

长时程双光子成像技术

徐依雯^{1,2}, 张运海^{1*}, 杨皓旻¹, 刘 创^{1,2}, 唐玉国¹

(1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省医用光学重点实验室, 江苏苏州 215163;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 双光子成像(Two-photon Imaging)技术以其优越特性被广泛用于活细胞动态三维成像,但光功率极高的短脉冲光对焦平面荧光分子严重的光漂白极大地影响了双光子长时间成像的图像质量,针对双光子荧光漂白问题,本文提出一种优化光照的双光子(Optimized Lighting-Two Photon, OL-TP)成像技术。通过预扫描获取双光子图像分析高低阈值,以预设的高低阈值为标准优化一幅图像中不同区域的光照时长,利用扫描过程中记录的荧光信息和光照时间信息可以重建OL-TP图像,既保证信噪比又降低荧光漂白。重建的OL-TP图像与传统双光子图像基本一致,信噪比略有降低,但图像并未失真。对110 nm的荧光小球样本分别连续取30幅普通双光子和优化光照的双光子图像,到第30幅图时,重建后的优化光照双光子图像比普通双光子图像荧光漂白降低了28.86%。OL-TP通过优化光照时间大幅降低双光子成像的荧光漂白,使双光子荧光显微镜能够更好地对生物样本进行长时间观测。

关键词: 双光子显微成像; 荧光显微成像; 荧光漂白

中图分类号: O439 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/CO.20181103.0337

Long-time two-photon imaging technology

XU Yi-wen^{1,2}, ZHANG Yun-hai^{1*}, YANG Hao-min¹, LIU Chuang^{1,2}, TANG Yu-guo¹

(1. *Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology (SIBET), Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China;*
2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

* *Corresponding author, E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn*

Abstract: Two-photon imaging technology is widely used for dynamic 3D imaging of live cells due to its superior properties. However, severe photobleaching of fluorescence molecular on focal plane caused by short light pulse with extreme high optical power greatly affects long-term two-photon imaging. This paper proposes a method called Optimized Lighting -Two Photon(OL-TP) for the problem of two-photon fluorescence bleaching. With this method we obtain the high and low thresholds of the two-photon image through pre-scanning, optimize the duration of light in different areas of the image with preset high and low thresholds, and reconstruct the OL-TP image by using the fluorescence information and the illumination time information recorded during

收稿日期: 2018-01-23; **修订日期:** 2018-02-13

基金项目: 国家重点研发计划(No. 2017YFC0110303); 国家重大科研装备研制项目(No. ZDYZ2013-1); 江苏省基础研究计划青年基金项目(No. BK20160363); 苏州应用基础研究计划项目(No. SYG201510)

Supported by National Key R&D Program(No. 2017YFC0110303); National Major Scientific Research and Equipment Development Project(No. ZDYZ2013-1); Youth Foundation of Jiangsu Province Basic Research Program(No. BK20160363); Suzhou Applied Basic Research Project(No. SYG201510)

the scanning. Therefore, both the signal-to-noise ratio and fluorescence bleaching are guaranteed. The reconstructed OL-TP image is almost the same as the conventional two-photon image, though the signal-to-noise ratio is slightly reduced, the image is not distorted. For the 110 nm fluorescent ball samples, 30 normal two-photon images and optimized light two-photon images were successively taken. By the 30th image, the OL-TP imaging technology reduces 28.86% of photobleaching compared with standard two-photon images. All in all, OL-TP greatly reduces the photobleaching of two-photon imaging by optimizing the illumination time, enabling the two-photon fluorescence microscope to better observe biospecimen for long periods of time

Key words: two-photon microscopy imaging; fluorescence microscopy imaging; photobleaching

1 引言

双光子显微镜是非线性光学显微镜中应用最广泛的一种^[1],在双光子荧光显微镜成像时,荧光分子必须同时吸收两个长波长光子才能达到激发态,然后发射出一个波长较短的光子,实现成像^[2],因此双光子成像对激发光的光子密度要求很高,只有焦点及其附近非常小体积内的荧光分子能够被激发,这种激发特性使得双光子具有极高的三维分辨率^[3-4]。由于双光子采用近红外波段的激发光,波长较长,穿透性好,在某些生物样本如血管中成像深度甚至能超过 1 mm^[5],对细胞的光毒性也小,非常适合用来观察活细胞甚至活组织^[6]。双光子显微镜因其低光毒性、大成像深度和高三维分辨率的优势成为生物医学及药学领域重要的研究工具^[7-8],被广泛用于神经、血管以及肿瘤等相关方面的研究^[9-11]。

