

# 激光共聚焦序列图像基于特征的分割方法

干 可, 谢 明, 罗代升

(四川大学图像信息研究所 成都 610064)

**【摘要】**采用fluo-4标记的乳鼠心肌细胞钙离子实时激光扫描共聚焦光学切片呈现为点状分布的荧光图像, 并且受到噪声的严重干扰, 细胞荧光图像在分布上没有连续边缘; 而采用处理静态荧光图像的方法处理这种图像存在很大的困难。该文就心肌细胞Ca<sup>2+</sup>离子定量研究过程中遇到的问题, 提出一种基于马尔可夫场和空间点模式特征聚类相似性测度的自适应图像分割算法。该算法能以统一的标准从不同深度的光学切片中分割出需要分析的细胞钙离子活动区域, 对其他利用激光共聚焦技术做动态分析的研究有很好的参考价值。

**关键词** 钙离子; 聚类特征; 激光共聚焦; 自适应图像分割; 空间点模式  
**中图分类号** TP391 **文献标识码** A

## A Segmentation Based on Feature for LSCM Sequence Images

GAN Ke, XIE Ming, and LUO Dai-sheng

(Institute of Image Information, Sichuan University Chengdu 610064)

**Abstract** Region of interest (ROI) plays an important role in biomedical image analysis. The calcium ions laser scanning confocal microscope (LSCM) real-time optical sections of fluo-4 labeled rat ventricular myocyte show point distribution and are interfered by random noise. The fluorescent images have no continuous grayscale distribution and obvious edge. It is difficult to apply the methods which process static fluorescent images to our experiment. A self-adaptive segmentation is proposed based on spatial point pattern cluster features comparability in Markov field. The advantage of this method is that the ROI of calcium within all the disturbed optical sections can be properly segmented under a coincident standard. This method will benefit to other dynamic analysis researches using LSCM.

**Key words** calcium ion; cluster feature; laser scanning confocal microscope; self-adaptive image segmentation; spatial point pattern

共聚焦显微成像技术是近期才发展起来的显微三维成像技术, 应用于细胞生物学、神经学、药理学、遗传学以及材料学等领域<sup>[1]</sup>。激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)具有高灵敏度、高分辨率、高放大倍数等成像特点。通过分析LSCM采集的图像, 可以用图像处理的方法在亚细胞层面上, 对乳鼠心肌细胞动作电位期间的Ca<sup>2+</sup>离子变化过程进行定量研究。

目前, 国内外生物医学图像分割技术已有很多的研究成果, 主要分为计算机自动分割方法和人机结合的交互式分割方法<sup>[2]</sup>。本文提出的方法属于计算机自动分割方法。传统的方法对激光共聚焦静态序列图像, 如细胞骨架等采用已有的多帧叠加去噪和空间滤波的方法, 可以获得较高质量的分割结果。但在本文的研究中, 心肌细胞钙离子动态图像帧间差异较大, 并且受到噪声的严重干扰, 采用现有方

法很难准确地分割出序列图像中钙离子活动的感兴趣区域(ROI), 这对后期心肌细胞Ca<sup>2+</sup>离子定量分析造成不利的影 响。本文就心肌细胞Ca<sup>2+</sup>离子定量研究过程中出现的上述问题, 提出了一种基于点模式特征聚类的图像分割算法。该算法可以从高噪声图像中较为准确的分割出需要分析的钙离子ROI。

### 1 激光共聚焦三维实时序列图像

LSCM钙离子实时图像呈现为点状分布的荧光图像。在以该方式分布的图像中, 可以定义图像空间中的点模式。

定义 图像空间点模式是指激光共聚焦三维实时图像序列中某个二维断层图像上的点集, 有:

$$X = \{(P, R) | P = (x_0, y_0), R < k, k = \max(|x_i - x_0|, |y_i - y_0|)\} \quad (1)$$

收稿日期: 2007-01-28; 修回日期: 2007-05-23

基金项目: 国家自然科学基金(30470491)

