

一种获取细胞免疫信息的图像分析方法*

杨大刚¹⁺, 窦万春¹, 张习文², 蔡士杰¹

¹(南京大学 计算机软件新技术国家重点实验室,江苏 南京 210093)

²(中国科学院 软件研究所 人机交互技术与智能信息处理实验室,北京 100080)

An Image Analysis Method for Acquiring Cell's Immunological Information

YANG Da-Gang¹⁺, DOU Wan-Chun¹, ZHANG Xi-Wen², CAI Shi-Jie¹

¹(State Key Laboratory for Novel Software Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

²(Intelligence Engineering Laboratory, Institute of Software, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

+ Corresponding author: Phn: +86-25-83686399, E-mail: cs_ydg@263.net, http://cs.nju.edu.cn

Received 2004-03-21; Accepted 2004-09-07

Yang DG, Dou WC, Zhang XW, Cai SJ. An image analysis method for acquiring cell's immunological information. *Journal of Software*, 2005,16(9):1551-1559. DOI: 10.1360/jos161551

Abstract: Cell's immunological information is acquired through analyzing color immunofluorescence image. A pixel growing algorithm with dynamic seed values is proposed to extract fluorescent regions in the CIE (L^* , a^* , b^*) uniform color space. Ellipse matching method is proposed to extract cells from the obtained fluorescent regions. Finally antigen information is acquired through computing and decomposing color of the cell with the pre-computation and discretization method. The methods proposed for the acquirement of cell's immunological information are appropriately evaluated. The experiment indicates that acquired the immunological information meets practical medicine analysis.

Key words: color decomposition; ellipse matching; region extraction; cell extraction; image analysis

摘要: 细胞免疫信息在医学和生物学上有着广泛的用途.通过分析彩色免疫荧光图像获此信息.给出一种动态种子值像素生长算法,在均匀颜色空间中提取荧光区域;提出了椭圆匹配方法,从得到的区域中提取细胞;提出了预计算和离散化的方法,计算并分解细胞颜色,以得到免疫信息.讨论了提出的图像分析方法对细胞免疫信息获取的影响.实验表明,获得的免疫信息满足实际医学分析的需要.

关键词: 颜色分解;椭圆匹配;区域提取;细胞提取;图像分析

中图法分类号: TP391 文献标识码: A

细胞免疫信息可用于病毒检测、免疫分型等方面^[1,2],如检测 SARS 病毒,对白血病免疫分型,在医学、生物

* Supported by the National Natural Science Foundation of China under Grant No.60303025 (国家自然科学基金); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China under Grant No.BK2004411 (江苏省自然科学基金)

作者简介: 杨大刚(1977 -),男,安徽桐城人,硕士生,主要研究领域为数字图像处理,图形学;窦万春(1971),男,博士,副教授,主要研究领域为知识网络,认知协作;张习文(1971 -),男,博士,副研究员,主要研究领域为图像处理,手写识别;蔡士杰(1944 -),男,教授,博士生导师,CCF 高级会员,主要研究领域为图形学,图像处理,建筑图纸识别.

学等领域有着广泛的用途.免疫荧光检测技术可以获得细胞免疫信息,但人工检测费时、费力且受主观影响.分析流式细胞仪得到的散射光和荧光参数,也能获得细胞的膜抗原、生化成分等信息,由于细胞位置变动,即便对流式使用过的废液再形态学分析,也不能得到同一细胞的形态信息和免疫信息.图像分析方法能够克服以上两种方法的缺点:细胞涂片免疫荧光染色和瑞氏染色之后放在荧光显微镜下观察,同一视野下切换荧光光源和普通光源,采集得到两幅彩色数字图像,分别用于免疫学和形态学的计算机分析,获得同一细胞的免疫信息和形态信息.这两种信息互为补充,互相印证,对某些细胞的精确分型和疾病的准确诊断有着重大意义.

通过彩色图像分析得到细胞的免疫信息,从背景中提取细胞是其基础,已有较多的方法从灰度免疫荧光图像中提取细胞^[3-8],如流域分割方法^[3]、小波变换方法^[4,5]、神经网络方法^[6]等.以上的研究只使用一种荧光素,荧光素受激发后所发光的亮度信息足以起到指示作用,无须记录颜色信息,这也是以往的研究几乎集中在灰度细胞提取而不是分析彩色免疫荧光图像获取免疫信息的原因.现在通常用多种荧光素对细胞涂片免疫荧光染色,通过不同颜色的标记作用,结合人的知识和判断得到细胞的免疫信息,本文提出图像分析方法分析彩色免疫荧光图像自动获取细胞免疫信息.