在双光子显微成像中,虽然长波光的光毒性较弱,光漂白也局限于焦点处,但是由于高数值孔径物镜和窄激光脉宽等原因,聚焦光斑处光功率密度极高,焦平面的荧光分子仍然会发生严重的荧光漂白^[12]。Alexander Hopt 等人的研究表明,激光造成的光损伤与激光脉冲宽度成反比,即激光脉宽越窄,对荧光分子的光损伤越大^[13]。双光子成像为了保证激光光子密度,通常采用飞秒激光器作为光源,脉宽几百飞秒的短脉冲激光会带来非常严重的荧光漂白,影响了双光子长时间成像所取得的荧光图像质量,研究降低双光子成像时荧光漂白的技术显得十分重要。

荧光团发射荧光时必然伴随荧光漂白,漂白过程的快慢及严重程度取决于荧光团本身的光学

化学性质以及光照剂量,从这两点出发,有许多限制光漂白的方法,比如改进培养基以减少背景荧光从而降低激发光强^[14],再比如减少样本氧气含量以减少氧化物的产生,或者添加化学稳定剂提高荧光团抗漂白能力^[15]等。从成像技术角度来说,直接减少光照剂量是缓解荧光漂白问题最直接有效的途径。减少光剂量并不意味着直接降低光强或缩短照明时间,否则无法获取足够的有效荧光信号,所取图像变得模糊。Manders 等人提出一种单光子共聚焦闭环控制技术 CLEM^[16],对不同浓度的荧光团施加不同的光剂量,最大限度降低了单光子共聚焦成像的荧光漂白,但其闭环循环条件是根据多次实验经验得出的,对于不同的样本需要重新实验摸索。

本文提出了一种降低荧光漂白的双光子成像新技术——优化光照的双光子(Optimized Lighting-Two Photon, OL-TP)成像技术。利用预扫描取得的传统双光子图像,分析高低阈值,并以此阈值为标准,优化双光子成像时同一幅图像上不同区域的光照时间,在保证信噪比的同时降低荧光漂白。

2 优化光照的双光子原理与实现方法

2.1 优化光照的原理

双光子成像对激光光子密度要求很高,极高的光子流量大大提高了双光子成像焦点范围内荧光分子与光子发生相互作用的概率^[17]。Patterson 等人的研究表明,双光子激发的荧光漂白率与激发光入射光强成高阶指数关系,而单光子激发的荧光漂白率与入射光强成线性关系,双光子成像对焦平面的荧光漂白远超单光子成像^[18]。以作

用于样本激光功率3~5 mW(生物成像典型光功率)为例,当双光子激光脉宽为150 fs时,对焦平面而言,双光子成像造成的荧光漂白是单光子的10倍^[18]。激发光强和光照时间是双光子荧光漂白的主要影响因素,所以通过优化光照来降低双光子荧光漂白的方法具有很大的可行性。

双光子荧光显微成像系统与共聚焦激光扫描显微镜^[19]类似,属于点扫描成像系统,激光经物镜聚焦后只能激发焦点附近一小片区域的荧光,以焦平面光斑与样本相对位移收集荧光信号并获取图像,常用点扩散函数^[20](Point Spread Function, PSF)描述扫描样本的光斑,其直径可由式(1)计算:

$$d = \frac{1.22\lambda}{NA}. \quad (1)$$

本文实验中使用的激发光波长 $\lambda = 780$ nm,数值孔径 $NA = 1.4$,光斑直径 $d = 660$ nm,根据奈奎斯特采样定律,采样频率达到信号最高频率的两倍才能完整保留原始信号中的信息,实际应用中应大于两倍,所以本文实验中将采样间隔(物方像素尺寸)设为60 nm。由于焦点光斑的直径远大于像素尺寸,光斑停留在某一个像素内时,周围多个像素都处于光斑照射范围内。

