Use of autostitch for automatic stitching of microscope images[J]. *Micron*, 2007, 38(5): 492-499.
- 5 Zuo Chao, Chen Qian, Sun Jiasong, *et al.* Non-interferometric phase retrieval and quantitative phase microscopy based on transport of intensity equation: A review[J]. *Chinese J Lasers*, 2016, 43(6): 0609002.
左 超, 陈 钱, 孙佳嵩, 等. 基于光强传输方程的非干涉相位恢复与定量相位显微成像: 文献综述与最新进展[J]. *中国激光*, 2016, 43(6): 0609002.
- 6 Gonsalves R A. Phase retrieval from modulus data[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1976, 66(9): 961-964.
- 7 Fienup J R. Phase retrieval algorithms: A comparison[J]. *Applied Optics*, 1982, 21(15): 2758-2769.
- 8 Elser V. Phase retrieval by iterated projections[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2003, 20(1): 40-55.
- 9 Candes E J, Eldar Y C, Strohmer T, *et al.* Phase retrieval via matrix completion[J]. *Siam Journal on Imaging Sciences*, 2013, 6(1): 199-225.
- 10 Candes E J, Strohmer T, Voroninski V. Phase lift: Exact and stable signal recovery from magnitude measurements via convex programming[J]. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 2013, 66(8): 1241-1274.
- 11 Candes E J, Li X, Soltanolkotabi M. Phase retrieval via wirtinger flow: Theory and algorithms[J]. *IEEE Transactions on Information Theory*, 2015, 61(4): 1985-2007.
- 12 Waldspurger I, d'Aspremont A, Mallat S. Phase recovery, max cut and complex semidefinite programming [J]. *Mathematical Programming*, 2015, 149(1): 47-81.
- 13 Meinel A B. Aperture synthesis using independent telescopes[J]. *Applied Optics*, 1970, 9(11): 2501-2504.
- 14 Turpin T M, Gesell L H, Lapidis J H, *et al.* Theory of the synthetic aperture microscope[C]. *SPIE*, 1995, 2566: 230-240.
- 15 Jang J S, Javidi B. Three-dimensional synthetic aperture integral imaging[J]. *Optics Letters*, 2002, 27(13): 1144-1146.
- 16 Stern A, Javidi B. 3D computational synthetic aperture integral imaging (COMPSAII) [J]. *Optics Express*, 2003, 11(19): 2446-2451.
- 17 Mico V, Zalevsky Z, Garcia-Martinez P, *et al.* Synthetic aperture superresolution with multiple off-axis holograms[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2006, 23(12): 3162-3170.
- 18 Di J, Zhao J, Jiang H, *et al.* High resolution digital holographic microscopy with a wide field of view based on a synthetic aperture technique and use of linear CCD scanning[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(30): 5654-5659.
- 19 Hillman T R, Gutzler T, Alexandrov S A, *et al.* High-resolution, wide-field object reconstruction with synthetic aperture Fourier holographic optical microscopy[J]. *Optics Express*, 2009, 17(10): 7873-7892.
- 20 Granero L, Micó V, Zalevsky Z, *et al.* Synthetic aperture superresolved microscopy in digital lensless Fourier holography by time and angular multiplexing of the object information[J]. *Applied Optics*, 2010, 49(5): 845-857.
- 21 Gutzler T, Hillman T R, Alexandrov S A, *et al.* Coherent aperture-synthesis, wide-field, high-resolution holographic

- microscopy of biological tissue[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(8): 1136-1138.
- 22 Ou X, Horstmeyer R, Yang C, *et al.* Quantitative phase imaging via Fourier ptychographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(22): 4845-4848.
- 23 Pacheco S, Salahieh B, Milster T, *et al.* Transfer function analysis in epi-illumination Fourier ptychography[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(22): 5343-5346.
- 24 Faulkner H M, Rodenburg J M. Movable aperture lensless transmission microscopy: A novel phase retrieval algorithm [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(2): 023903.
- 25 Rodenburg J M, Hurst A C, Cullis A G, *et al.* Hard-X-ray lensless imaging of extended objects[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 98(3): 034801.
- 26 Rodenburg J M. Ptychography and related diffractive imaging methods[J]. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 2008, 150: 87-184.
- 27 Yao Yudong, Liu Cheng, Pan Xingchen, *et al.* Research status and development trend of PIE imaging method [J]. *Chinese J Lasers*, 2016, 43(6): 0609001.
姚玉东, 刘 诚, 潘兴臣, 等. PIE 成像方法技术现状及发展趋势 [J]. *中国激光*, 2016, 43(6): 0609001.
- 28 Horstmeyer R, Yang C. A phase space model of Fourier ptychographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2014, 22(1): 338-358.
- 29 Maiden A M, Rodenburg J M. An improved ptychographical phase retrieval algorithm for diffractive imaging [J]. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(10): 1256-1262.
- 30 Thibault P, Dierolf M, Bunk O, *et al.* Probe retrieval in ptychographic coherent diffractive imaging [J]. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(4): 338-343.
- 31 Maiden A M, Humphry M J, Rodenburg J M. Ptychographic transmission microscopy in three dimensions using a multi-slice approach[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2012, 29(8): 1606-1614.