由于细胞某些部分不具有和抗体结合的抗原,从而导致彩色免疫荧光图像中的区域和细胞不一定一一对应,因此先要从图像中提取荧光区域,然后再从获得的区域中提取细胞.视觉上通过荧光素所发荧光颜色的标记作用以及抗体抗原特异性结合关系,经由人的判断给出细胞抗原信息.因此,机器需要分析细胞的颜色,得到其结合荧光素的信息,然后依据荧光素抗体抗原之间的关系,才能自动给出细胞的抗原信息.

本文第 1 节给出动态种子值像素生长算法,用于提取荧光区域.第 2 节提出椭圆匹配方法,从获得的区域中提取细胞.第 3 节分析细胞颜色,通过离散化和预计算的方法分解颜色,得到细胞免疫信息,并据此对细胞免疫分型.第 4 节是讨论,适当评价本文的图像分析方法对细胞免疫信息获取的影响.第 5 节总结全文.

1 荧光区域提取

彩色免疫荧光图像前景背景之间存在明显的色差(如图 1 和图 2 所示),选择均匀颜色空间可以利用该颜色差别设定全局有效的阈值.常用的 RGB 或 HSI 颜色空间并不是均匀空间,即使两对颜色点的色差相等,它们在视觉上的颜色变化程度也往往不同,设定的阈值不能全局有效,区域提取效果不佳;若使用均匀颜色空间,则效果大为改善.本文选择 CIE(L^* , a^* , b^*) 均匀颜色空间,给出动态种子值像素生长算法提取荧光区域.



Fig.1 Bicolor direct immunofluorescence image (number labeled by manual work)

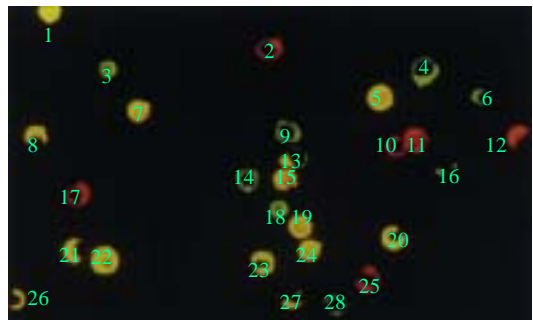


Fig.2 Tricolor direct immunofluorescence image (number labeled by manual work)

图 1 双色直接免疫荧光染色图像(标号手工添加)

图 2 三色直接免疫荧光染色(标号手工添加)

该算法针对彩色图像,使用色差直方图代替灰度直方图,根据直方图的双峰理论确定种子值在其内变化的初始阈值范围和用于获取区域像素的生长阈值;种子值用来寻找区域的种子点,然后在生长阈值的约束下,像素生长得到整个区域.种子值及其在初始阈值范围内从高到低按一定步长的动态变化可以尽量提取得到所有的荧光区域.

图 1 是原始图像.图 3 是图 1 的部分色差直方图,剔除了部分对分析无效的背景像素点形成的色差值.图 4 是在种子值 75,生长阈值 40 的条件下得到的区域提取图像,可以看到,所有的区域都得到了提取,轮廓和原始图

像相吻合.

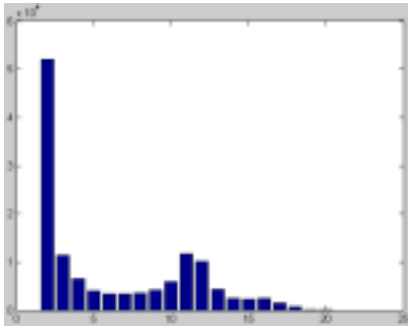


Fig.3 Chromatism histogram of Fig.1
图3 图1的色差直方图

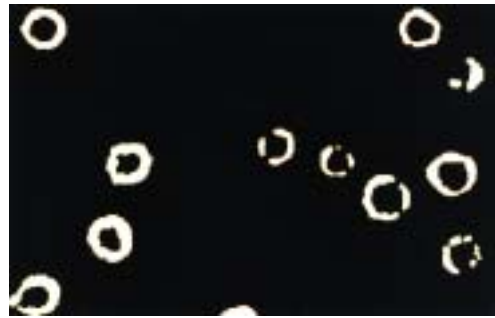


Fig.4 The region extraction image
图4 区域提取图像

2 细胞提取

上一节提取得到了荧光区域,但免疫荧光图像中区域和细胞并不一定一一对应,为了得到细胞而不是区域的免疫信息,需要在已提取的众多区域中判断哪些区域能够组成一个完整的细胞.荧光图像中存在多种区域和细胞的对应情况:图2中标号10、11处是一个连通区域却是两个粘连细胞;标号5、7、19、22、24等处视觉上均是实心近似椭圆区域,可以容易地被判定为一个细胞;图1中标号1、2、5、7、9等处区域虽然有空洞,但也易被判断为一个细胞;图2中标号6、8、20、21等处区域分别有大小不等的缺陷,但从检测人员的角度来看也分别对应一个细胞;图1中标号3、4、6等处以及图2中标号25、27、28等处表明一个细胞会对应多个区域.上述多种情况给细胞提取带来了困难.