传统双光子成像技术,激光光强恒定,成像区域内各点的光照时间完全相同,所以激光强度必须合理设置,既不能太强也不能太弱,太强会使荧光分子密集区域荧光过强,引发荧光饱和以及严重的光漂白,太弱则会使荧光分子稀疏区域荧光过弱,无法在图像上清晰呈现。在长时程成像时,考虑荧光漂白的影响,一般会调整激光强度使细节部分恰好能看清。这就意味着,对荧光分子稀疏区域正合适的光照时间,在荧光分子密集区域会产生过量的荧光信号,在图像上表现为局部高信噪比,如图1(a)所示;而在没有荧光分子的背景区域完全无法获得有效荧光信号,反而对周边在光斑照射范围内的荧光分子造成漂白,如图1(b)所示。

生物样本中荧光分子分布很不均匀,光照时间过剩的情况普遍存在,本文提出的优化光照的双光子成像方法,不改变激光强度,只在无荧光分子的背景区和荧光分子很密的强荧光区减少光照

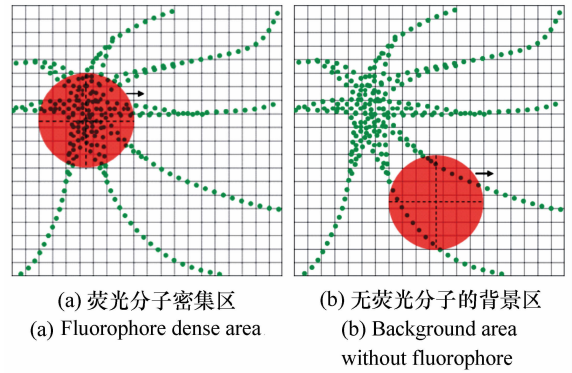


图1 物方像素点扫描示意图

Fig. 1 Spot scanning diagram of objective pixel

时间,从而大幅减少不必要的荧光漂白,同时又保证图像信噪比不会降低太多。

2.2 优化光照的双光子成像技术实现方法

优化光照时间的双光子成像方法基本思想是:分析阈值,以阈值为标准优化各像素光照时间以去除不必要光照。

首先,利用预扫描获取传统双光子图像,分析出高低两个阈值。高阈值是图像上每个像素内荧光信号必须达到的信噪比要求的下限,为了判断出位于荧光分子密集区域的像素而设置的。高阈值计算公式如式(2)所示:

$$I_u = I_{5\% \max} \cdot \frac{T_d}{T_p}, \quad (2)$$

式(2)中, I_u 表示高阈值, $I_{5\% \max}$ 为传统双光子图像中最大5%像素值的均值, T_d 表示判断时间, T_p 表示像素停留时间。

低阈值是噪声信号的上限,为了分辨不产生荧光信号的背景区域像素而设置。低阈值计算公式如式(3)所示:

$$I_l = I_{5\% \min} \cdot \frac{T_d}{T_p} + I_N, \quad (3)$$

式(3)中, I_l 表示低阈值, $I_{5\% \min}$ 为传统双光子图像中最小5%像素值的均值, T_d 表示判断时间, T_p 表示像素停留时间, I_N 为环境噪声最大值。

然后,在每个像素扫描过程中不断读取反馈的像素值,并与阈值比较。根据比较结果优化各像素光照时间。每个像素开始扫描时刻记为0,首次读取反馈的时间称为判断时间,记为 T_d ;扫描光斑中心位置停留在单个像素的时间称为像素

停留时间,记为 T_p ;激光实际保持开启的时间称为像素实际光照时间,记为 T_e 。

当激光开始扫描一个像素,先用一小段时间(判断时间)收集荧光信息,然后开始读取反馈并判断该像素所在区域以及是否需要优化光照时间,如图 2 所示:当反馈小于低阈值,判断该像素位于背景区域,立刻关闭激光;当反馈大于高阈值,判断该像素位于荧光分子密集区域,也立刻关闭激光;当反馈始终在高低阈值之间,判断该像素位于荧光分子稀疏区域,需接受标准时长的光照。

