

# 原位分子杂交图象中银粒的分割方法研究

王浩军 毛柏鑫 毕笃彦 张旭

(空军工程学院航空电子工程系, 西安 710038)

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

**摘要** 图象分割是图象处理的一个基本技术。运用一种改进的快速 Otsu 阈值分割法,并结合其它处理方法对原位分子杂交图象中的银粒进行分割。实验结果表明,该方法在精度和速度方面有其优势,适合于对原位分子杂交图象中银粒的自动分割。

**关键词** 图象分割 阈值 二值图象 原位分子杂交 小波变换

## 0 引言

用同位素标记分子探针做原位分子杂交时,细胞上标记的银粒数目往往相对地反映出细胞中某种物质的 mRNA 含量,因此,对细胞上银粒数目的分析是阐明不同生理或病理条件下同一组织或细胞中某种基因表达改变的关键方法。对原位分子杂交中的银粒进行定量(计数)分析是由图象分析仪来完成的,通常在对银粒自动计数前,银粒的分割是重要环节。分割的好坏直接影响着计数的准确程度。在原位分子杂交图象中,银粒为群集的细小颗粒,灰度深浅略有差异,且各图象之间灰度深浅也有差异。如在分析时对不同图象采用固定阈值进行分割,计数结果势必不准确,所以,一般多采用人工选取阈值的方法,但这种方法耗时、耗力、主观因素影响较大。为此,本文在 Reddi 等提出的快速 Otsu 法<sup>[1]</sup>基础上,进一步加以改进,同时结合在阈值前的小波变换的图象增强预处理,和阈值后的基于目标大小的修正

方法,对其中的目标——银粒进行二值化,基本实现了对原位分子杂交图象中银粒的自动、准确和快速的分割,为银粒的定量分析(计数分析)提供了可靠的保证。

## 1 原位分子杂交图象的特征

图 1(a)为原位分子杂交的原始图象,箭头所指处为银粒。从图 1(c)原始图象的一维灰度直方图中可以看出,其上并没有明显的峰谷特征,银粒本身在图象中的灰度分布特点是灰度跃变较大的地方,灰度值较高,其散在的分布在一段灰度范围之内,且频数不大,造成直方图不光滑,参差不齐,使象素分类判别变得十分困难。我们从大量的实验中发现,原位分子杂交图象的类间方差曲线如图 1(d)所示,多为单峰型(双峰和多峰型还未见到)且平滑,即只存在一个最大类间方差值,基本无明显的局部极小值,因此,可考虑用 Otsu 法进行图象分割。

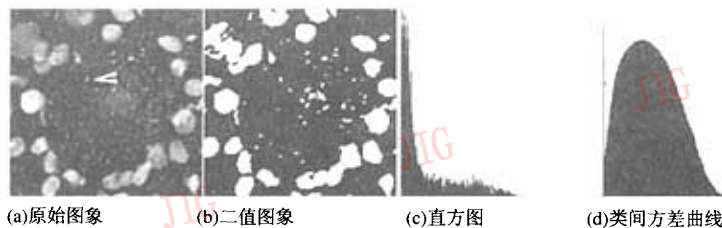


图 1

## 2 原位分子杂交图象的分割方法

在实际分割中,若对原始图象直接进行 Otsu 法

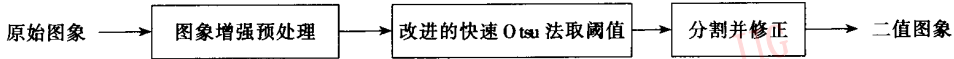


图 2 图象分割步骤

### 2.1 图象预处理

本文所说的图象的预处理方法主要指基于小波变换的图象增强处理,这也是根据银粒在原位分子杂交图象中的特点和小波变换本身所固有的优越性而提出来的。首先对原始图象进行多尺度的非抽样小波正变换,然后提取银粒在各尺度下的小波特征,并通过改变其小波特征的方法对银粒增强,最后将处理后的小波变换图象经非插值的小波逆变换进行重构,增强结果如图 3(a)所示。具体做法可参看文献[2]。

从图 3(a)可以看到,采用小波变换的增强方法可以有选择地提升银粒强度,同时达到抑制背景的目的,与传统的各种增强方法相比,该方法在处理银粒这种细小目标方面有其独到之处。实验还表明,其类间方差曲线同样为单峰型且较平滑,基本无局部极小值,如图 3(b)所示,同样可以运用 Otsu 法进行分割。

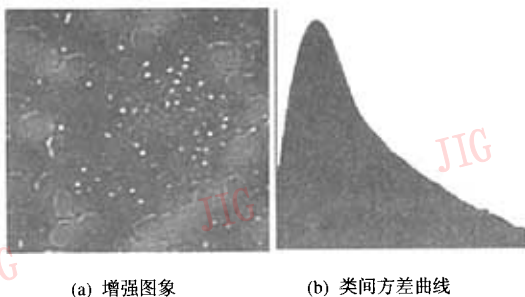


图 3

### 2.2 改进的快速 Otsu 阈值法

Otsu 提出的通过一维灰度直方图选择理想阈值的分割方法是基于目标和背景间的最大类间方差的思想。Reddi 针对 Otsu 的方法,不采用原始的穷举搜索法,而是利用常用的梯度法的概念,提出了一种快速搜索方法。他假定图象的灰度直方图为连续的

分割,由于有些银粒与背景的对比较低,分割后会造成本多数银粒缺失,如图 1(b)所示。为此本文提出了如图 2 所示的分割步骤。

概率密度函数  $p(x)$ ,暗区和亮区的类间方差定义为

$$\begin{aligned} \sigma^2(k) &= p_D(m_D - m_0)^2 + p_B(m_B - m_0)^2 \\ &= p_D m_D^2 + p_B m_B^2 - m_0^2 \end{aligned} \quad (1)$$

其中,  $p_D = \int_0^k p(x)dx$ ,  $p_B = \int_k^\infty p(x)dx$ ,  $p_D m_D = \int_0^k xp(x)dx$ ,  $p_B m_B = \int_k^\infty xp(x)dx$ ,  $m_0 = p_D m_D + p_B m_B$ 。若令  $m(k_i, k_j) = \int_{k_i}^{k_j} xp(x)dx / \int_{k_i}^{k_j} p(x)dx$ ,  $k_i = 0, k; k_j = k, \infty$ , 则有

$$\begin{aligned} \frac{\partial \sigma^2}{\partial k} &= p(k)[m(k, \infty) - m(0, k)] \\ &\quad [m(0, k) + m(k, \infty) - 2k] \end{aligned} \quad (2)$$

只有当(2)式等于 0 时类间方差为最大,而  $[m(k, \infty) - m(0, k)]$  永远为正,不可能为 0,所以

$$p(k) = 0 \text{ 和 } m(0, k) + m(k, \infty) = 2k,$$

即

$$m_D + m_B = 2k \quad (3)$$

而  $p(k) = 0$  时  $\sigma^2(k)$  不变,梯度为 0,此种情况我们不感兴趣,可忽略。于是(3)式满足时为  $\sigma_{\max}^2$  点,即此时的阈值  $k$  为理想的阈值  $k^*$ 。

Reddi 在文献[1]中只给出上述两阈值的快速搜索流程,且初始值  $k$  是根据图象的最大阈值  $k_{\max}$  和最小阈值  $k_{\min}$  来确定的,一般迭代次数为 6~20 次。本文对此加以改进,即先计算图象的灰度均值,让它作为初始值。通过实验对比迭代次数减少了一半,具体的快速搜索流程如下:

(1) 选取初始阈值  $k_c = \frac{\sum_{l=0}^{255} H(l) \times l}{\sum_{l=0}^{255} H(l)} = m_0$ , 给定允许误差  $0 < \epsilon \leq 1$ , 并令  $c = 0$ , 其中  $m_0$  为整个图象的灰度均值,  $H(l)$  为各灰度级出现的频数,  $l$  为各灰度级,在本文中取值范围为  $0 \leq l \leq 255$ ;

(2) 计算梯度  $e^{(c)} = [m(0, k_c) + m(k_c, 255)]/2 - k_c$ ;

- (3) 检验是否满足  $\|e^{(c)}\| \leq \epsilon$ , 若满足则转(6), 否则继续;
- (4) 令  $k_{c+1} = k_c + [e^{(c)}]$ , 其中  $[ ]$  表示取整;
- (5) 令  $c = c + 1$ , 转(2);
- (6) 输出结果并结束。

### 2.3 分割并修正

当利用上述方法得到最佳阈值  $k^*$  后, 将灰度值大于  $k^*$  的转换为白目标, 灰度值小于或等于  $k^*$  的转换为黑背景, 便完成二值化的分割过程。实验表明, 原图中的大颗粒也被标为白目标, 但其不是我们要分析的对象, 于是可通过它与银粒在面积上的大小差异将其排除, 关于面积范围的阈值可通过事先大量取样, 然后用统计方法得到。

## 3 实验结果

本文对 20 个视野下的原位分子杂交图象 ( $128 \times 128$ ) 中的银粒进行分割 (原图由 Quantimet 570 图象分析仪采集, 显微镜放大倍数为 20, 银粒大小一般为 1~10 象素), 原图见图 1(a), 箭头所指处为银粒。图 3(a) 为其增强图象, 作者将它与文献 [3] 中认为比较好的两种方法作了分割实验, 如图 4、5 所示, 其中图 4 是未做修正前的二值图象, 图 5 是最后的二值图象, 其中每张图中左为快速 Otsu 法分割结

果, 中为矩不变法<sup>[4]</sup> (MOMENT) 分割结果, 右为最大熵法<sup>[5]</sup> (ENTROPY) 分割结果。对于分割效果和性能的评价, 我们从视觉效果和错分概率两方面进行了比较 (PC 机为 586MMX/166)。从图 4、5 可以看出: 在类间方差的极大值保证唯一的情况下, 快速 Otsu 法分割出的银粒形状完整、数目比较准确; 矩不变法分割效果次之, 银粒形状真实, 但由于选取阈值偏高, 修正处理后非银粒点遗留较多, 造成银粒数目不准确; 最大熵法的分割效果最差, 银粒数目缺失过多, 达不到实际要求。各分割方法的性能比较如表 1 所示, 其中错分概率定义为:

$$p(\text{err}) = P(O) \times P(B/O) + P(B) \times P(O/B) \quad (4)$$

本文实验表明, 运用 Reddi 快速 Otsu 法对 20 个视野下的图象寻找阈值, 平均迭代次数约为 12 次, 改进迭代初值后, 平均迭代次数约为 5 次, 速度提高了 1ms 左右。因此, 该方法对于在实时处理和图象灰度等级较多时进一步提高处理速度有一定的应用价值。

表 1 分割方法的性能比较

	快速 Otsu	Otsu	MOMENT	ENTROPY	人工方法
最佳阈值	40	40	57	111	47
$P(\text{err})$	0.105	0.105	0.247	0.511	/
$t(\text{s})$	0.027	0.045	0.033	0.060	/