- 32 Godden T M, Suman R, Humphry M J, *et al.* Ptychographic microscope for three-dimensional imaging [J]. *Optics Express*, 2014, 22(10): 12513-12523.
- 33 Maiden A M, Humphry M J, Sarahan M C, *et al.* An annealing algorithm to correct positioning errors in ptychography [J]. *Ultramicroscopy*, 2012, 120: 64-72.
- 34 Edo T B, Batey D J, Maiden A M, *et al.* Sampling in X-ray ptychography[J]. *Physical Review A*, 2013, 87(5): 053850.
- 35 Batey D J, Edo T B, Rau C, *et al.* Reciprocal-space up-sampling from real-space over sampling in X-ray ptychography [J]. *Physical Review A*, 2014, 89(4): 043812.
- 36 Thibault P, Menzel A. Reconstructing state mixtures from diffraction measurements[J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 68-71.
- 37 Batey D J, Claus D, Rodenburg J M. Information multiplexing in ptychography[J]. *Ultramicroscopy*, 2014, 138: 13-21.
- 38 Karl R, Bevis C, Lopez-Rios R, *et al.* Spatial, spectral, and polarization multiplexed ptychography[J]. *Optics Express*, 2015, 23(23): 30250-30258.
- 39 Bian L, Suo J, Situ G, *et al.* Content adaptive illumination for Fourier ptychography[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(23): 6648-6651.
- 40 Dong S, Bian Z, Shiradkar R, *et al.* Sparsely sampled Fourier ptychography[J]. *Optics Express*, 2014, 22(5): 5455-5464.
- 41 Dong S, Shiradkar R, Nanda P, *et al.* Spectral multiplexing and coherent-state decomposition in Fourier ptychographic imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(6): 1757-1767.
- 42 Tian L, Li X, Ramchandran K, *et al.* Multiplexed coded illumination for Fourier ptychography with an LED array microscope[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(7): 2376-2389.
- 43 Guo K, Dong S, Nanda P, *et al.* Optimization of sampling pattern and the design of Fourier ptychographic illuminator [J]. *Optics Express*, 2015, 23(5): 6171-6180.
- 44 Tian L, Liu Z, Yeh L-H, *et al.* Computational illumination for high-speed in vitro Fourier ptychographic microscopy[J]. *Optica*, 2015, 2(10): 904-911.
- 45 Zhang Y, Jiang W, Tian L, *et al.* Self-learning based Fourier ptychographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2015, 23(14): 18471-18486.
- 46 Bian Z, Dong S, Zheng G. Adaptive system correction for robust Fourier ptychographic imaging [J]. *Optics Express*, 2013, 21(26): 32400-32410.
- 47 Horstmeyer R, Ou X, Chung J, *et al.* Overlapped Fourier coding for optical aberration removal[J]. *Optics Express*,

- 2014, 22(20): 24062-24080.
- 48 Jiang W, Zhang Y, Dai Q. Multi-channel super-resolution with Fourier ptychographic microscopy[J]. Proceedings of the SPIE, 2014, 9273: 927336.
- 49 Ou X, Zheng G, Yang C. Embedded pupil function recovery for Fourier ptychographic microscopy[J]. Optics Express, 2014, 22(5): 4960-4972.
- 50 Bian L, Suo J, Zheng G, *et al.* Fourier ptychographic reconstruction using Wirtinger flow optimization[J]. Optics Express, 2015, 23(4): 4856-4866.
- 51 Horstmeyer R, Chen R Y, Ou X, *et al.* Solving ptychography with a convex relaxation[J]. New Journal of Physics, 2015, 17(5): 053044.
- 52 Li P, Batey D J, Edo T B, *et al.* Separation of three-dimensional scattering effects in tilt-series Fourier ptychography[J]. Ultramicroscopy, 2015, 158: 1-7.
- 53 Ou X, Horstmeyer R, Zheng G, *et al.* High numerical aperture Fourier ptychography: Principle, implementation and characterization[J]. Optics Express, 2015, 23(3): 3472-3491.
- 54 Tian L, Waller L. 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope[J]. Optica, 2015, 2(2): 104-111.
- 55 Xie Zongliang, Ma Haotong, Ren Ge, *et al.* Research on the key parameters of aperture-scanning Fourier ptychography [J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(10): 1011002.
谢宗良, 马浩统, 任 戈, 等. 小孔扫描傅里叶叠层成像的关键参量研究[J]. 光学学报, 2015, 35 (10): 1011002.
- 56 Xie Z, Ma H, Qi B, *et al.* Pupil-resizing Fourier ptychography[C]. SPIE, 2015, 9795: 979502.
- 57 Yeh L-H, Dong J, Zhong J, *et al.* Experimental robustness of Fourier ptychography phase retrieval algorithms[J]. Optics Express, 2015, 23(26): 33214-33240.
- 58 Zuo C, Sun J, Chen Q. Adaptive step-size strategy for noise-robust Fourier ptychographic microscopy [J]. Optics Express, 2016, 24(18): 20724-20744.