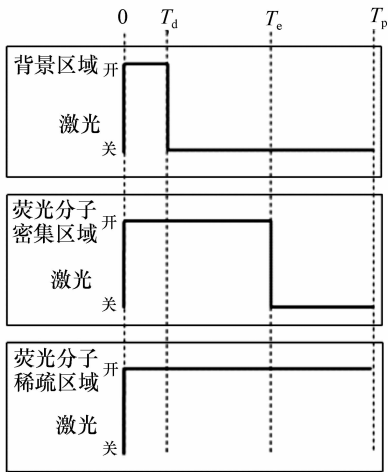


图 2 OL-TP 像素光照时间优化过程示意图

Fig. 2 Diagram of optimized process for pixel lighting time in OL-TP

2.3 优化光照的双光子重建图像

以 OL-TP 方法扫描一幅图像后得到两组数据,一组数据代表了每个像素实际接受光照的时长,另一组数据代表了每个像素实际采集到的像素值。像素值与光照时间成线性关系,如图 3 所示, I 表示过程中像素值(反馈), I_e 表示实际像素值,对应实际光照时间 T_e , I_p 表示若该像素接受全程光照应得的等效像素值,对应像素停留时间 T_p 。

OL-TP 重建图像的原理就是像素值与像素光照时间的线性关系,重建 OL-TP 图像的公式如式(4)所示,

$$I_p(x, y) = I_e(x, y) \times \frac{T_p(x, y)}{T_e(x, y)}, \quad (4)$$

式(4)中, $I_p(x, y)$ 为等效像素值, $I_e(x, y)$ 为实际

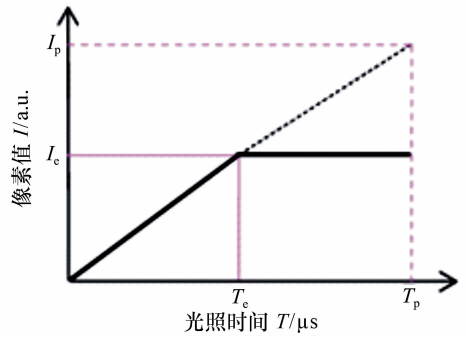


图 3 像素值与像素光照时间关系示意图

Fig. 3 Relationship between pixel value and lighting time

像素值, $T_e(x, y)$ 为像素实际光照时间, $T_p(x, y)$ 为像素停留时间。公式比较抽象,图 4 用一组四像素示意图说明重建过程,假设像素停留时间设为 $200 \mu\text{s}$,判断时间设为 $50 \mu\text{s}$,高阈值设为 100,低阈值设为 5。

图 4(a)代表传统双光子图像,图中的数字表示每个像素接受 $200 \mu\text{s}$ 光照时的像素值;图 4(b)代表像素光照时间分布图,图中的数字表示高阈值设为 100 低阈值设为 5 时,每个像素实际接受光照的时间,单位为 μs ;图 4(c)代表实际像素值分布图,图中数字表示对应图 4(b)中光照时间的实际像素值;图 4(d)代表重建的 OL-TP 图像,图中数字由图 4(b)和图 4(c)根据式(4)计算得到。理想情况下 OL-TP 重建图像与传统双光子图像完全一致。

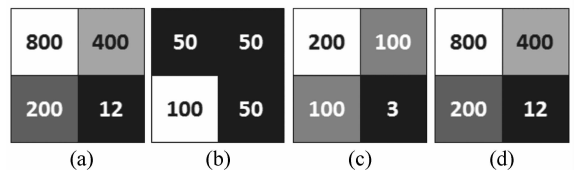


图 4 (a)传统双光子图像;(b)像素光照时间分布图;(c)实际像素值分布图;(d)OL-TP 重建图像

Fig. 4 (a) Conventional two-photon image; (b) distribution of pixel lighting time; (c) distribution of real pixel value; (d) reconstructed image of OL-TP

2.4 优化光照的双光子成像系统

为了实现预设阈值并优化光照时间的功能,

OL-TP 成像系统比传统双光子成像系统增加了两个部分,一块 FPGA (Field Programmable Gate Array) 板配合放大电路构成的反馈电路,以及一个声光调制器 (Acoustic-Optical Modulation, AOM)。AOM 放置在光路中,起到高速开关的作用;反馈电路主体是 FPGA,用作光子计数器,存储高低阈值,编入反馈判断程序,执行比较后根据结果输出信号,控制 AOM 实现激光的开关。探测器采用光子计数型雪崩光电二极管 (APD),型号为 SPCM-AQRH-14-FC。系统结构如图 5 所示。