本文依据先易后难、逐步简化的策略,结合区域提取中获得的信息,提出椭圆匹配方法,先提取单区域形成的细胞,以简化多区域的细胞提取.该方法主要从人眼视觉上区域形状的不同对区域分类,并根据细胞形态和区域颜色判断区域组合.也可以运用数学形态学方法,由对称结构元素连接区域进而提取细胞.在第4节讨论中将给出形态学的处理结果.下面给出具体的细胞提取步骤和相关图像,其中的正常细胞包围矩形范围在统计样本细胞基础上得到,面积用像素个数表达.

1) 粘连区域的判断

如果区域的包围矩形超出正常细胞包围矩形范围的上限,则判定为粘连区域(如图2中标号10、11处).可以采用数学形态学方法分离区域.

2) 实心完整型细胞的提取

如果区域只有一个封闭轮廓,它的包围矩形在正常细胞包围矩形范围之内,并且区域面积接近包围矩形内切椭圆的面积,则该区域对应实心完整型细胞(如图5所示).

3) 空心完整型细胞的提取

如果区域有内、外两个封闭轮廓,它的包围矩形在正常细胞包围矩形范围之内,且外轮廓包围的面积接近包围矩形内切椭圆的面积,则该区域对应空心完整型细胞(如图6所示).

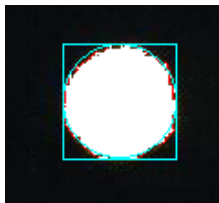


Fig.5 Solid complete cell extraction
图5 实心完整型细胞提取



Fig.6 Hollow complete cell extraction
图6 空心完整型细胞提取

余下的区域和细胞可能不会一一对应,按面积从大到小排序,并随处理过程作区域外包凸多边形.已有多种凸包算法,本文使用 Graham's scan 算法^[9],构造凸包的点集是区域外轮廓点集合.

4) 凹形不完整型细胞的提取

如果区域外包凸多边形有长边且最长边大于次长边两倍以上,则为凹形不完整区域(如图 1 标号 8 处左边的区域).凹形区域有可能和其他区域组成一个细胞,需要比较复杂的判断得到区域组合情况:

a) 椭圆作法:作凸多边形最长边的中垂线;求和中垂线垂直距离最短的轮廓点在线上的投影,如果有多个投影点,选择离最长边最远的一个;作平均细胞大小的椭圆,过选择的投影点,一轴与中垂线一致;

b) 判断:如果椭圆基本包围了凹形区域,还能较完整地包含其他未识别区域(较完整是指区域在椭圆内的面积占自身面积大部分),并且椭圆内的区域颜色接近,则它们共同构成一个细胞(如图 7 所示);如果椭圆没有包含其他区域,凹形区域包围矩形在正常细胞包围矩形范围之内,则单独构成细胞,否则,转 6)处理.



Fig.7 Concave noncomplete cell extraction
图 7 凹形不完整型细胞提取

5) 凸形不完整型细胞的提取

如果区域外包凸多边形没有特别长的边,则为凸形不完整区域(如图 1 中标号 10 处的区域).凸形区域有较大可能和其他区域组成一个细胞,需要比较复杂的判断才能得到区域组合情况:

a) 椭圆作法:用平均细胞大小的椭圆从 8 个方位“套”凸形区域,以寻找最佳区域组合,椭圆的一轴与确定的某个方位一致,且过区域在该方位的最远点;

b) 判断:选择较完整地包含未识别区域最多的椭圆;如果椭圆基本包围了凸形区域,椭圆内的区域颜色接近,则它们共同构成一个细胞(如图 8(d)所示);如果 8 个椭圆都没有包含其他区域,凸形区域包围矩形在正常细胞包围矩形范围之内,则单独构成细胞,否则,转 6)处理.