- 59 Zhang Y, Jiang W, Dai Q. Nonlinear optimization approach for Fourier ptychographic microscopy[J]. Optics Express, 2015, 23(26): 33822-33835.
- 60 Dong S, Guo K, Nanda P, *et al.* FP scope: A field-portable high-resolution microscope using a cellphone lens [J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(10): 3305-3310.
- 61 Dong S, Horstmeyer R, Shiradkar R, *et al.* Aperture-scanning Fourier ptychography for 3D refocusing and super-resolution macroscopic imaging[J]. Optics Express, 2014, 22(11): 13586-13599.
- 62 Dong S, Nanda P, Shiradkar R, *et al.* High-resolution fluorescence imaging via pattern-illuminated Fourier ptychography [J]. Optics Express, 2014, 22(17): 20856-20870.
- 63 Li Z, Zhang J, Wang X, *et al.* High resolution integral holography using Fourier ptychographic approach[J]. Optics Express, 2014, 22(26): 31935-31947.
- 64 Williams A, Chung J, Ou X, *et al.* Fourier ptychographic microscopy for filtration-based circulating tumor cell enumeration and analysis[J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(6): 066007.
- 65 Chung J, Ou X, Kulkarni R P, *et al.* Counting White blood cells from a blood smear using Fourier ptychographic microscopy[J]. Plos One, 2015, 10(7): e0133489.
- 66 Dong S, Liao J, Guo K, *et al.* Resolution doubling with a reduced number of image acquisitions[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(8): 2946-2952.
- 67 Dong S, Nanda P, Guo K, *et al.* Incoherent Fourier ptychographic photography using structured light [J]. Photonics Research, 2015, 3(1): 19-23.
- 68 Guo K, Bian Z, Dong S, *et al.* Microscopy illumination engineering using a low-cost liquid crystal display[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(2): 574-579.
- 69 Horstmeyer R, Ou X, Zheng G, *et al.* Digital pathology with Fourier ptychography[J]. Computerized Medical Imaging and Graphics, 2015, 42: 38-43.
- 70 Kuang C, Ma Y, Zhou R, *et al.* Digital micromirror device-based laser-illumination Fourier ptychographic microscopy [J]. Optics Express, 2015, 23(21): 26999-27010.
- 71 Luo W, Greenbaum A, Zhang Y, *et al.* Synthetic aperture-based on-chip microscopy[J]. Light: Science & Applications, 2015, 4(3): e261.
- 72 Xie Z, Ma H, Qi B, *et al.* Aperture-scanning Fourier ptychographic encoding with phase modulation[J]. Chinese Physics Letters, 2015, 32(12): 124203.

- 73 Chung J, Kim J, Ou X, *et al.* Wide field-of-view fluorescence image deconvolution with aberration-estimation from Fourier ptychography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(2): 352-368.
- 74 Pacheco S, Zheng G, Liang R. Reflective Fourier ptychography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(2): 026010.
- 75 Zheng G, Kolner C, Yang C. Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(20): 3987-3989.
- 76 Tian L, Wang J, Waller L. 3D differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an LED array[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(5): 1326-1329.
- 77 Guo K, Liao J, Bian Z, *et al.* Instant scope: A low-cost whole slide imaging system with instant focal plane detection[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(9): 3210-3216.
- 78 Liu Z, Tian L, Waller L. Multi-mode microscopy in real-time with LED array illumination[C]. *Proceedings of the SPIE*, 2015, 9336: 93362M.
- 79 Tian L, Waller L. Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope[J]. *Optics Express*, 2015, 23(9): 11394-11403.
- 80 Zuo C, Sun J, Feng S, *et al.* Programmable colored illumination microscopy (PCIM): A practical and flexible optical staining approach for microscopic contrast enhancement[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 78:35-47.
- 81 Sun J, Chen Q, Zhang Y, *et al.* Optimized multiplexing super-resolution imaging based on a Fourier ptychographic microscope[C]. *Proceedings of the SPIE*, 2015, 9672: 967219.
- 82 Sun J, Zhang Y, Zuo C, *et al.* Coded multi-angular illumination for Fourier ptychography based on Hadamard codes[J]. *Proceedings of the SPIE*, 2015, 9524: 95242C.
- 83 Sun J, Chen Q, Zhang Y, *et al.* Efficient positional misalignment correction method for Fourier ptychographic microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(4): 1336-1350.
- 84 Sun J, Chen Q, Zhang Y, *et al.* Sampling criteria for Fourier ptychographic microscopy in object space and frequency space[J]. *Optics Express*, 2016, 24(14): 15765-15781.
- 85 Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- 86 Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- 87 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.
- 88 Mudry E, Belkebir K, Girard J, *et al.* Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(5): 312-315.
- 89 Wagner O, Schwarz A, Shemer A, *et al.* Superresolved imaging based on wavelength multiplexing of projected unknown speckle patterns[J]. *Applied Optics*, 2015, 54(13): D51-D60.
- 90 Yilmaz H, van Putten E G, Bertolotti J, *et al.* Speckle correlation resolution enhancement of wide-field fluorescence imaging[J]. *Optica*, 2015, 2(5): 424-429.