作者简介: 干 可(1981-), 博士生, 主要从事生物医学图像处理方面的研究。

式中  $P$  为点集的中心;  $k$  为点集的半径;  $R$  为图像上某点和  $P$  点的 Manhattan 距离,  $i=1,2,\dots,n, k=1,2,\dots, (\text{imagesize}-1)/2$ ,  $\text{imagesize}$  为正方形断层图像的边长。

马尔可夫随机场(Markov random field, MRF)可以用于图像的建模和解释<sup>[3-4]</sup>。对于满足马尔可夫性的图像, 即满足  $f(P|P^C)=f(P|N_r(P))$ , 其中,  $P^C$  为  $P$  点在图像上的补集;  $N_r(P)$  为以  $P$  为中心、 $r$  为半径的邻域, 可以用基于空间点模式的特征进行描述<sup>[5]</sup>。实验结果显示, 点模式的对比度特征、点模式的灰度共生矩阵的能量、点模式的灰度共生矩阵的熵3个特征参量可以较好地描述图像中的点模式。利用这些点模式的特征可以在不进行图像预处理的情况下, 直接将图像中的感兴趣区域的点模式从含有大量噪声的背景图像的点模式中区分开来。点模式的大小可以根据实际情况来决定, 本文选择  $5 \times 5$  的点模式。

## 2 激光共聚焦序列图像的特征提取

### 2.1 图像上细胞的亮度特征

动作电位期间细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度接近峰值时, 图像中细胞和背景之间有较为明显的对比度。可以定义细胞的亮度为: 细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度接近峰值时, 细胞所在区域灰度直方图中高端灰度的概率的和等于  $\eta$  时的灰度值。文献[6]给出类似定义, 即  $B_c = r$  if  $\sum_r^{255} p(g) = \eta$ , 其中,  $p(g)$  为图像的灰度概率密度函数;  $0 < \eta < 1$  为常量。

### 2.2 图像上任意点模式的亮度特征

在确定了细胞的亮度后, 可以用类似的方法确定图像中一个点模式的亮度。定义点模式的亮度为  $B_s = r$  if  $\sum_r^{255} l(h) = \lambda$ , 其中,  $l(h)$  为点模式的灰度概率密度函数;  $0 < \lambda < 1$  为常量。

### 2.3 基于点模式的对比度特征

在本文定义的2个亮度特征的基础上, 可以定义点模式的对比度特征, 该特征定义为  $C=(B_c-B_s)/B_c \times 100\%$ 。实验表明, 该参量对图像中的钙离子ROI和背景有很好的分辨能力, 如图1a所示。该特征在具有较好分类性能的同时, 还具有较好的抗噪声性能。

### 2.4 点模式的灰度共生矩阵

文献[7]提出了灰度共生矩阵(gray level cooccurrence matrix, GLCM)的概念, 它描述了在一定角度上和观测点间隔一定距离的图像像素值的变化情况, 灰度共生矩阵共有14个特征参量。对于满足马尔可夫性的图像, 不需要计算GLCM所有的特征就

可以完整地描述图像中的信息<sup>[8-10]</sup>。本文运用灰度共生矩阵中2个分类性能较好的量化特征参量能量和熵分别计算图像中细胞上的和背景上的空间点模式的特征, 获得了较好的分类效果, 如图1b和图1c所示, 各个特征的范围已经被映射到了  $(0, 255)$ 。在运用灰度共生矩阵计算点模式特征时, 位置算子  $P$  的选取至关重要, 本文采用  $P$  为“与点模式中心相距2个像素的零度方向上”。