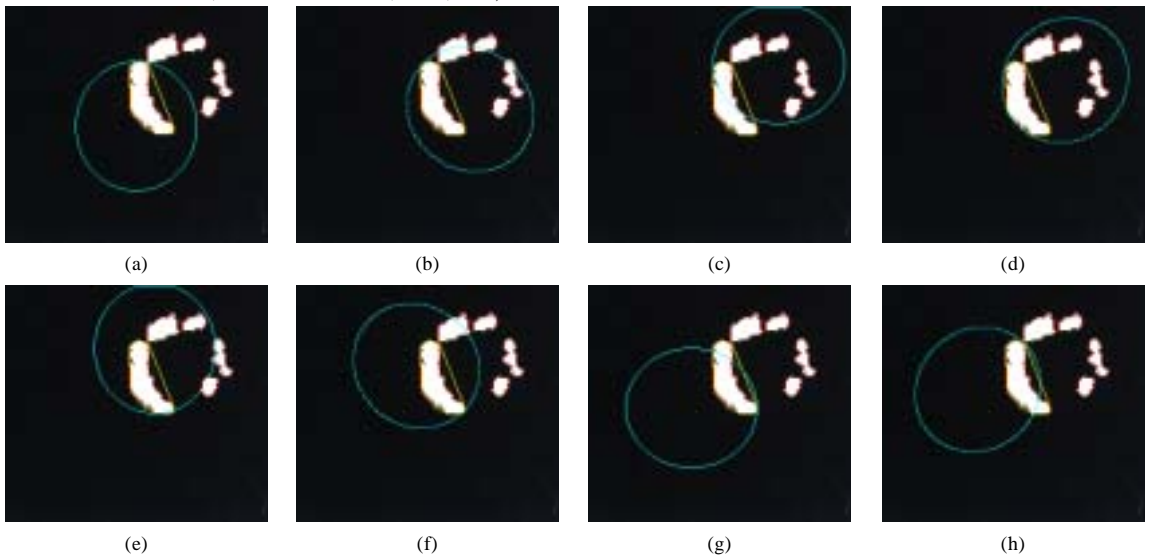


Fig.8 Convex noncomplete cell extraction, (a)~(h) are images obtained with counter-clockwise at 0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 315° respectively

图 8 凸形不完整型细胞提取,(a)~(h)分别为逆时针 0°,45°,90°,135°, 180°,225°,270°,315°方向得到的图像

6) 少数剩余荧光区域

经过以上步骤,可能还存在少数区域,如 4)、5)中不满足条件的区域等,留待人机交互处理.

3 颜色分解

视觉上通过人眼对细胞的整体颜色感受并结合每种荧光素受激发后所发荧光颜色的知识,定性地判断细胞颜色由哪几种荧光颜色混合形成,进而由荧光颜色和荧光素之间的对应关系知道该细胞结合了哪几种荧光素,然后依据荧光素抗原抗体之间的反应关系,推出细胞抗原信息.因此,机器分析颜色表现为分解细胞的整体颜色,定量得到每种荧光颜色在细胞颜色中所占比例,从而也就知道细胞结合了何种荧光素.下文阐述提出的颜色分解方法及与实现相关的问题,并依据实验结果对细胞免疫分型.下面先给出 4 个特定于本文的与颜色有关的定义.

组成色:荧光素在特定的激发光源激发下所发出荧光的颜色.

混合色:若干组成色按照一定比例混合后形成的颜色.

荧光区域代表颜色:用一种颜色代表荧光区域内众多相似的颜色.

细胞代表颜色:用一种颜色代表细胞若干组成区域中众多相似的颜色.

3.1 颜色分解方法

本文的颜色分解问题抽象如下:已知若干种组成色色度坐标和某个混合色色度坐标,求每种组成色在混合色中所占的比例.色度学上的颜色匹配实验通过调节三原色光的强度,使混合得到的颜色与待匹配颜色在视觉上一致^[10].从该实验可以间接知道每种原色在待匹配颜色中所占的比例;颜色分解问题也可以从原子物理方面加以探讨^[11,12].在图像分析领域,颜色分解的讨论和应用并不多见.文献[13]中利用半色调和颜色分解技术构造了对灰度图像和彩色图像可视化加密的 3 种方法,但其中提到的打印之前的颜色分解实际上是颜色空间的转换(RGB 到 CMYK)^[14,15].

我们提出了离散化和预计算的方法,以解决遇到的颜色分解问题:预先按照人为指定的比例混合组成色,计算混合色色度坐标并存储,同时存储组成色的混合比例;颜色分解时,计算细胞代表颜色和已存储混合色色度坐标之间的距离,寻找与细胞代表颜色距离最近的已存储混合色,在误差允许的范围内认为这两种颜色相同;由已存储混合色的组成信息,得到细胞代表颜色的组成信息,从而达到颜色分解的目的.这里的离散化是指,将连续的颜色空间转化为离散的颜色点集合.离散化程度决定了颜色分解的精度和速度.