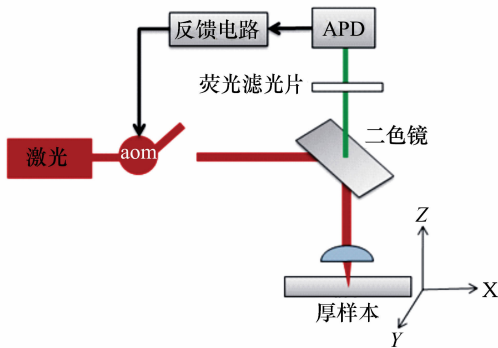


图5 OL-TP 成像系统结构示意图

Fig. 5 Diagram of OL-TP image system

3 优化光照的双光子成像实验

在验证 OL-TP 降漂白效果前,先要验证 OL-TP 重建图像的真实性。图 6(a) 是传统双光子图像,图 6(b) 是在同一区域获得的 OL-TP 重建图像,需要从主观和客观两个角度对重建图像保真程度进行评价^[21]。

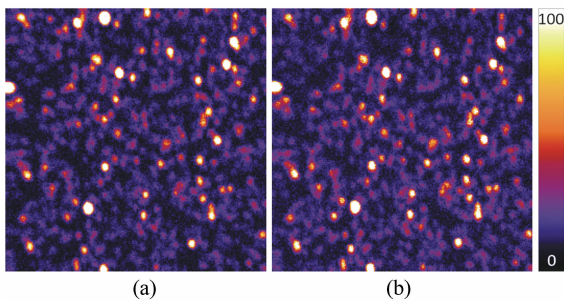


图6 (a)传统双光子图像。(b)OL-TP 重建图像

Fig. 6 (a) Conventional two-photon image. (b) Reconstructed image of OL-TP

主观评价是由人眼对两幅图像进行观察,其结论是这两幅图像相似度很高,差异性很小。客观图像质量评价方法很多,全参考评价方法是其中最可靠的评价方法,以传统双光子图像为参考图像,通过将重建图像与传统双光子图像进行比较来评价重建图像的保真程度^[22]。最简单最高效的全参考评价方法就是峰值信噪比 (PSNR),以参考图像的像素值为信号,待评价图像也就是重建图像与参考图像的像素值差异作为噪声,计算公式如式(3)所示,

$$PSNR = 10 \times \lg \frac{[R(x, y)_{\max} - R(x, y)_{\min}]^2}{\frac{1}{M \times N} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N [R(x, y) - I(x, y)]^2}, \quad (3)$$

式(3)中,图像大小为 $M \times N$, $R(x, y)$ 是参考图像在 (x, y) 处的像素值, $I(x, y)$ 是重建图像在 (x, y) 处的像素值。当峰值信噪比达到 30 dB 以上,可以判断噪声对图像的影响相当小,也就是两幅图像的差异性非常小。以图 6(a) 为参考图像,图 6(b) 的 PSNR 值为 39.93 dB,这说明 OL-TP 重建图像保真程度较高,只是信噪比略有下降,但未对图像质量造成很大影响。

为验证 OL-TP 成像方法降漂白效果,本文设计了一组实验:激发光波长为 780 nm,显微镜物镜前光强为 19 mW,物方像素尺寸为 60 nm,成像区域为 $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$,判断时间为 50 μs ,像素停留时间为 200 μs ,成像区域内共有 250×250 个像素,本文实验中每一行从左向右扫描结束后,位移台会回到最左边再开始扫描下一行,换行时间与扫描时间基本相同,扫描时间加上换行时间即为本文实验中获取一幅完整图像所需时间,约 25 s。用传统双光子和 OL-TP 分别对 110 nm 荧光小球样本连续取 30 幅图像,将两组图的第一幅和最后一幅图在同一标尺下作对比,如图 7 所示。从图 7 可以明显观察到,连续扫描 30 幅图像之后,传统双光子图像大部分区域变得非常暗,而 OL-TP 图像只是整体亮度略有降低,并没有发生明显的光漂白现象。