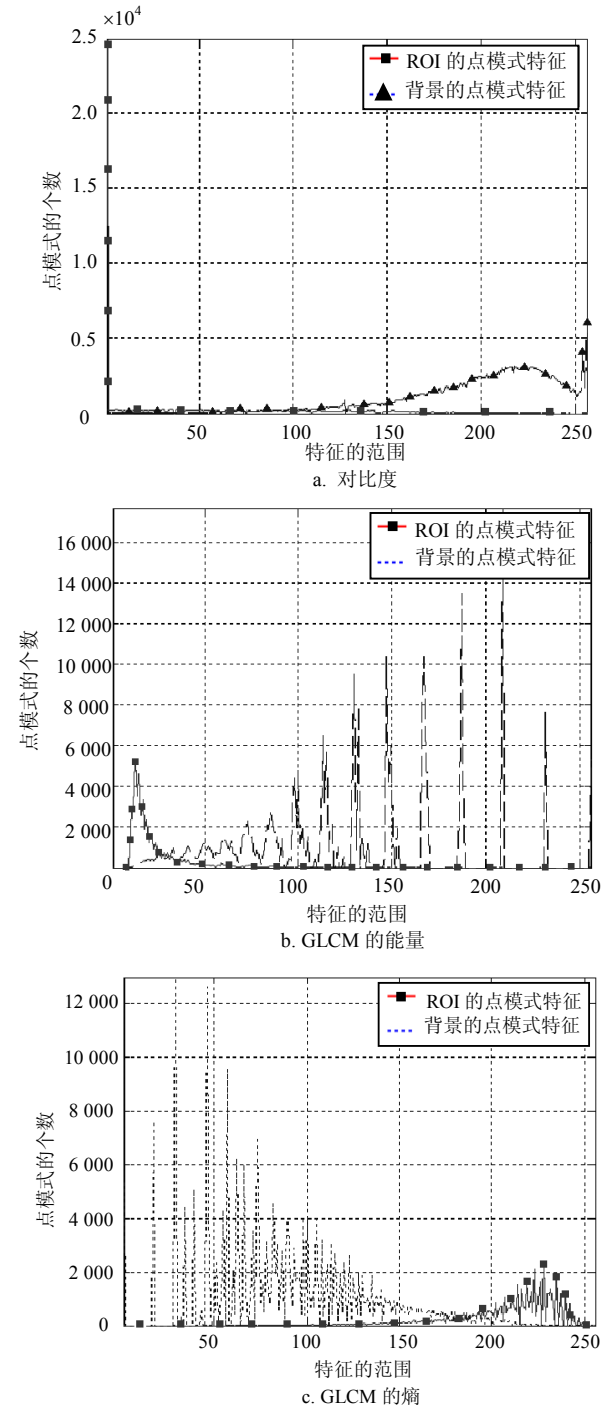


图1 ROI的点模式特征和背景的点模式特征在特征空间的分布

### 3 特征的正交变换

将输入图像的点模式特征作为随机变量,采用霍特林变换去掉特征之间的相关性。本文考虑的随机变量为  $\mathbf{x} = [C, \text{GLCM}_{\text{energy } 0^\circ}, \text{GLCM}_{\text{entropy } 0^\circ}]^T$ ,  $\mathbf{x}$  的均值可以通过  $n$  个样本向量来近似估计:

$$\mathbf{m}_x = E\{\mathbf{x}\} \approx \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbf{x}_i \quad (2)$$

式中  $\mathbf{m}_x = [0 \ 0.050 \ 578 \ 8 \ 3.173 \ 570 \ 0]^T$ 。由  $\mathbf{m}_x$  可以得到  $\mathbf{x}$  的协方差矩阵为:

$$\mathbf{C}_x = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.000 \ 265 \ 689 & -0.002 \ 933 \ 69 \\ 0 & -0.002 \ 933 \ 690 & 0.037 \ 870 \ 80 \end{bmatrix}$$

于是有线性变换  $\mathbf{A}$ , 使  $\text{diag}(\mathbf{C}_x) = \mathbf{A}\mathbf{C}_x\mathbf{A}^T$  成立, 即:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -0.997 \ 0 & -0.077 \ 3 \\ 0 & -0.077 \ 3 & 0.997 \ 0 \end{bmatrix}$$

$$\text{diag}(\mathbf{C}_x) = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.000 \ 038 \ 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0.038 \ 098 \ 0 \end{bmatrix}$$

### 4 相似性特征聚类 and 图像自适应分割

以距离加权作为相似性的衡量标准,将特征参数的不同表征能力体现在模式划分的过程中具有其独特的优越性。可以建立基于特征的滤波函数为:

$$P(x) = \frac{w}{\sqrt{2\pi}} e^{-kF\text{diag}(\mathbf{C}_x)F^T} = e^{-k(x-\mathbf{m}_x)^T \mathbf{A}^T \text{diag}(\mathbf{C}_x) \mathbf{A} (x-\mathbf{m}_x)} \quad (3)$$