3.2 和颜色分解方法实现相关的问题

预计算混合色是指预先按照人为指定的比例混合若干组成色,依据颜色混合公式计算混合色色度坐标.因此,需要事先获得组成色的色度坐标和推导能够人为控制混合比例的混合色色度坐标计算公式才能混合颜色.细胞区域中存在许多相近的颜色,为获得整体颜色信息而不局限于细节,用代表颜色表示这种颜色相近而不相同的特点.因为细胞由一个或多个荧光区域组成,因此,先计算每个荧光区域的代表颜色,取区域代表颜色或同一细胞不同区域的代表颜色算术平均值作为细胞代表颜色.

3.2.1 组成色色度坐标的获取

组成色的色度坐标可以通过物理实验取得,但需要专用的测量仪器和较复杂的计算.本文使用一种简便的方法:用和组成色对应的荧光素对细胞涂片免疫荧光染色,采集染色后形成的彩色图像,荧光素在激发光源激发下所发出荧光的颜色(组成色)以图像前景区域颜色形式记录下来,因此,计算前景荧光区域颜色的色度坐标就可以得到组成色色度坐标.此方法避免了物理实验和复杂的计算.

3.2.2 混合色色度坐标计算公式的推导

设组成色 C_1, C_2 的三刺激值表示和色度坐标表示为(其中 $[X], [Y], [Z]$ 为 CIE-XYZ 色度系统中的三原色; $X_1, Y_1, Z_1; X_2, Y_2, Z_2$ 分别为 C_1 和 C_2 的三刺激值; $x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2$ 分别为 C_1 和 C_2 的色度坐标)

$$C_1 = X_1[X] + Y_1[Y] + Z_1[Z] = m_1 \{x_1[X] + y_1[Y] + z_1[Z]\},$$

$$C_2 = X_2[X] + Y_2[Y] + Z_2[Z] = m_2 \{x_2[X] + y_2[Y] + z_2[Z]\}.$$

根据文献[10]中的知识,混合色三刺激值可由组成色三刺激值线性叠加得到,即

$$C_{1+2} = (X_1 + X_2)[X] + (Y_1 + Y_2)[Y] + (Z_1 + Z_2)[Z] = (m_1x_1 + m_2x_2)[X] + (m_1y_1 + m_2y_2)[Y] + (m_1z_1 + m_2z_2)[Z].$$

$$M = (m_1x_1 + m_2x_2) + (m_1y_1 + m_2y_2) + (m_1z_1 + m_2z_2) = m_1(x_1 + y_1 + z_1) + m_2(x_2 + y_2 + z_2),$$

因为 $x_1 + y_1 + z_1$ 和 $x_2 + y_2 + z_2$ 是色度坐标之和,值为 1,所以

$$M = m_1 + m_2 \tag{1}$$

又因为 $\frac{X_1 + Y_1 + Z_1}{X_2 + Y_2 + Z_2} = \frac{m_1(x_1 + y_1 + z_1)}{m_2(x_2 + y_2 + z_2)} = \frac{k_1}{k_2}$, 得到

$$m_1 = \frac{k_1}{k_2} m_2 \tag{2}$$

把式(2)带入式(1),得到 $M = \frac{k_1}{k_2} m_2 + m_2$, 则混合色的色度坐标为

$$x = \frac{m_1x_1 + m_2x_2}{M} = \frac{\frac{k_1}{k_2} m_2 x_1 + m_2 x_2}{\frac{k_1}{k_2} m_2 + m_2} = \frac{\frac{k_1}{k_2} x_1 + x_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1}, y = \frac{\frac{k_1}{k_2} y_1 + y_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1}, z = \frac{\frac{k_1}{k_2} z_1 + z_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1}.$$

容易求得 C_1, C_2 在混合色 C_{1+2} 中所占的比例分别为 $\frac{k_1}{k_1 + k_2}$ 和 $\frac{k_2}{k_1 + k_2}$. 人为控制 k_1, k_2 的取值以改变组成色所占比例,达到预计算混合色的目的.在实际计算中, k_1 或 k_2 为 0 表示混合色由一种组成色形成.

3.2.3 荧光区域代表颜色的计算



Fig.9 The average color image of Fig.1
图 9 图 1 的平均颜色图像

用一种颜色代表整个区域所有像素点的颜色会丢失部分颜色信息,需要找出恰当的计算方法,以便把丢失的信息控制在可以接受的范围之内.评判计算代表颜色方法的好坏,在本文中主要看用代表颜色处理后的图像和原始图像在视觉上颜色是否近似.代表颜色可以用区域中出现次数最多的颜色表示,也可以把区域中所有像素点颜色值相加除以像素点个数得到的平均值作为代表颜色.实验表明(如图 9 所示),用平均颜色处理后的图像和原始图像人眼颜色感觉相近,故本文采用平均颜色方法计算荧光区域代表颜色.

3.3 颜色分解实验

从图 1 提取细胞以后,计算并分解这些细胞的代表颜色,表 1 为相关数据.

Table 1 Data of color decomposition
表 1 颜色分解数据

Num.	Start coordinates		Average color values			Color decomposition	
	X	Y	R	G	B	Composition color 1 (green)	Composition color 2 (orange-red)
1	65	12	122	33	26	0.038 462	0.961 538
2	973	12	127	30	29	0.038 462	0.961 538
3	1 109	136	114	136	43	0.781 250	0.218 750
4	644	300	108	27	23	0.038 462	0.961 538
5	289	336	92	112	30	0.833 333	0.166 667
6	769	342	106	29	24	0.038 462	0.961 538
7	1 057	358	131	31	30	0.038 462	0.961 538
8	881	412	55	97	38	0.862 069	0.137 931
9	236	508	121	30	23	0.038 462	0.961 538
10	1 080	557	96	108	39	0.714 286	0.285 714
11	65	652	88	110	33	0.806 452	0.193 548
12	553	728	120	32	28	0.038 462	0.961 538

表 1 中第 1 列编号与图 1 中的标号一致;最后一列分色结果是每种组成色在细胞代表颜色中所占比例.组成色 1 为绿色,由 FITC(异硫氰酸荧光素)受激光激发后发出,组成色 2 为橙红色,由 PE(藻红蛋白荧光素)受激光

激发后发出;这里的绿色、橙红色不是单一波长光的颜色,而是人眼的视觉感受.

对比图 1 原始图像颜色和表 1 颜色分解数据,以检验分色结果正确与否.图 1 中标号 1、2、4、6、7、9、12 处呈橙红色,表 1 中记录 1、2、4、6、7、9、12 的分色数据都是:绿色 0.038 462,橙红色 0.961 538;橙红色占绝对优势,分色数据和原始图像颜色相符.图 1 中标号 3、5、10、11 处绿中带黄,表 1 中记录 3、5、10、11 的分色数据分别为 0.781 250,0.218 750;0.833 333,0.166 667;0.714 286,0.285 714;0.806 452,0.193 548;绿色占主导地位,橙红色也占一定比例,正是这些橙红色使得细胞区域绿中带黄(绿色和红色混合产生黄色),分色数据和原始图像颜色相符.图 1 中标号 8 处的分色数据是:绿色 0.862069,橙红色 0.137931;区域在视觉上为绿色,但放大后可以看到些许黄色,说明掺进少量橙红色.以上分析表明,颜色分解数据与原始图像颜色一致.

本文的实验使用已知抗体检测细胞抗原,并根据检测结果对细胞免疫分型.实验中,FITC(发绿色光)和 CD3 单克隆抗体结合,PE(发橙红色光)和 CD4 单克隆抗体结合,形成荧光素抗体复合物;细胞免疫荧光染色后,CD3 荧光素抗体复合物和含 CD3 抗原的细胞结合,CD4 荧光素抗体复合物和含 CD4 抗原的细胞结合.根据荧光素所发荧光颜色的标记作用,视觉上呈绿色的细胞含 CD3 抗原,是成熟 T 细胞,呈橙红色的细胞含 CD4 抗原,是诱导 T 细胞,呈绿中带黄的细胞含 CD3 和 CD4 抗原,是 T 辅助细胞.设定每种组成色在细胞代表颜色中所占比例超过 15%时才认为该细胞同时结合了两种荧光素抗体复合物,也即含有两种抗原.表 2 是机器分型数据.

Table 2 Cell typing data by machine

表 2 机器细胞分型数据

Cell num.	Vision color	Color decomposition		Typing by machine
		Green	Orange-red	
1	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
2	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
3	Green with some yellow	0.781 250	0.218 750	Helper T cell
4	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
5	Green with some yellow	0.833 333	0.166 667	Helper T cell
6	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
7	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
8	Green	0.862 069	0.137 931	Mature T cell
9	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell
10	Green with some yellow	0.714 286	0.285 714	Helper T cell
11	Green with some yellow	0.806 452	0.193 548	Helper T cell
12	Orange-red	0.038 462	0.961 538	Inducible T cell

4 讨 论

本文的动态种子值像素生长算法得到的区域轮廓与原始图像相当吻合,但被整体放大,这是因为像素颜色值的随机性以及为保持荧光区域的完整性,生长阈值被设置得较低,一些在通常轮廓外的像素点也被提取出来.这种整体放大对后继的分析会产生一定影响,但从实验来看,并没有影响结果的正确获取.实际上,放大图像之后会发现,通常视野下的轮廓之外仍有淡的荧光区域,可从视觉角度根据人的主观要求来确定何为最合适的生长阈值.

通过观察荧光图像可以发现,多个区域形成的细胞不同区域之间距离接近、颜色相似、形状相关(能构成近似椭圆形状).本文中的细胞提取方法主要依据形状相关特性,同时结合颜色因素获得细胞;也可以运用数学形态学运算连通同一细胞的不同区域进而提取细胞.图 10

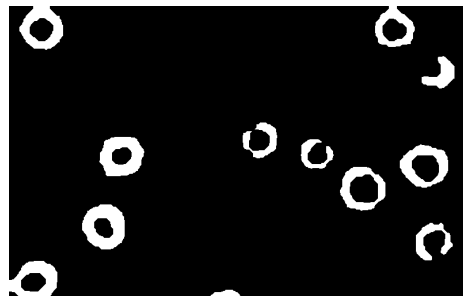


Fig.10 Image obtained by operations of morphology

图 10 数学形态学运算得到的图像

是在对图 4 二值化以后,先膨胀后腐蚀得到的图像.由于使用的是对称结构元素,实质上只考虑了不同区域之间的距离因素,且结构元素大小需要手工设定.对于图 2 那样复杂的免疫荧光图像,要经过二值化、形态学去噪、

细化、膨胀等多个步骤才能达到比较令人满意的效果,其中细化运算需要的时间与空间开销大,速度慢。

依据颜色分解得到细胞抗原信息,分解的正确性至关重要.第 3.3 节颜色分解实验中对比了解析数据和原始图像颜色,得到数据和颜色一致的结论.我们还提出了另一种在色度图中分解颜色的方法,其得到的数据(表 3)与表 1 基本一致,文中方法更为精确,这从另一侧面验证了颜色分解方法的正确性.

Table 3 Decomposition data in chromaticity diagram

表 3 色度图中颜色分解数据

Num.	Composition color 1	Composition color 2
1	0.076 765	0.923 235
2	0.028 737	0.971 263
3	0.749 838	0.250 162
4	0.047 993	0.952 007
5	0.820 869	0.179 131
6	0.010 691	0.989 309
7	0.036 418	0.963 582
8	0.648 792	0.351 208
9	0.116 495	0.883 505
10	0.679 077	0.320 923
11	0.787 002	0.212 998
12	0.020 802	0.979 198

基于对荧光图像的分析,容易实现免疫荧光检测技术的计算机化.它是一种人工检测抗原或抗体的技术,以检测抗原为例,可以得到如下信息:细胞含有何种抗原;细胞的荧光强度;各类阳性细胞的个数.分析检测过程中形成的彩色免疫荧光图像,细胞的抗原信息可以通过颜色分解得到,细胞荧光强度可以通过细胞代表颜色得到,各类阳性细胞个数可以在免疫分型基础上计数得到.

5 结束语

由免疫荧光方法得到细胞免疫信息有两个主要途径:人工的免疫荧光检测技术和流式细胞仪.免疫荧光检测技术费时、费力且受主观影响;而使用流式细胞仪不仅费用昂贵,更为重要的是,其使用过的液体即使用于形态学分析,也不能得到同一细胞的免疫信息和形态信息.本文分析彩色免疫荧光图像获得细胞的免疫信息,克服了前两种方法的不足.首先利用荧光图像前景背景之间的色差,给出动态种子值像素生长算法,在均匀颜色空间中提取荧光区域,然后在获得的区域中由椭圆匹配方法提取细胞,最后分解细胞代表颜色,根据荧光素所发出荧光颜色的标记作用和抗原抗体之间的特异性反应给出细胞抗原信息.实验证实,本文提出的方法是有效的,能够满足实际医学分析的需要.

References:

- [1] Xu P. Fluorescence, Immunofluorescence Techni and its Application. 2nd ed., Beijing: People's Medical Publishing House, 2000 (in Chinese).
- [2] Wang SJ, Wang JZ, Wu ZR. Atlas of Current Hemocytology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001 (in Chinese).
- [3] Xie FY, Jiang ZG, Zhou FG. Immune cell image segmentation based on mathematical morphology. Journal of Image and Graphics, 2002, 7(A)(11): 1119-1122 (in Chinese with English abstract).
- [4] Olivo JC. Automatic detection of spots in biological images by a wavelet-based selective filtering technique. In: Image Processing, 1996 Proceedings, Int'l Conf., Vol 1. 1996. 311-314.
- [5] Olivo-Marin JC. Extraction of spots in biological images using multiscale products. Pattern Recognition, 2002,35(9):1989-1996.
- [6] Nattkemper TW, Twellmann T, Ritter H, Schubert W. Human vs. machine: Evaluation of fluorescence micrographs. Computers in Biology and Medicine, 2003,33:31-43.
- [7] Sack U, Knoechner S, Warschkau H, Pigla U, Emmrich F, Kamprad M. Computer-Assisted classification of HEp-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. Autoimmunity Reviews, 2003,2:298-304.
- [8] Boland MV, Markey MK, Murphy RF. Classification of protein localization patterns obtained via fluorescence light microscopy. In: Engineering in Medical and Biology Society. Proc. of the 19th Annual Int'l Conf. of the IEEE, Vol 2. 1997. 594-597.

