

序列显微镜图像的细胞追踪算法

杨利,蔡文杰,马晶

上海理工大学医疗器械与食品学院,上海 200093

【摘要】随着显微镜成像技术的成熟,细胞分析已经成为生物图像分析领域的重要内容之一。早期的研究主要集中在静态细胞图像信息如细胞计数和细胞形态特征等问题上。随着活细胞成像技术的发展,产生了大量延时细胞图像数据,人工处理这些数据费时费力,工作效率低下,引入细胞追踪算法可使数据处理的工作量大为减少。本文对已有的细胞追踪的算法进行分析,对算法的优缺点和追踪结果进行比较,并从提高细胞追踪算法的精确度与速度的角度提出设想与展望。

【关键词】显微镜图像;细胞追踪;细胞分割;精确度

【中图分类号】TN957.52

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)02-0187-04

Cell tracking algorithm for sequence microscopy images

YANG Li, CAI Wenjie, MA Jing

School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract: With the advancement of microscopy imaging technology, cell morphology analysis is becoming more important in biological image analysis. Early studies mainly focused on static cell image information, such as cell counting and cell morphology. The development of living cell imaging results in a large amount of delayed cell image data, and it is time consuming to manually process these data. The cell tracking algorithm can greatly reduce the workload of data processing. Herein, we summarize the existing algorithms, and compare the advantages and disadvantages of the algorithms and the tracking results. Finally, some possible methods for improving the accuracy and the efficiency of cell tracking algorithm are prospected.

Keywords: microscopy image; cell tracking; cell segmentation; accuracy

前言

近几年来随着计算机图像处理技术的发展,应用于各个领域的图像分析算法在不断进步。在生物医学领域,随着显微镜成像技术的成熟,细胞图像分析已经成为生物图像分析领域的重要内容,是学术界的研究热点之一。其中,细胞图像定量分析的应用也十分广泛,比如细胞核计数、检测正常的细胞核、分析抗原的靶细胞等,通过这些数据的分析可以帮助医生诊断特定疾病。

早期通过开发广谱的荧光蛋白和纳米晶体在光

学显微技术中的突破性进展,使得细胞运动过程的实时成像迅速发展^[1]。研究学者开始通过手动的方法来对动态实时的细胞序列图像进行量化分析,人工从大量的图像帧中跟踪数以百计的细胞,这项任务本身非常艰巨,加上人工追踪的局限性以及人为的误差,导致分析过程十分耗时,而且分析结果并不准确。随着计算机图像处理技术的发展,出现了大量细胞分割追踪分析算法,通过结合已有的理论知识以及前人的研究数据,使得细胞追踪这一研究更加智能化、更加成熟。

研究学者第一次尝试通过数字图像处理的手段进行细胞自动跟踪可追溯到至少30年前,但是在过去10年,随着计算机硬件的飞速发展以及各种跟踪方法的不断涌现,细胞追踪的算法研究才真正起飞,而且相信在不久以后,通过将这些方法整合到应用软件中,将大大提高细胞分析的工作效率。本文综述了主要的细胞追踪方法,着重比较细胞追踪算法

【收稿日期】2017-09-18

【基金项目】上海市浦江人才计划项目(15PJ1406100)

【作者简介】杨利,硕士研究生,研究方向:图像处理,E-mail: 547179342@qq.com

【通信作者】蔡文杰,博士,副教授,研究方向:图像处理,E-mail: wen-jiecai@aliyun.com

的优缺点,并讨论了细胞追踪后的量化分析参数。

1 细胞图像追踪

1.1 细胞图像的特殊性

细胞图像处理中经常遇到的问题就是细胞的消失、细胞形态的改变以及新细胞的出现,这是由于在延时拍摄过程中,显微镜的视野固定不变,而细胞是在不断运动的,有些细胞迁移到视野外,有些视野外的细胞迁移到视野中,甚至能拍摄到细胞有丝分裂,有时细胞间也会发生重叠导致图像前一帧中的细胞在后一帧中丢失。细胞追踪过程中参数会产生形态和数量上的改变,所以细胞图像追踪有别于一般的目标追踪,加大了序列图像细胞追踪的难度。

1.2 细胞图像追踪的主要步骤

细胞图像追踪主要分为3个部分,分别是图像预处理、细胞追踪与量化分析,其中细胞追踪是本文的重点探讨内容。首先对细胞序列图像进行预处理,提升图像质量;然后对预处理过的每一帧图像中的细胞移动位置进行细胞定位,并画出移动轨迹;最后对结果数据进行量化分析,这就是细胞图像追踪的全过程。

2 图像预处理

对图像进行预处理是最基本也是最至关重要的一个步骤,显微镜直接拍摄的原始细胞图像序列由于灰度以及对比度的影响,细胞与背景的灰度值相似,导致图像中的细胞难以进行后续的分割与追踪,所以在进行细胞追踪之前,我们必须先对图像进行预处理(图1)。在预处理过程中,常用的方法有边缘检测、灰度直方图均衡和运用滤波器进行滤波等方法。

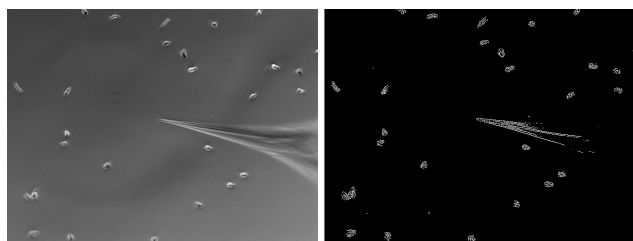


图1 原始细胞图像和预处理后的图像

Fig.1 Original cell image and the preprocessed image

3 细胞追踪

大多数的追踪算法由两个独立的部分组成:(1)细胞检测,即查找每一帧图像中的每个细胞;(2)细胞跟踪,即随时间的顺序识别和跟踪每个细胞,通过

时间的连续性重建出其运动轨迹。

首先利用已知的图像处理方法,如水平集^[2]、小波变换^[3]、阈值分割法^[4]和基于轮廓算法^[5]等来进行细胞检测,锁定图像中的每一个细胞位置。接着为细胞跟踪设置算法,通过该算法,在随后的图像中识别给定的细胞。简单的跟踪方法则为寻找邻近的细胞^[6-7],而更复杂的方法则通过使用特定的模型来描述细胞与其自身的相似性,例如图像配准^[8]、活动轮廓^[9-10]和马尔可夫模型等,这些算法能够随着各种细胞特征的变化而进行同步变化。

可通过提取图像帧中的信息来进行细胞跟踪,得到显微镜视频中的多个细胞的运动轨迹及其形态参数。然而由于细胞形态会随着图像帧的改变而变化,为了追踪细胞随时间变化的完整过程,需要运用定义细胞轮廓的追踪方法,主要分为基于分割的细胞追踪算法、基于随机滤波的细胞追踪方法和基于模型的细胞追踪方法。

3.1 基于分割的细胞追踪方法

常运用到的方法有阈值分割法和拓扑模型分割法等。阈值分割法是将灰度图像变换为二值图像以达到分割目的的方法,它是一种简单且十分有效的方法,特别是当不同的物体或结构之间有很大的强度对比时,能够通过阈值分割的方法得到很好的效果。基于阈值的细胞分割方法为了去除一些无关区域,需先对图像进行预处理,再通过阈值化进行初步的粗分割,分割出细胞的大致区域,为了得到更为精细的细胞形态,后期需要结合其他追踪算法(如使用基于形态学的分水岭方法、拓扑约束方法等)来对粗分割后的结果进行后续细分割以及追踪,从而得到更加理想化的细胞形态及运动轨迹。拓扑模型分割法是一种基于拓扑路线的细胞追踪方法,将拓扑路线和图像分割相融合来获得更准确的追踪效果。采用拓扑路线的方法来检测和分析活动细胞的流动性,能够明确考虑分割完成后的固有问题,提高细胞跟踪分割的性能,同时还提高分裂细胞的检测性能。该方法能够连接每一帧之间的分割,有效地减少虚假检测和虚假轨迹。

3.2 基于随机滤波的细胞追踪方法

模糊C均值聚类方法主要用于分割图像前景区域中包含个体细胞和细胞簇的区域,然而该方法在处理大样本数据时会耗费大量的时间和空间资源,而且对于信噪比低的图像,处理效果不佳,算法速度过于缓慢。许多学者在缩短计算时间与研究空间信息角度进行改进,其中2rFCM通过降低图像分辨率来减少样本数量从而缩短算法计算时间,然而计算

数量的降低会导致有用信息丢失,分割效果不佳^[11]; Hung等^[12]通过选取恰当的聚类中心来减少计算量,缩短迭代时间,但这种方法不具有通用性。在研究空间信息方面,Krisnapuran等^[13]提出了PCM算法,以FCM为初始划分,再对隶属度做精确的计算,然而这种方法必须预先设定部分参数,有一定的局限性; Wang等^[14]引入了以表征领域像素对中心像素作用的第一先验概率来重新确定当前像素的模糊隶属值方法; SKFCM方法则利用新颖的空间函数变换来抑制噪声的干扰^[15]。

与其他的细胞追踪算法相比,模糊C均值聚类方法算法适合实时跟踪,对细胞变形、细胞旋转和细胞图像背景变化不敏感,在许多情况下具有鲁棒性,而且作为非参数估计算法,更为容易与其他算法配合使用。

3.3 基于模型的细胞追踪方法

基于模型的细胞追踪方法,是细胞分割最常使用到的方法,常见的有主动轮廓、水平集^[16-18]和模板匹配这3种方法。

主动轮廓模型是一种常用的细胞分割方法,又称为Snake算法,其思想是通过构造能量泛函梯度流计算和最小化能量函数使轮廓曲线逐渐收敛到目标边缘,实现分割目的,具有很强的抗噪性能和很好的鲁棒性^[19]。在提出的许多用于分割和跟踪的方法中,主动轮廓的方法已有大量文献证明其对于大范围的应用是成功的,并特别适用于高度生物细胞的可变形特性。

然而,主动轮廓和模糊C均值聚类方法都无法解决基本形式细胞的有丝分裂。细胞簇的快速运动、细胞边缘不明显以及细胞簇中多个细胞的密切接触都会引起匹配错误。相比于模糊C均值聚类方法和基于主动轮廓的方法,基于水平集的细胞追踪算法在执行过程中呈现的效果更好,可以处理有丝分裂过程中细胞拓扑的变化。

在主动轮廓的细胞追踪算法中,基于水平集的算法运用在细胞追踪领域十分强大,具有很多优点,如易于实施、以区域为基础、对噪音具有较强鲁棒性。水平集方法的两个概念由Osher等^[20]提出。首先,水平集的算法可以应用在更高维空间中,而非参数化模型的分割不能上升到高维空间的分割中;其次,水平集算法中的轮廓曲线在追踪过程中可根据细胞自身的平均曲率而进行演变。Mumford等^[21]在此基础上进行改进,通过分段平滑的方法进行图像分割。之后Chan等^[22]提出的改进的基于区域的图像分割设置水平集的方法得到了广泛的运用。然而,

基于水平集的方法在细胞快速运动或细胞从视野中的出现或消失的情况下需要重新定义模型。

近年来,较为新颖的细胞追踪方法是利用细胞间的拓扑关系用图模型进行描述,利用图像中的一个细胞进行定位从而寻找到其他相似结构的细胞进行顶点匹配,简化了复杂的细胞跟踪问题^[23],最后描绘出每一细胞以及细胞簇的运动轨迹,得到细胞追踪的最终结果。

4 量化分析

在细胞追踪的基础上,研究细胞的动态参数在生物研究中都起到了重要的作用,如伤口愈合实验、干细胞制造等。在生物研究中,需要分析研究在不同的药物作用情况下伤口愈合的过程,具体观察细胞从伤口边缘向受伤区域迁移的整个过程,在此过程中通过观察细胞迁移过程,定量分析大量细胞的形态变化和速度的变化,从而研究出有效的新药物。所以为了使细胞追踪的结果得以更好的分析使用,我们需要实时监控细胞的生长速度、细胞数量的增减和细胞分裂快慢等情况,从而对最后的结果进行量化分析,以便于临床使用。量化分析的内容主要以研究细胞运动特征的参数为主,其中主要有位移变化参数、面积变化参数、形状变化参数等^[24]。在活细胞定向迁移实验中,通过分析每一个单细胞的运动轨迹,可以推算出细胞的运动速度、运动距离、趋化速度、趋化指数和方向持续性等^[24],这些指标均可用于客观评价细胞在各种外环境作用下的运动和趋化能力。

5 结论

本文总结了3大类细胞跟踪算法,分别列举了分割和追踪精度良好并且较为常用的细胞追踪算法。然而这些算法都有各自的局限性,例如均值偏移算法无法处理细胞分裂的情况,并且在密集细胞出现的情况下会导致误分割;水平集算法可以解决细胞分裂以及拓扑结构变化的问题,然而一旦细胞快速移动以及细胞突然消失在视野中等情况出现时,无法实现继续追踪,需要重新进行初始化来进行下一步的追踪。在分割的方法中,如果最初采用的分割方法无法对原始图像中的细胞进行精确分割,容易导致追踪的错误,无法获得细胞形状、运动变化等有效信息。

为了提高细胞追踪效果,正确的图像预处理至关重要,比如通过膨胀腐蚀对图像进行开操作和闭操作可以解决部分细胞填充不完全的问题。引入机

机器学习结合细胞追踪的算法来训练自动分割追踪的模型,能够大大提高处理效率和追踪的准确性。面对复杂的序列显微镜图像,采用单一的细胞追踪算法难以达到理想的追踪效果,多种算法结合可以实现优势互补从而达到较为精确的细胞分割追踪。如何智能并准确地进行细胞图像的定量分析仍是图像分析领域的重要研究方向,必将推动生物医学的进一步发展。

【参考文献】

- [1] ZIMMER C, MARIN J C. Coupled parametric active contours[J]. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 2005, 27(11): 1838-1842.
- [2] ZIMMER C, LABRUYERE E, YEDID V M, et al. Marin, segmentation and tracking of migrating cells in video microscopy with parametric active contours: a tool for cell-based drug testing[J]. IEEE Trans Med Image, 2002, 21(10): 1212-1221.
- [3] CHEN X, ZHOU X, WONG S T. Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2006, 53(4): 762-766.
- [4] DEBEIR O, HUM P V, KISS R, et al. Tracking of migrating cells under phase-contrast video microscopy with combined mean shift processes[J]. IEEE Trans Med Image, 2005, 24(6): 697-711.
- [5] ZHOU X, LI F, YAN J, et al. A novel cell segmentation method and cell phase identification using Markov model[J]. IEEE Trans Inf Technol Biomed, 2009, 13(2): 152-157.
- [6] WANG X, WANG Y, WANG L. Improving fuzzy c-means clustering based on feature weight learning[J]. Pattern Recognit Lett, 2004, 25(10): 1123-1132.
- [7] HAND A J, SUN T, BARBER D C, et al. Automated tracking of migrating cells in phase-contrast video microscopy sequences using image registration[J]. J Microscopy, 2009, 234(1): 62-79.
- [8] SHEN H, NELSON G, KENNEDY S, et al. Automatic tracking of biological cells and compartments using particle filters and active contours[J]. Chemometr Intell Lab Syst, 2006, 82(1): 276-282.
- [9] LI K, CHEN M, KANADE T, et al. Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context[J]. Med Image Anal, 2008, 12(5): 546-566.
- [10] STANLEY O, SETHIAN J A. Fronts propagating with curvature-dependent speed: algorithm based on Hamilton-Jacobi formulation[J]. J Comput Phys, 1988, 79(1): 12-49.
- [11] KE J. Fast accurate fuzzy clustering through reduced precision[D]. Tampa Bay: University of South Florida, 1999.
- [12] HUNG M C, YANG D L. An efficient fuzzy C-means clustering algorithm[C]. Proceedings of IEEE International Conference on Data Mining. IEEE: San Jose, 2001: 225-232.
- [13] KRISHNAPURAN R, KELLER J M. A possibilistic C-means algorithm[J]. IEEE Trans Fuzzy Syst, 1993(2): 100-112.
- [14] WANG X, WANG Y, WANG L. Improving fuzzy C-means clustering based on feature weight learning[J]. Pattern Recognit Lett, 2004, 25(10): 1125-1132.
- [15] ZHANG D Q, CHENS C. A novel kernelized fuzzy C-means algorithm with application on medical image segmentation[J]. Artif Intell Med, 2004, 32(1): 37-50.
- [16] NILANJAN R, ACTON S T, LEY K. Tracking leukocytes *in vivo* with shape and size constrained active contours[J]. IEEE Trans Med Imaging, 2002, 21(10): 1222-1235.
- [17] PADFIELD D, RITTSCHER J, THOMAS N, et al. Spatiotemporal cell cycle phase analysis using level sets and fast marching methods[J]. Med Image Anal, 2009, 13(1): 143-155.
- [18] YANG F, MACKEY M A, IANZINI F, et al. Cell segmentation, tracking, and mitosis detection using temporal context [C]. International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, 2005: 302-309.
- [19] DUFOUR A, SHININ V, TAJBAKHS S, et al. Segmenting and tracking fluorescent cells in dynamic 3D microscopy with coupled active surfaces[J]. IEEE Trans Image Process, 2005, 14(9): 1396-1410.
- [20] OSHER S, FEDKIW R. Level set methods: an overview and some recent results[J]. J Comput Phys, 2001, 169(2): 463-502.
- [21] MUMFORD D, SHAH J. Optimal approximations by piecewise smooth functions and associated variational problems[J]. Commun Pure Appl Math, 1989, 42(5): 577-685.
- [22] CHAN T F, VESE L A. Active contours without edges[J]. IEEE Trans Image Process, 2001, 10(2): 266-277.
- [23] 汤春明, 董莎莎, 宁燕博, 等. 拓扑约束结合匈牙利算法在神经干细胞追踪中的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2012, 29(4): 598-603.
- [24] TANG C M, DONG S S, NING Y B, et al. Tracking of neural stem cells in high density image sequence based on topological constraint combined with Hungarian algorithm [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2012, 29(4): 598-603.
- [24] 蔡文杰, 王铭洁. 体外活细胞定向迁移研究方法的建立[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(11): 1620-1623.
- CAI W J, WANG M J. Assessment of live cell chemotaxis *in vitro*[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(11): 1620-1623.

(编辑:谭斯允)