式中  $w = \sqrt{2\pi}$ ;  $\mathbf{F} = [\mathbf{A}(x-\mathbf{m}_x)]^T$ 。

在式(3)中,不同的  $k$  值所得到的三维滤波函数是不同的。通过实验发现,当  $k=30$  时,可以在获得较高信噪比的同时保持信号的完整性,故在后续步骤中取  $k=30$ 。

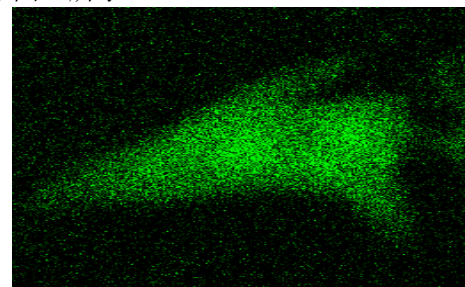
为了进一步提高该滤波函数的分类性能,本文在式(3)的基础上提出一种自适应分割方法,在不显著增加计算复杂度的情况下,实现了基于特征的图像自适应分割。该方法如下:在前面相似性测度的特征聚类的计算基础上,用  $3 \times 3$  的窗口考察图像上的点,设观察窗口的中心点为  $P_0$ ,邻域为  $P_1, P_2, P_3, P_4, P_5, P_6, P_7, P_8$ 。可以定义  $3 \times 3$  的窗口的平均特征聚类相似性为  $P_A = (P_0 + P_1 + \dots + P_8) / 9$ ,  $P_A$  反映了所考察区域位于钙离子 ROI 中的大致可能性。自适应分割的门限定义为:

$$T(x) = 1 - P_A = 1 - \frac{\overline{P(x)}}{1 - e^{-k(x-\mathbf{m}_x)^T \mathbf{A}^T \text{diag}(\mathbf{C}_x) \mathbf{A} (x-\mathbf{m}_x)}} \quad (4)$$

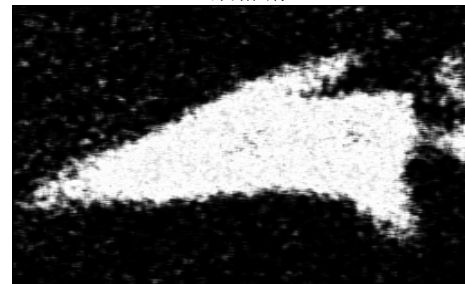
$T(x)$  值通常不需要专门计算,可以在特征相似性计算结果的基础上直接得到,很大程度上减少该算法的计算复杂度,节约了系统资源和计算时间。

### 5 实验与讨论

本文对30多万个采集到的像素点进行分析,发现在相似的实验条件下,心肌细胞钙离子荧光图像在特征空间上具有较好的聚类特性。使用基于特征的滤波方法可以得到一个滤波后的图像,如图2b所示。在特征滤波的基础上应用提出的自适应分割方法,可以准确地分割出需要分析的钙离子 ROI,如图2c所示;并且减少因空间滤波而带来的误差,其对比如图2d所示。



a. 原始图像



b. 基于特征的滤波



c. 自适应分割



d. 均值滤波

图2 实验结果对比

在实际应用时,只需要从光学切片序列中抽出

总荧光强度出现峰值的切片,然后在 $z$ 轴上进行插值,并利用本文提出的方法进行分割,就可以通过采集到的序列图像较为准确地重建出细胞钙离子活动的三维ROI。细胞内钙离子ROI三维重建的结果如图3a和图3b所示。由图可知,本文方法分割的图像基本复原了培养皿中贴壁培养的乳鼠心肌细胞的内部三维形态。

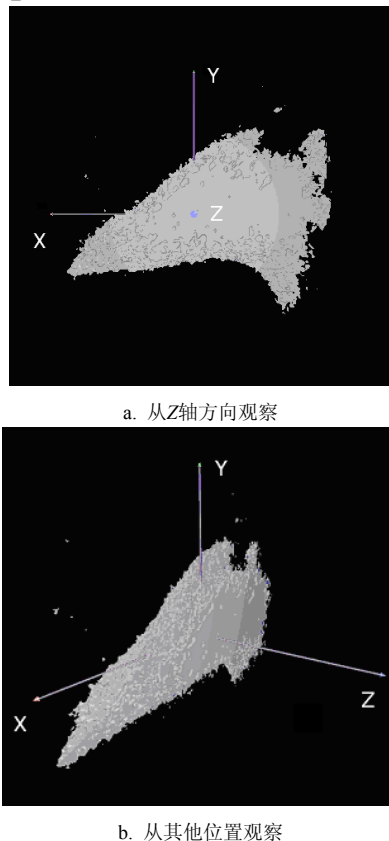


图3 对分割出的序列图像进行三维重建的结果

## 6 结束语

本文研究的生物医学序列图像是活心肌细胞内快速运动的钙离子动态图像,该序列图像的帧间差异较大,采用已有的分割静态图像的方法往往会模糊图像中感兴趣区域的边缘信息,对后期分析造成了较大的误差。因此,本文提出了激光共聚焦序列图像基于特征的分割方法,可以从包含信息最丰富、最容易分割的靠近细胞中部的光学切片上获取特征;并按照上述特征分割靠近细胞两端图像质量较差、荧光强度较弱的切片上的目标,对其他利用激光扫描共聚焦显微镜做动态分析的研究有一定的参考价值。

### 参 考 文 献

[1] 袁 兰. 激光扫描共聚焦显微镜技术教程[M]. 北京: 北

京大学医学出版社, 2004.

YUAN Lan. Guide of laser scanning confocal microscope technique[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2004.

[2] 赵 晖, 鲍 莉, 梁光明, 等. 基于综合灰度共生矩阵的显微细胞图像纹理研究[J]. 自动化应用技术, 2004, 23(10): 27-30.

ZHAO Hui, BAO Li, LIANG Guang-ming, et al. Research on micro-cell image based on synthesized gray level co-occurrence matrix[J]. Techniques of Automation & Applications, 2004, 23(10): 27-30.

[3] MODESTINO J A, ZHANG J. A markov random field model based APP roach to image interpretation[J]. IEEE Tran on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1992, 14(6): 606-615.

[4] KAMATH N, KUMAR K S, DESAI U B. Joint segmentation and image interp retation using hidden Markov models[C]//Proc of the Int Conf on Pattern Recognition. Brisbane. Australia: [s.n.], 1998.

[5] 夏 奇, 史铁林. 基于点模式匹配和能量最小化的模板定位算法[J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(8): 8-9.

XIA Qi, SHI Tie-lin. The algorithm of template local ization based on point pattern matching and energy minimization[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Nature Science Edition), 2004, 32(8): 8-9.

[6] 罗代升, 何小海, 吴小强, 等. 激光共聚焦显微生物医学图像的等高地图分割法[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4): 500-503.

LUO Dai-sheng, HE Xiao-hai, WU Xiao-qiang, et al. A contour map segmentation for laser scanning confocal microscopic biomedical images[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2001, 18(4): 500-503.

[7] HARALICK R M. Statistical and structural approaches to texture[J]. Proceedings of the IEEE, 1979, 67(5): 786-804.

[8] BARALDI A, PARMIGGIANI F. An investigation of the textural characteristics associated with gray level cooccurrence matrix statistical parameters[J]. IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, 1995, 33(2): 293-304.

[9] 郭德军, 宋哲存. 基于灰度共生矩阵的纹理图像分类研究[J]. 林业机械与木工设备, 2005, 33(7): 21-23.

GUO De-jun, SONG Zhe-cun. A study on texture image classifying based on gray-level co-occurrence matrix[J]. Forestry Machinery & Woodworking Equipment, 2005, 33(7): 21-23.

[10] 薄 华, 马缚龙, 焦李成. 图像纹理的灰度共生矩阵计算问题的分析[J]. 电子学报, 2006, 34(1): 155-158.

BO Hua, MA Fu-long, JIAO Li-cheng. Research on computation of GLCM of image texture[J]. Acta Electronica Sinica, 2006, 34(1): 155-158.

编辑 黄 莘