

文章编号:1001-9081(2010)11-2991-04

线粒体形态学全自动定量分析方法

王永平,许科帝,郑筱祥

(浙江大学 生物医学工程与仪器科学学院,杭州 310027)

(zxx@mail.bme.zju.edu.cn)

摘要:为快速准确地对线粒体形态进行定量分析,提出了一种基于多方向模板响应和追踪的定量方法。该方法先从原始图像中提取种子点,建立16对方向模板。通过模板响应矩阵确定准中心点处的线粒体边界及中心位置。然后从种子点出发,利用边界和中心点进行追踪,得到线粒体的个数、平均长度、平均面积等特征参数。实验结果表明:正常组和游离胆固醇过载的病变组平滑肌细胞内线粒体形态有显著性差异($P < 0.05$),该方法较现有半自动定量方法处理速度更快,准确率更高。

关键词:线粒体图像;多方向模板;追踪;定量;特征提取

中图分类号: TP391.41 **文献标志码:** A

Automatic quantitative analysis on mitochondrial morphology method

WANG Yong-ping, XU Ke-di, ZHENG Xiao-xiang

(College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China)

Abstract: In order to achieve fast and accurate quantification on the feature of mitochondrial structure, a new method based on multi-directional template response and tracing algorithm was presented. Firstly, the seed points were selected from the original mitochondrial images. Edge points and centerline points of mitochondria structure were detected using directional template response on 16 directions. Then, it initiated from the seed points, and automatically traced the mitochondrial structure recursively by detecting the edge points. The number, average length and average area of mitochondria were calculated from the tracing process. The experiments show that mitochondrial morphology is significantly different ($P < 0.05$) between controls and smooth muscle cells with overloaded free cholesterol. The proposed approach is more efficient and more accurate than the interactive method.

Key words: mitochondrial image; multi-directional template; tracing; quantification; feature extraction

0 引言

线粒体是哺乳动物细胞内最重要的能量器官。线粒体可以通过一系列复杂的信号调控细胞内多种生理、病理过程^[1]。细胞中线粒体通常为网状线状,不同细胞环境中线粒体的形态结构也有所不同,会呈现圆球状短棒状。线粒体之间通过不停的分裂融合改变其形态结构^[2-3],而其结构变化与线粒体的功能发挥以及细胞的整体状态有着密切的联系。例如在细胞凋亡早期线粒体的网状结构往往最先发生崩裂,线粒体外膜通透孔打开,线粒体发生形变,线粒体内容物外泄^[4-5]。对线粒体形态学定量分析,可以为细胞状态和功能变化研究提供非常关键的数据支持。

目前,线粒体形态学研究主要有人工观察^[4,6]、手工描绘^[7]和软件半自动分析^[1,5,8-9]的方法。人工观察定性描述线粒体的形态和数量的差异。手工描绘对线粒体形态手工描述,测量线粒体的长度,实现了定性到定量的跨越。半自动分析采用图像处理软件 ImageJ 等对细胞中的线粒体形态和数量进行统计分析,大大提高了效率。但这些分析方法仍存在一定的缺陷。手工操作繁琐、耗时、重复性差,对于成百上千的线粒体图像序列分析效率极低。软件分析效率较高,但仍需人工参与;另外 ImageJ 等是通用软件,并不是专业线状结构处理软件,对线粒体中大量存在的线状、网状结构的形态

定量统计结果误差非常大。

为了避免手工繁杂,提高效率,同时准确、客观、定量地反映线粒体形态特征,本文提出了一种新的分析方法。根据线粒体呈长条状、宽度在一定范围内、有的线粒体呈现网孔状的形态学特征,开发了基于多方向模板响应和追踪算法的全自动参数可调、形态描述准确的定量分析系统。

1 种子点选取

这里的种子点指的是处于线粒体片段的中心或中心附近的点,以这些点为起始点进行追踪。已有的种子点选取方法^[10-11]采用网格的方法,采用该方法如果网格小,选取的种子点多,同一片段上可能有冗余种子点;如果网格大,选取的种子点少,可能会遗漏。另外筛选种子点的规则也比较复杂。

这里将种子点选取方法进行了改进。首先,为了避免后续处理时将图像中的噪声放大,使得噪声点误判断为种子点,对原图均值滤波,滤除噪声的影响。再用 5×5 高通滤波器对图像进行锐化处理。对锐化后的图像进行二值化,阈值选取图像最大灰度值的 90%。对二值图像的连通区域进行标记,得到各个连通区域的中心作为种子点。