- [9] Cormen TH, Leiserson CE, Rivest RL, Stein C. Introduction to Algorithms. 2nd ed., Cambridge: MIT Press, 2001. 947-957.
- [10] Tang SQ. Colorimetry. Beijing: Beijing Institute of Technology Press, 1990 (in Chinese).
- [11] Duca VD, Dixon L, Maltoni F. New color decompositions for gauge amplitudes at tree and loop level. Nuclear Physics B, 2000,571: 51-70.
- [12] Duca VD, Frizzo A, Maltoni F. Factorization of tree QCD amplitudes in the high-energy limit and in the collinear limit. Nuclear Physics B, 2000,568:211-262.
- [13] Hou YC. Visual cryptography for color images. Pattern Recognition, 2003,36:1619-1629.
- [14] Qian GL, Chen B, Shu WH, Hong Y, Ma PJ. A color matching method based on machine learning. Journal of Software, 1998,9(11): 845-850 (in Chinese with English abstract).
- [15] Guo MZ, Wang YD, Su XH, Wang XQ. Research of color matching method based on BP network. Chinese Journal of Computers, 2000,23(8):819-823 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献:

- [1] 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术及应用. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [2] 王淑娟, 王建中, 吴振茹. 现代血细胞学图谱. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [3] 谢凤英, 姜志国, 周付根. 基于数学形态学的免疫细胞图像分割. 中国图像图形学报, 2002, 7(A)(11): 1119-1122.
- [10] 汤顺清. 色度学. 北京: 北京理工大学出版社, 1990.
- [14] 钱国良, 陈彬, 舒文豪, 洪勇, 马培军. 基于机器学习的彩色匹配技术. 软件学报, 1998, 9(11): 845-850.
- [15] 郭茂祖, 王亚东, 苏晓红, 王兴起. 基于BP网络的色彩匹配方法研究. 计算机学报, 2000, 23(8): 819-823.

敬告作者

《软件学报》创刊以来,蒙国内外学术界厚爱,收到许多高质量的稿件,其中不少在发表后读者反映良好,认为本刊保持了较高的学术水平.但也有一些稿件因不符合本刊的要求而未能通过审稿.为了帮助广大作者尽快地把他们的优秀研究成果发表在我刊上,特此列举一些审稿过程中经常遇到的问题,请作者投稿时尽量予以避免,以利大作的发表.

1. 读书偶有所得,即匆忙成文,未曾注意该领域或该研究课题国内外近年来的发展情况,不引用和不比较最近文献中的同类结果,有的甚至完全不列参考文献.

2. 做了一个软件系统,详尽描述该系统的各个方面,如像工作报告,但采用的基本上是成熟技术,未与国内外同类系统比较,没有指出该系统在技术上哪几点比别人先进,为什么先进.一般来说,技术上没有创新的软件系统是没有发表价值的.

3. 提出一个新的算法,认为该算法优越,但既未从数学上证明比现有的其他算法好(例如降低复杂性),也没有用实验数据来进行对比,难以令人信服.

4. 提出一个大型软件系统的总体设想,但很粗糙,而且还没有(哪怕是部分的)实现,很难证明该设想是现实的、可行的、先进的.

5. 介绍一个现有的软件开发方法,或一个现有软件产品的结构(非作者本人开发,往往是引进的,或公司产品),甚至某一软件的使用方法.本刊不登载高级科普文章,不支持在论文中引进广告色彩.

6. 提出对软件开发或软件产业的某种观点,泛泛而论,技术含量少.本刊目前暂不开办软件论坛,只发表学术文章,但也欢迎材料丰富,反映现代软件理论或技术发展,并含有作者精辟见解的某一领域的综述文章.

7. 介绍作者做的把软件技术应用于某个领域的工作,但其中软件技术含量太少,甚至微不足道,大部分内容是其他专业领域的技术细节,这类文章宜改投其他专业刊物.

8. 其主要内容已经在其他正式学术刊物上或在正式出版物中发表过的文章,一稿多投的文章,经退稿后未作本质修改换名重投的文章.

本刊热情欢迎国内外科技界对《软件学报》踊跃投稿.为了和大家一起办好本刊,特提出以上各点敬告作者.并且欢迎广大作者和读者对本刊的各个方面,尤其是对论文的质量多多提出批评建议.