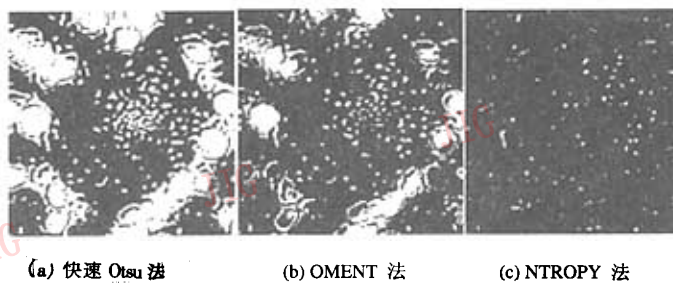


图 4 修正前分割结果

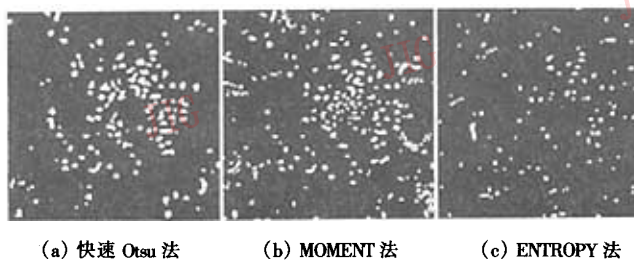


图 5 修正后分割结果

## 4 结 论

本文对原位分子杂交图象在灰度空间的特征进行了分析,并应用改进的快速 Otsu 法对其中银粒进行自动分割,速度上有所提高。该方法完全利用图象自身的信息选取最佳阈值,分割精度较高,符合实际要求。在实际处理工作中由于每次要分析大量的图象,对处理速度虽不要求实时,但不能太慢,由于该方法基于图象的一维灰度直方图的零阶和一阶累积矩,因此计算简便,运算速度快,在处理速度上可以满足要求。综上所述,我们认为本文所用方法是可行的和实用的。另外,这种方法还可用于其它领



**王浩军** 1989年毕业于电子科技大学电子工程系,获学士学位。1996年在空军工程学院攻读信号与信息处理专业硕士学位。主要研究方向为医学图象处理与分析,模式识别,小波分析。已发表论文数篇。



**毕笃彦** 1986年毕业于国防科学技术大学电子技术系,获硕士学位。1997年毕业于法国图尔大学,获博士学位。现为空军工程学院航空电子工程系副教授。研究方向为图象处理,图象压缩,模式识别。

域中有关颗粒特征的图象分割。

## 参 考 文 献

- 1 Reddi S S, Rudin S F, Keshavan H R. An optimal multiple threshold scheme for image segmentation. *IEEE Trans SMC*, 1984, 14(4): 661 ~ 665.
- 2 Strickland R N, Hahn H I I. Wavelet transform methods for object detection and recovery. *IEEE Trans Image Processing*, 1997, 6(2): 727 ~ 735.
- 3 Lee S U, Chung S Y. A comparative performance study of several global thresholding techniques for segmentation. *CVGIP*, 1990, 52: 171 ~ 190.
- 4 Tsai W H. Moment-preserving thresholding: A new approach. *CVGIP*, 1985, 29: 377 ~ 393.
- 5 Kapur J N, Sahoo P K, Wong A C K. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *CVGIP*, 1985, 29: 273 ~ 385.



**毛柏鑫** 1964年毕业于南开大学数学系,现为空军工程学院航空电子工程系教授,从事信号与信息处理学科的教学和科研工作,主要感兴趣的领域是数字信号处理,数据压缩,图象处理与模式识别。已发表论文多篇,出版多本著作。



**张旭** 博士,研究员,博士生导师,现任第四军医大学神经科学研究所副所长。从事神经生物学研究,已在国内外学术期刊上发表论文 71 篇。

## A Study of Image Segmentation for Silver Grains in In-Situ Hybridization

Wang Haojun, Mao Baixin and Bi Duyan

(Department of Airspace Electronic Engineering, Airforce Engineering college, Xi'an 710038)

Zhang Xu

(Institute of Neuroscience, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**Abstract** Image segmentation is a basic technique in image processing. This paper presents an improved thresholding method based on Otsu's method, combining with other techniques to segment silver grains in in-situ hybridization. The experiments show that the new method possesses some advantages in the aspects of precision and speed for image segmentation and is available for the automatic thresholding of silver grains in in-situ hybridization.

**Keywords** Image segmentation, Thresholding, Binary image, In-situ hybridization, Wavelet transform