本文采用的探测器是光子计数型雪崩光电二极管,探测到的光子数代表了荧光强度,在图像上

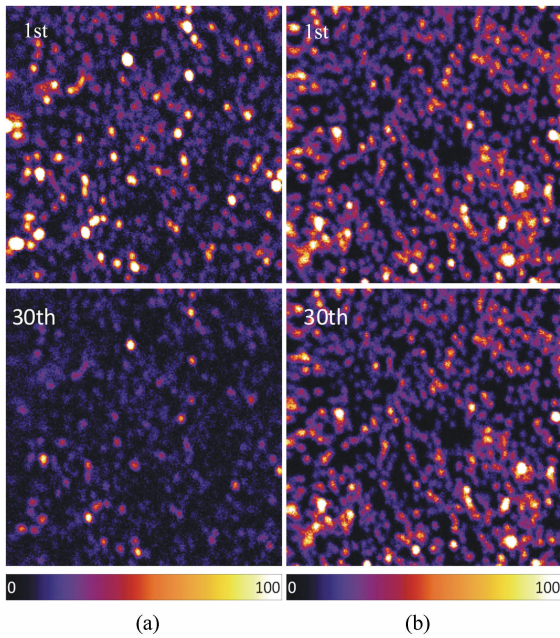


图 7 (a)传统双光子。(b)OL-TP 重建图像

Fig. 7 (a) Conventional two-photon image. (b) Reconstructed image of OL-TP

表现为各像素的像素值。为了定量分析 OL-TP 成像方法降漂白的效果,对一幅图像上所有像素值求和,计算结果代表一幅图的荧光光子总数。

经计算,传统双光子组的第 30 幅图像荧光光子总数为第 1 幅图像的 62.94%,而 OL-TP 组的第 30 幅图像荧光光子总数为第 1 幅图像的 91.8%,证明 OL-TP 成像技术将荧光漂白降低了 28.86%。

4 结 论

本文针对影响双光子显微成像技术长时程观测效果的焦平面荧光漂白问题,提出了一种降低荧光漂白的双光子成像新技术——优化光照的双光子(OL-TP)成像技术,它利用扫描前取得的传统双光子图像,针对成像区域设置阈值,并根据所设阈值优化图像中每个像素接受的光照时间,从而极大地降低双光子成像时对焦平面荧光分子的光漂白。

实验证明,OL-TP 对 110 nm 荧光小球样本连续成 30 幅图像后,整幅图像的荧光漂白相比传统双光子图像降低了 28.86%,证明 OL-TP 成像技术有很好的降漂白效果,它使得双光子显微镜能对成像目标同一深度的平面连续取更多高质量图像,极大地延长了双光子显微镜有观测时程,增强了双光子荧光显微术在长时程观测生物样本方面的优势。

参考文献:

- [1] CRISAFI F, KUMAR V, PERRI A, *et al.*. Multimodal nonlinear microscope based on a compact fiber-format laser source [J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 188: 135-140.
- [2] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, 248 (4951): 73-76.
- [3] 李茜. 飞秒激光双光子荧光生物显微成像研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
LI Q. Femtosecond laser two-photon fluorescence biological microscopy [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014. (in Chinese)
- [4] 李奇峰, 沙乾坤, 王洋, 等. 基于非线性光学的 2PE-STED 显微技术的发展与应用 [J]. *纳米技术与精密工程*, 2015 (2): 81-89.
LI Q F, SHA Q K, WANG Y, *et al.*. Development and application of 2PE-STED microscopy based on nonlinear optics [J]. *Nanotechnology and Precision Engineering*, 2015 (2): 81-89. (in Chinese)
- [5] MILLER D R, JARRETT J W, HASSAN A M, *et al.*. Deep tissue imaging with multiphoton fluorescence microscopy [J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2017, 4: 32-39.
- [6] TSAKANOVA G, ARAKELOVA E, AYVAZYAN V, *et al.*. Two-photon microscopy imaging of oxidative stress in human living erythrocytes [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8 (12): 5834-5846.
- [7] 熊大曦, 刘云, 梁永, 等. 共振扫描显微成像中的图像畸变校正 [J]. *光学精密工程*, 2015, 23 (10): 2971-2979.
XIONG D X, LIU Y, LIANG Y, *et al.*. Correction of distortion in microscopic imaging with resonant scanning [J]. *Opt.*