2 多方向模板响应

多方向模板响应是追踪的前提。通过方向模板对图像进

收稿日期:2010-05-11;修回日期:2010-07-21。 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770596/H1809)。

作者简介:王永平(1984-),女,山西晋中人,硕士,主要研究方向:显微图像处理、图像分割、图像定量分析; 许科帝(1982-),男,浙江宁波人,博士,主要研究方向:生物成像、细胞生物学; 郑筱祥(1945-),女,浙江杭州人,教授,博士生导师,博士,主要研究方向:定量与系统生理、神经工程、药效筛选、筛选方法学。

行操作,通过得到的响应值判断线粒体边界和走向。

2.1 方向模板定义

二维空间从水平方向 0° 开始,逆时针等分量化为 16 个方向,相邻方向间隔 22.5° 。每个方向构造左右两个对称模板,分别探测左右边界。图 1 为方向模板示例,图(a)、(b)分别为 0° 方向左右模板,其余方向的模板通过旋转 0° 方向模板得到^[10];图(c)所示为 0° 方向左模板旋转 22.5° 后得到的 22.5° 方向的左模板。这些模板在垂直于线粒体方向上起低通微分作用,在平行于线粒体方向上进行平滑。选取权重值为 1 和 2,同时各个方向模板的权重值的和相同,这样当所有方向模板对线粒体边缘的像素点进行操作时,可以保证相关性最大的方向上模板响应值最大。

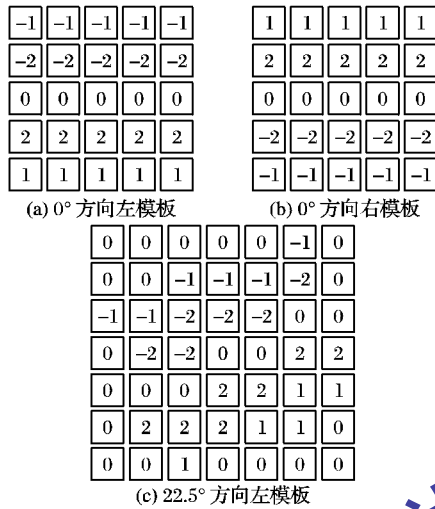


图1 方向模板举例

2.2 方向模板响应计算

二维空间中的 16 个方向记为 $D(i)$, $i = 0, 1, \dots, 15$ 。第 i 方向的左右模板分别记为 $T_L(i)$ 、 $T_R(i)$ 。在点 $P(x, y)$ 处,第 i 个方向的左右模板响应分别为:

$$TR_L(x, y, i) = \sum_{(r, c)} I(x + r, y + c) T_L(r, c, i)$$

$$TR_R(x, y, i) = \sum_{(r, c)} I(x + r, y + c) T_R(r, c, i)$$

其中: r 表示模板中的行, c 表示模板中的列。在 $P(x, y)$ 处,各个方向的模板沿着与其自身中轴垂直的方向平移,左模板沿 90° 方向,右模板沿 -90° 方向。将包括平移距离的左右模板响应值存储在矩阵 $TR_L(x, y, i, d)$ 和 $TR_R(x, y, i, d)$ 中。

$$TR_L(x, y, i, d) = \sum_{(r, c)} I(x + r, y + c, d) T_L(r, c, i)$$

$$TR_R(x, y, i, d) = \sum_{(r, c)} I(x + r, y + c, d) T_R(r, c, i)$$

其中: d 为模板平移宽度,最大为 $M/2$, M 为期望的线粒体宽度。

在某方向、某平移距离,当 $P(x, y)$ 所在处线粒体边界和模板的中轴重合时,模板响应值最大。记录 $P(x, y)$ 处模板响应的最大值在左右模板响应矩阵中的位置,根据该位置和模板方向及平移距离的相关性,得到 $P(x, y)$ 处对应的左右边界及线粒体走向。具体方法如下:

$$Re_{L, \max} = \max(TR_L(x, y, i, d))$$

$$Re_{R, \max} = \max(TR_R(x, y, i, d))$$

其中 $Re_{L, \max}$ 、 $Re_{R, \max}$ 分别为左右模板响应的最大值。

选取 32 个方向中响应值最大,即 $Re_{L, \max}$ 、 $Re_{R, \max}$ 中较大值确定 $P(x, y)$ 处线粒体走向 \vec{D} :

$$\vec{D} = \arg \max_i \{ Re_{L, \max}, Re_{R, \max} \}$$

左右模板在 \vec{D} 方向上最大响应值对应的平移宽度分别记为:

$$d_L = \arg \max_d (TR_L(x, y, \vec{D}, d))$$

$$d_R = \arg \max_d (TR_R(x, y, \vec{D}, d))$$

2.3 左右边界和中心点的确定

通过平移宽度 d_L 、 d_R 以及对应的线粒体走向 \vec{D} ,可以得到 $P(x, y)$ 点处左边界点 $E_L(x_L, y_L)$,右边界点 $E_R(x_R, y_R)$ 和中心点 $C(x_C, y_C)$ 的位置:

$$\begin{cases} x_L = x - d_L \times \vec{u}_D \\ y_L = y - d_L \times \vec{u}_D \\ x_R = x - d_R \times \vec{u}_D \\ y_R = y - d_R \times \vec{u}_D \end{cases}$$

$$\begin{cases} x_C = \min(x_L, x_R) + \frac{\max(x_L, x_R) - \min(x_L, x_R)}{2} \\ y_C = \min(y_L, y_R) + \frac{\max(y_L, y_R) - \min(y_L, y_R)}{2} \end{cases}$$

其中 \vec{u}_D 为线粒体走向的单位向量。

3 追踪

通过 $P^n(x^n, y^n)$ 点处对应中心点 $C^n(x_C^n, y_C^n)$ 和线粒体的走向 \vec{u}_D ,迭代得到下个堆中心点 $P^{n+1}(x^{n+1}, y^{n+1})$ 的位置:

$$P^{n+1} = C^n + \alpha \times \vec{u}_D$$

其中 α 为迭代步长。

3.1 种子点起始方向确定

在种子点处,从两个相反的起始方向对目标进行追踪。通常分别以左右模板响应最大值对应的方向 \vec{D}_L 和 \vec{D}_R 作为起始方向。但由于线粒体灰度分布不均匀,可能会造成 \vec{D}_L 和 \vec{D}_R 夹角小于 90° 。如果 \vec{D}_L 和 \vec{D}_R 夹角小于 90° ,比较其对应的方向模板响应值,选取响应值较小方向的反方向作为一个起始方向,另一起始方向不变。

3.2 线粒体走向判断

线粒体走向在一定范围内是平滑的,因此可以利用 \vec{D}^{n-1} 计算当前点 \vec{D}^n 的模板响应。计算当前点在 $(\vec{D}^{n-1} - 90^\circ, \vec{D}^{n-1} + 90^\circ)$ 方向范围内的响应,而不需计算所有 16 个方向的响应,大大提高计算效率。Zhang 等人^[12] 计算 $(\vec{D}^{n-1} - 22.5^\circ, \vec{D}^{n-1} + 22.5^\circ)$ 范围,虽然提高了计算效率,却带来了较大的计算误差。

3.3 中心线信息矩阵 CenNet

中心线信息矩阵 **CenNet** 用来存储检测到的中心点相关信息,在迭代过程中得到的中心点及其相应边界、宽度、长度、节点等信息记录在 **CenNet** 中。**CenNet** 也用来避免重复追踪。

3.4 追踪终止类型

- 1) 模板对当前点进行操作时,模板越过了图像边界。
- 2) 输入点某一邻域范围内已有标记的中心点。邻域范围选取以当前点为圆心, \vec{D}^{n-1} 为对称轴,长度为 2α 的扇形范围。
- 3) 当前点处左右模板响应的最大值和小于某个阈值 T , 阈值 T 的设定参考 Can 等的方法^[10]。

3.5 种子点到细胞中所有线粒体的追踪算法

- 1) 从种子点开始确定两个相反的起始方向 \vec{D}_L 和 \vec{D}_R 。
- 2) 从 \vec{D}_L 开始进行追踪,追踪过程中,每个点相关信息记录在 **CenNet** 中,直到满足终止条件,得到片段 **SegL**,标记终止类型。

3) 从 \bar{D}_R 方向进行追踪,保存相关信息在 *GenNet* 中,直到终止,标记终止类型,得到片段 *SegR*。

4) 将 *SegL* 和 *SegR* 在种子点处连接,标记片断号,表示以该种子点得到的线粒体片段。

5) 如果 2) 或 3) 中的终止类型是和已标记过的片断相交,更新当前线粒体号和已有线粒体号一致,这样所有相交的线粒体只有一个线粒体标号,表示同一线粒体。

6) 重复 1) ~ 5), 直到没有新的种子点。

4 实验结果

4.1 线粒体图像来源

实验中使用培养的大鼠平滑肌细胞线粒体作为实验对象。采用过量的游离胆固醇载入来模拟动脉粥样硬化过程中平滑肌细胞的泡沫化病变过程,实验过程中将平滑肌细胞分为正常组和病变组^[13-14]。采用转染 pDsRed2-mito 质粒的办法实现对细胞内线粒体的荧光标记。细胞内线粒体荧光显微图像使用 Olympus 倒置荧光显微镜拍摄 (60 ×, NA = 1.45, Olympus IX81)。

4.2 线粒体形态定量分析结果

拍摄获得的正常组和病变组的平滑肌细胞典型图像如图 2 所示,从图中可以看出,正常组的平滑肌细胞内线粒体呈现出网状和线条状结构。经过游离胆固醇刺激平滑细胞后,大部分线粒体发生了断裂,呈现出圆球状、短棒状的结构,线粒体的体积大大降低。

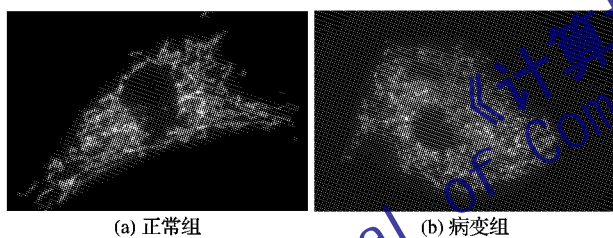


图 2 线粒体图像

使用本系统对正常组和病变组细胞中线粒体形态特征分别进行统计。线粒体期望宽度值 M 选取 10, 迭代步长 α 选取 2。统计参数包括单个细胞中线粒体数量、单个线粒体的平均长度和平均面积。结果对比如图 3 所示。

结果显示,正常平滑肌细胞内平均含有 39.08 ± 7.60 个线粒体,这一数据在过量游离胆固醇载入的细胞中增加到了 159.83 ± 49.27 个,具有显著性的差异 ($P < 0.05$)。过量游离胆固醇处理的平滑肌内的单个线粒体平均面积 315.28 ± 132.59 要远小于正常组 767.41 ± 47.17 。线粒体平均长度也呈现相同的数量特征,过量游离胆固醇载入的细胞中为 49.93 ± 20.30 , 比正常组 124.01 ± 7.39 要小很多。通过本系统分析可以看出,在游离胆固醇过载的病变条件下,线粒体数量明显增多,平均长度和面积显著下降。这些数量特征定量的反映了线粒体的从网状线状到圆球状短棒状的结构变化,为线粒体形态学变化研究提供数据参考。

4.3 本文方法和 ImageJ 算法比较

将本系统定量和现有常用软件 ImageJ 定量办法进行比较,以手工分割计数作为评价的参考标准。3 位观察者独立对细胞的线粒体图进行手动描绘得到线粒体中线,3 组观察结果的均值作为参考标准。图 4(a) 为正常组中一个细胞中的线粒体图像。用手工、本系统和 ImageJ3 种方法对该细胞

中线粒体的形态特征进行了定量统计和比较分析。图 4(b) 中线粒体上中心处的黑线为本系统提取中心线结果。

分析结果如表 1 所示。手工计数得到的参数值记为 n_M , 本系统自动分析得到的参数值记为 n_A , ImageJ 半自动统计得到的参数值记为 n_H 。为本文方法和手工比较的偏差,计算公式为 $e_A = |(n_A - n_M)/n_A|$, e_I 为 ImageJ 处理和手工比较的偏差,计算公式为 $e_I = |(n_I - n_M)/n_I|$ 。

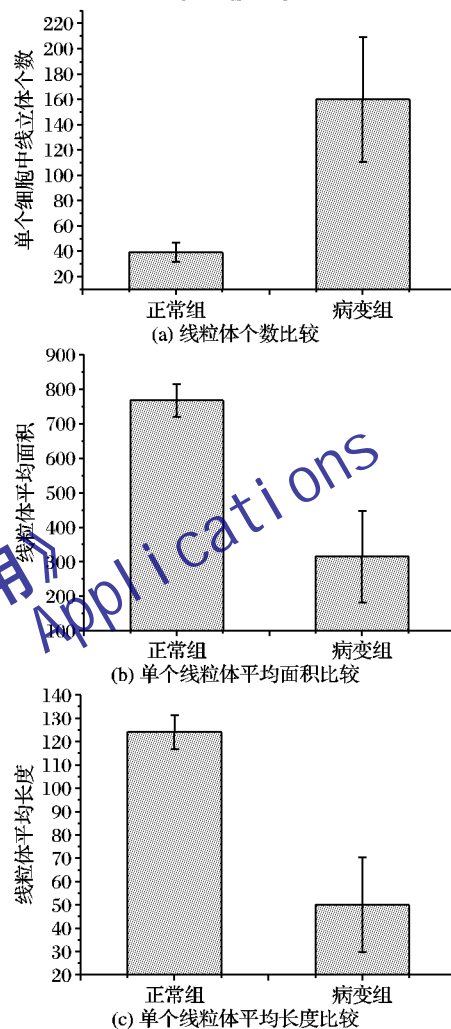


图 3 定量分析统计结果

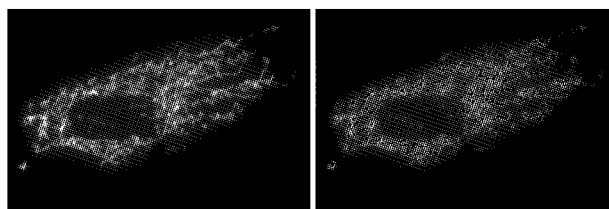


图 4 线粒体中心线提取结果

表 1 本文方法和 ImageJ 算法比较

比较项	n_M	n_A	n_I	$e_A/\%$	$e_I/\%$
总个数	52.00	45.00	302.00	13.46	480.77
总面积	22021.00	24004.00	9420.00	9.01	57.22
总长度	5559.00	5160.00	N/A	7.18	—
平均面积	423.48	533.42	31.19	25.96	92.63
平均长度	106.90	114.67	N/A	7.27	—

从表 1 中可以看出,与 ImageJ 线粒体形态分析方法相比,本文方法具有很大的优势。首先,采用本文方法得到的总

个数、总面积、平均面积几个重要形态描述参数的计算误差远小于 ImageJ 算法。其次,本文方法可以计算总长度和平均长度这些形态参数,而 ImageJ 无法计算。最后,从耗时来看,在相同硬件环境下,手工分割需约 0.5 h 完成中心线描绘和计数,ImageJ 交互式处理需 5 min,本文方法平均只需不到 2 min 就可完成,对多帧图像处理有很大的优势。

5 结语

本文基于模板响应和追踪算法对细胞中线粒体形态进行全自动分析。通过多方向模板响应能准确检测线粒体边缘和中心线,追踪和中止原则保证了线粒体个数和长度的测量。对不同细胞环境下细胞的线粒体形态参数进行统计,结果具有显著性差异。与当前通用半自动处理方法比较,具有较高的准确率和处理速度,并且提供了更多的形态定量参数。本文方法可以为其他现状或网状结构如神经元细胞,眼底血管以及指纹等图像的形态描述提供参考。

参考文献:

- [1] KOOPMAN W J, VISCH H-J, SMETINK J A, *et al.* Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts [J]. *Cytometry, Part A*, 2006, 69A (1): 1-12.
- [2] DETMER S A, CHAN D C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics [J]. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2007, 8(11): 870-879.
- [3] CHAN D C. Mitochondrial dynamics in disease [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356(17): 1707-1709.
- [4] KARBOWSKI M, YOULE R J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2003, 10(8): 870-880.
- [5] PARRA V, EISNER V, CHIONG M, *et al.* Changes in mitochon-

drial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis [J]. *Cardiovascular Research*, 2007, 77(2): 387-397.

- [6] FENG X, ARIMURA S-I, HIRANO H-Y, *et al.* Isolation of mutants with aberrant mitochondrial morphology from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2004, 79(5): 301-305.
- [7] KENNADY P K, ORMEROD M G, SINGH S, *et al.* Variation of mitochondrial size during the cell cycle: A multiparameter flow cytometric and microscopic study [J]. *Cytometry, Part A*, 2004, 62(2): 97-108.
- [8] PALTAUF-DOBURZYNSKA J, MALLI R, GRAIER W F. Hyperglycemic conditions affect shape and Ca^{2+} homeostasis of mitochondria in endothelial cells [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2004, 44 (4): 423-436.
- [9] KWONG J Q, HENNING M S, STARKOV A A, *et al.* The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 179 (6): 1163-1177.
- [10] CAN A, SHEN H, TURNER J N, *et al.* Rapid automated tracing and feature extraction from live high-resolution retinal fundus images using direct exploratory algorithms [J]. *IEEE Transactions on Information Technology for Biomedicine*, 1999, 3 (2): 125-138.
- [11] AL-KOFAHI K A, LASEK S, SZAROWSKI D H, *et al.* Rapid automated three-dimensional tracing of neurons from confocal image stacks [J]. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 2002, 6(2): 171-187.
- [12] ZHANG Y, ZHOU X, DECHEREV A, *et al.* A novel tracing algorithm for high throughput imaging: Screening of neuron-based assays [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2007, 160(1): 149-162.
- [13] XU K, ZHANG M, WANG Y, *et al.* Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(1): 123-130.
- [14] 王永平. 线粒体动态学图像定量分析系统[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

(上接第 2990 页)

同样使用 RBF 核函数,5 重交叉检验, C 和 γ 的最优值经过实验,分别设定为 1.0 和 1.0,得到的分类正确率为 66.67%。需要指出的是,由于所用数据集的不同以及前期 ROI 提取方法不同,得到的结果并不具备严格的对比意义。

5 结语

通过把图像序列引入肺部节结的自动识别过程,并将图像视为 3 维表面,赋予平面节结图像以立体结构的含义,提取了描述图像序列中节结 3 维表面形状信息及其变化情况的新特征。 C -SVM 分类实验证明所提取的特征能够达到一定的识别精度,且针对所使用的样本来说,相对传统的图像区域特征有一定的优势,但是如何降低对 ROI 大小的敏感性是进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 薛以铎,鲍旭东,马汉林,等. 基于 CT 图像的肺结节计算机辅助诊断系统[J]. *中国医学物理学杂志*, 2006, 23(2): 93-96.
- [2] YE X, LIN X, DEHMESHIKI J, *et al.* Shape-based computer-aided detection of lung nodules in thoracic CT images [J]. *Biomedical Engineering*, 2009, 56(7): 1810-1820.
- [3] 姜慧研,何炜. 基于胸部 CT 图像的肺癌识别方法的研究[J]. *电子学报*, 2009, 37(8): 1664-1668.
- [4] TAKEI K, HOMMA N, ISHIBASHI T, *et al.* Computer aided diagnosis for pulmonary nodules by shape feature extraction [C]// Pro-

ceedings of SICE Annual Conference on the SICE. Washington, DC: IEEE, 2007: 1959-1962.

- [5] AUSTIN J H M, MUELLER N L, FRIEDMAN P J, *et al.* Glossary of terms for CT of the lungs: Recommendations of the nomenclature committee of the Fleischner society [J]. *Radiology*, 1996, 200(2): 327-331.
- [6] ARMATO S G, MCLENNAN G, MCNITT-GRAY M F *et al.* Lung image database consortium: Developing a resource for the medical imaging research community [J]. *Radiology*, 2004, 232(3): 739-748.
- [7] BOROCZKY L, ZHAO L, LEE K P. Feature subset selection for improving the performance of false positive reduction in lung nodule CAD [J]. *Information Technology in Biomedicine*, 2006, 10(3): 504-511.
- [8] WANG H, GUO X H, JIA Z W, *et al.* Multilevel binomial logistic prediction model for malignant pulmonary nodules based on texture features of CT image [J]. *European Journal of Radiology*, 2010, 74(1): 124-129.
- [9] ELCAP and VIA research groups. ELCAP Public Lung Image Database [DB/OL]. [2010-03-05]. <http://www.via.cornell.edu/databases/lungdb.html>.
- [10] THEODORIDIS S, KOUTROUMBAS K. Pattern recognition[M]. 北京: 机械工业出版社, 2006: 169-174.
- [11] CHANG C C, LIN C J. Libsvm [EB/OL]. [2010-04-05]. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>.