- Precision Eng.*, 2015, 23(10):2971-2979. (in Chinese)
- [8] 马军, 田玉顺. 双光子荧光影像技术在药物研发中的应用前景[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(3):381-385.
MA J, TIAN Y SH. Application prospect of two-photon fluorescence imaging technology in drug development[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2016, 33(3):381-385. (in Chinese)
- [9] 崔权, 陈忠云, 张智红, 等. 多色双光子成像技术进展[J]. 激光与光电子学进展, 2017(6):10-23.
CUI Q, CHEN ZH Y, ZHANG ZH H, et al. Recent advances in multicolor two-photon imaging technique[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(6):060002. (in Chinese)
- [10] LEFORT C. A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources[J]. *Journal of Physics D Applied Physics*, 2017, 50(42):423001.
- [11] TISCHBIREK C H, BIRKNER A, KONNERTH A. *In vivo* deep two-photon imaging of neural circuits with the fluorescent Ca^{2+} indicator Cal-590[J]. *Journal of Physiology*, 2017, 595(10):3097-3105.
- [12] 夏伟强, 周源, 石明. 双光子显微成像技术的新进展[J]. 中国医疗器械杂志, 2011, 35(3):204-208.
XIA W Q, ZHOU Y, SHI M. Advances in two-photon imaging technology[J]. *Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 2011, 35(3):204-208. (in Chinese)
- [13] HOPT A, NEHER E. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy[J]. *Biophys J*, 2001, 80(4):2029-2036.
- [14] STEPHENS D J, ALLAN V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, 300(5616):82-86.
- [15] STAUDT T, ENGLER A, RITTWEGGER E, et al. Far-field optical nanoscopy with reduced number of state transition cycles[J]. *Optics Express*, 2011, 19(6):5644-5657.
- [16] HOEBE R A, VAN OVEN C H, GADELLA T W J, et al. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging[J]. *Nat. Biotech.*, 2007, 25(2):249-253.
- [17] MONDAL P P, DIASPRO A. Reduction of higher-order photobleaching in two-photon excitation microscopy[J]. *Physical Review E Statistical Nonlinear & Soft Matter Physics*, 2007, 75(6 Pt 1):061904.
- [18] PATTERSON, GEORGE H, DAVID W. Photobleaching in two-photon excitation microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 78(4):2159-2162.
- [19] 张运海, 杨皓旻, 孔晨晖. 激光扫描共聚焦光谱成像系统[J]. 光学精密工程, 2014, 22(6):1446-1453.
ZHANG Y H, YANG H M, KONG CH H. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(6):1446-1453. (in Chinese)
- [20] EGDELING C, WILLIG K I, SAHL S J, et al. Lens-based fluorescence nanoscopy[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2015, 48(2):178-243.
- [21] 张达奇. 全参考图像主观质量客观评价算法研究[D]. 苏州:苏州大学, 2014.
ZHANG D Q. Research on objective algorithms for full-reference image quality assessment[D]. Soochow:Soochow University, 2014. (in Chinese)
- [22] 褚江, 陈强, 杨曦晨. 全参考图像质量评价综述[J]. 计算机应用研究, 2014, 31(1):13-22.
CHU J, CHEN Q, YANG X CH. Review on full reference image quality assessment algorithms[J]. *Application Research of Computers*, 2014, 31(1):13-22. (in Chinese)

作者简介:



徐依雯(1993—),女,江苏泰州人,硕士研究生,2015年于西安交通大学获得学士学位,现为中国科学院苏州生物医学工程技术研究所硕士研究生,主要从事共聚焦激光扫描荧光显微成像方面的研究。E-mail: xuyiwen15@mails.ucas.

edu. cn



张运海(1975—),男,湖北襄阳人,博士,研究员,1998年、2006年于南京航空航天大学分别获得学士、博士学位,主要从事共聚焦显微成像技术、超分辨受激辐射损耗(STED)成像技术等方面的研究。E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn