DOI:10.16016/j.1000-5404.201906168

一种基于图像分析的细胞微管定量分析方法

兰晓东[1],黄智勇[1],谭子明[1],汤慧英[1],李凌霏[2],王德怀[1] 610017 成都,成都市第二人民医院烧伤整形科[1];400038 重庆,陆军军医大学第一附属医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 基于像素比和粒度分析理论,通过图像处理和分析方法探究客观量化微管结构的方法。**方法** 将常规培养的3 d人脐静脉内皮细胞(HUVEC)按随机数字表法分为正常对照组、微管解聚组和微管聚合组。采用Western blot检测乙酰化α微管蛋白的含量变化。免疫荧光染色后,激光共聚焦显微镜下观察微管形态变化并获取图像。Matlab 7.0编程进行图像分割、增强等处理并提取特征参数。对数据行单因素方差分析、多重比较以及多元判别分析。**结果** ①微管解聚组细胞乙酰化α微管蛋白含量明显低于正常对照组($P<0.05$);微管聚合组细胞乙酰化α微管蛋白含量明显高于正常对照组($P<0.05$)。②正常对照组细胞微管结构完整,围绕核周束状分布,胞质中少量细小荧光斑;微管解聚组细胞微管纤维断裂,胞质中出现大量点样小荧光斑,呈现弥散性分布;微管聚合组细胞微管纤维数量多且粗大,呈多分支且杂乱的放射样分布,胞质中出现较大荧光斑。③正常对照组、微管解聚组和微管聚合组细胞微管荧光图像中像素比和粒度分析参数(平均粒度、分选度、偏度、峰度)组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。④根据上述微管量化特征参数,Fisher多元判别分析的准确率达80.0%。**结论** 微管荧光图像像素比和粒度分析的特征参数可作为微管量化分析的客观指标。

[**关键词**] 微管;图像处理和分析;像素比;粒度分析

[**中图法分类号**] R341;R730.23;R735.35 [**文献标志码**] A

A method for quantitative analysis of cell microtubules based on image analysis

LAN Xiaodong[1], HUANG Zhiyong[1], TAN Ziming[1], TANG Huiying[1], LI Lingfei[2], WANG Dehuai[1] [1]Department of Burns and Plastic Surgery, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan Province, 610021; [2]State key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To develop a method for objective quantitative analysis of microtubule structure based on image processing and analysis of the pixel ratio and particle size. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cultured for 3 d were divided into control group, depolymerization group and polymerization group. Western blotting was performed to detect the changes in the content of acetylated α-tubulin in the cells. Immunofluorescence staining was used to observe the microtubule morphology under a laser confocal microscope, and the acquired images were analyzed using Matlab 7.0 for image segmentation, enhancement, and extraction of the feature parameters. **Results** ①The content of acetylated α-tubulin was significantly lower in cells with depolymerization and significantly higher in cells with polymerization than in the control cells (both $P<0.05$). ②The control cells showed bundles of intact microtubules around the cell nuclei, with a few small fluorescent spots in the cytoplasm. In depolymerization group, the cells presented with broken microtubule fibers with numerous small fluorescent spots distributed diffusely in the cytoplasm. In the polymerization group, a large number of thick microtubule fibers were observed, showing multiple branches with an irregular and roughly radial alignment, and many large

[**通信作者**] 王德怀,E-mail:398174019@qq.com

fluorescent spots were seen in the cytoplasm. ③The parameters for pixel ratio and particle size analysis, including the average particle size, sorting degree, skewness and kurtosis, all differed significantly among the 3 groups ($P<0.05$). ④Based on quantification of these characteristic parameters of the microtubules, the accuracy of Fisher's multivariate discriminant analysis could reach 80.0%. **Conclusion** The pixel ratio and the characteristic parameters for particle size analysis can be used as objective indicators for quantitative analysis of the microtubes in fluorescence images of cells.

[**Key words**] microtubule; image processing and analysis; pixel ratio; particle size analysis

Corresponding author: WANG Dehuai, E-mail: 398174019@qq.com

微管是由微管蛋白原丝组成的不分支中空管状结构,呈网状或束状布满整个细胞,能很快地组装和去组装,以完成一系列细胞功能,如:维持细胞形态、迁移、分裂、物质运输和信号转导等[1]。目前,荧光染色和显微成像是微管的主要研究方法,而这样的形态学定性描述无法避免观察者偏倚等缺陷[2]。细胞免疫荧光染色定性描述微管的技术已相当成熟,这些清晰的图像中包含着众多的数字信息.基于这些微管图像,研究者试图以纹理分析、区域与边界特征、拓扑学分析、动态变化等图像处理和分析方法客观量化微管结构[3-7]。但是,得到的结果似乎都不能足够准确地描述微管的形变特征。本研究基于细胞微管荧光高清数字图像,采用全新的像素比和粒度分析理论,提取微管图像中相应的特征参数,以探寻量化细胞微管形变的新指标.

1 材料与方法

1.1 细胞及主要材料来源

秋水仙碱、紫杉酚、4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、乙二醇双(2-氨基乙醚)、四乙酸(EGTA)、聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)等均购自美国 Sigma 公司。牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Genview 公司。兔抗人乙酰化 α 微管蛋白多克隆抗体、花青素 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗购自美国 ProteinTech 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的抗 GAPDH 抗体购自上海康成生物工程有限公司,增强型化学发光试剂盒均购自美国 Pierce 公司。3131 型二氧化碳培养箱、Varioskan Flash 多功能酶标仪均购自美国 Thermo Scientific 公司,ChemiDoc XRS 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司,LSM700 型激光共聚焦扫描显微镜购自德国 ZEISS 公司。

1.2 细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)由中国科学院细胞库提供,25 代内传代培养,以含 10%(体积分数)FBS 的 DMEM 培养液稀释使细胞密度为 10^7/mL。根据后续实验需要接种至铺有 9 片圆形盖玻片的 12 孔板(每片 100 μL,圆形盖玻片用于微管蛋白免疫荧光染色)、2 个底面积 25 cm^2 细胞培养瓶(每瓶 4 mL,用于乙酰化微管蛋白含量测定)。细胞置于 37 ℃、体积分数 5%二氧化碳细胞培养箱内培养,隔天换液。

将培养的 3 d 细胞按随机数字表法分为正常对照组、微管解聚组和微管聚合组并进行以下相应处理。正常对照组:加入 3 mL 37 ℃复温的 DMEM 培养液,置于 37 ℃、体积分数 5%二氧化碳培养箱培养 30 min。微管解聚组:加入 3 mL 37 ℃复温的含终浓度为 100 nmol/L 秋水仙碱的 DMEM 培养液,置于 37 ℃、体积分数 5%二氧化碳培养箱处理 30 min。微管聚合组:加入 3 mL 37 ℃复温的含终浓度为 100 nmol/L 紫杉酚的 DMEM 培养液,置于 37℃、体积分数 5%二氧化碳培养箱处理 30 min.

1.3 细胞乙酰化 α 微管蛋白含量测定

采用 Western blot 测定。每组取 1 个细胞培养瓶,提取微管蛋白的总蛋白并定量。各取上述 3 种总蛋白样品 10 μg,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿转法转膜、50 g/L BSA 封闭 2 h,切取微管蛋白所在膜区域加兔抗人乙酰化 α 微管蛋白一抗(稀释比为 1∶1 000),切取 GAPDH 所在膜区域加 HRP 标记的 GAPDH(稀释比为 1∶5 000),4 ℃孵育过夜。以 Tris 吐温 20 缓冲液(TBST)漂洗 4 次后,乙酰化 α 微管蛋白(Acetyl-αMT)条带均加 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释比为 1∶4 000)室温孵育 1 h,TBST 再漂洗 4 次。以超敏化学发光试剂曝光,采用 Quantityone 软件进行灰度分析,结果以 Acetyl-αMT 条带与 GAPDH 条带灰度值比值表示。本实验重复 3 次。

1.4 微管图像获取

按文献[8]方法,采用免疫荧光染色法观察。每组设 3 个复孔,37 ℃复温的 PBS 漂洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,PBS 漂洗 3 次,体积分数 0.1% TritonX-100 通透 20 min,PBS 漂洗 3 次,滴加 50 g/L BSA 封闭 2 h。弃 BSA,加入兔抗人 α 微管蛋白多克隆抗体(稀释比为 1∶100)4 ℃孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,加入花青素 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗(稀释

比为1∶100)37 ℃避光孵育1 h,PBS漂洗3次,避光DAPI(稀释比为1∶100)室温染核5 min,PBS液漂洗4次,抗荧光淬灭封片剂封片后于激光共聚焦显微镜下观察。按文献[2]方法操作,设置激发光波长为555 nm,光电倍增管灵敏度为最大,选择×60油镜,目视找到需要检测的细胞,切换到扫描模式。设置50%激发光强度,调整双孔针直径(不宜过大),采用线面平均结合法或调节倍增管偏移(不得大于0%)降低图像背景噪声。设分辨率为1 024×1 024,中速扫描,设置相邻两个光切面间距为0.4 μm,层扫后叠加得到最终图像。选择形态良好、微管结构清晰的单细胞视野采集图像,图像以24位彩色位图、TIF格式储存备用。

1.5 图像处理和分析

1.5.1 图像处理 在各组中随机挑选细胞形态良好,微管骨架清晰的图像作为分析样本,通过图像分割得到单细胞图像各20个。通过中值滤波去噪并平滑图像,以对比度自适应直方图均衡化增强图像对比度[9]。图像预处理后,质量明显改善。

1.5.2 图像分析

1.5.2.1 像素比 微管像素面积占整个细胞像素面积的百分比。根据免疫染色和显微成像的原理,微管解聚后,细胞质中形成了更多的游离微管蛋白或断裂的微管纤维,部分较小的解聚产物将透过细胞膜丢失,同时由于失去了蛋白富集作用,微小的目的蛋白将无法在图像中得以呈现。反之,微管聚合后,游离在细胞质中的微管蛋白和短纤维不会透过细胞膜丢失,而是聚合成新的微管得以在图像中呈现。因此,像素比可作为衡量细胞内微管蛋白含量的量化指标。

通过Matlab 7.0编程以灰度自适应区域生长法,通过自动选取种子点及阈值分割出图像中的微管部分,以Canny算子进行边缘监测后连通的方法标记图像中的细胞部分[9].微管部分与细胞部分的像素面积比即为像素比。

$$像素比=\frac{微管像素数}{细胞像素数}\times 100\%$$

由于采用了区域生长的分割方式,部分孤立的和灰度值低的微管部分可能被忽略,故该参数侧重反应细胞内聚合态微管的相对量。

1.5.2.2 粒度分析 对研究对象颗粒特性的描述,在医药领域已被广泛应用[10-13]。研究中通常是以颗粒分布函数(不同大小粒径颗粒的百分含量)的一些统计量来反应颗粒特性的[14]。游离微管蛋白,长短不一的微管纤维和成熟的微管是微管蛋白在细胞内的存在状态,反应在图像上则是大小长短不一的颗粒。这使得微管蛋白的形态可以用颗粒分析的指标来衡量。

根据粒度分析相关统计量的计算原理[14],通过Matlab 7.0编程提取分割后微管图像粒度分析的4个特征参数。

平均粒度:图像中颗粒的平均大小。平均粒度越大代表微管的聚合程度越高,反之则聚合程度低。

$$M_Z=\frac{\Phi_{16}+\Phi_{50}+\Phi_{84}}{3}$$

标准差:图像中颗粒在大小上的离散情况。

$$\sigma_1=\frac{\Phi_{84}-\Phi_{16}}{4}+\frac{\Phi_{95}-\Phi_5}{6.6}$$

偏度:图像中颗粒大小分布的不对称程度;负值表示颗粒集中在粒径大的部分,绝对值越大代表颗粒越集中在粒径大的部分;正值是颗粒集中在粒径小的部分,绝对值越大代表颗粒越集中在粒径小的部分。

$$SK=\frac{\Phi_{84}+\Phi_{16}-2\Phi_{50}}{2(\Phi_{84}-\Phi_{16})}+\frac{\Phi_{95}+\Phi_5-2\Phi_{50}}{2(\Phi_{95}-\Phi_5)}$$

峰度:用以判断图像颗粒分布是否非常集中于平均粒径附近。峰度越小,表示越集中;反之,表示越分散。

$$K_G=\frac{\Phi_{95}-\Phi_5}{2.44(\Phi_{75}-\Phi_{25})}$$

上列各式中Φ_X即相应于X%处的粒径(Φ值),称之为百分位数,例如Φ_{16}即相应于16%处的粒径Φ值,称为第16百分位数。

标准差、偏度和峰度3个指标反映了微管蛋白或纤维分布的均匀或一致程度。

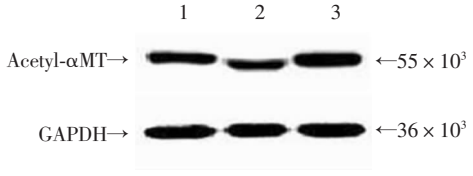
1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,组间进行单因素方差分析,在数据通过方差齐性检验后,可进行Tukey HSD多重比较。采用Fisher多元判别准则对3个实验组数据进行判别分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Acetyl-αMT含量

微管解聚组细胞Acetyl-αMT含量(相对灰度值为0.71±0.02)明显低于正常对照组(0.90±0.04,$P<0.05$);微管聚合组细胞Acetyl-αMT含量(相对灰度值为1.37±0.09),明显高于正常对照组($P<0.05$,图1)。



1:正常对照组;2:微管解聚组;3:微管聚合组

图1 Western blot检测各组HUVEC细胞Acetyl-αMT含量

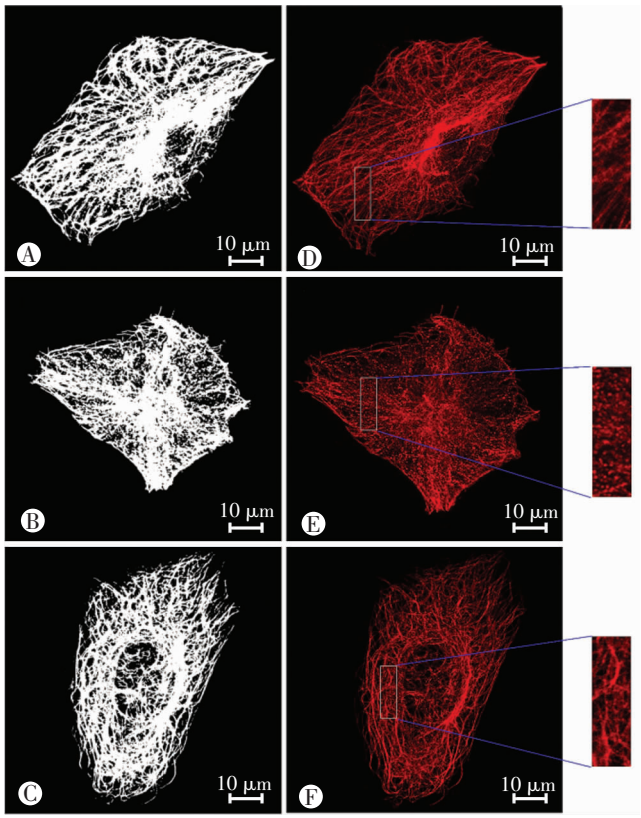
表 1　各组 HUVEC 细胞微管荧光图像量化指标（$\bar{x}\pm s$,$n=20$）

组别	像素比	平均粒度	分选度	偏度	峰度
微管解聚组	0.58±0.03[a]	6.36±0.26[a]	12.45±0.50[b]	0.39±0.08[a]	2.20±0.10[a]
正常对照组	0.65±0.03	6.75±0.24	12.54±0.32	0.26±0.07	2.10±0.06
微管聚合组	0.75±0.07[a]	7.21±0.42[a]	13.06±1.13[b]	0.11±0.14[a]	2.01±0.10[a]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与正常对照组比较

2.2　细胞微管形态

正常对照组细胞微管结构完整,围绕核周束状分布,胞质中少量细小荧光斑;微管解聚组细胞微管纤维断裂,胞质中出现大量点样小荧光斑,呈现弥散性分布;微管聚合组细胞微管纤维数量多且粗大,呈多分支且杂乱的放射样分布,胞质中出现较大荧光斑。区域生长进行图像分割后得到微管图像也具有上述特征(图 2)。



A~C:图像分割后获得的微管部分;D~F:微管激光共聚焦图像原图　图中大框区域为小框区域的放大(2.5 倍);A、D:正常对照组细胞微管结构完整,围绕核周束状分布,胞质中少量细小荧光斑;B、E:微管解聚组细胞微管纤维断裂,胞质中出现大量点样小荧光斑,呈现弥散性分布;C、F:微管聚合组细胞微管纤维数量多且粗大,呈多分支且杂乱的放射样分布,胞质中出现较大荧光斑

图 2　免疫荧光染色观察各组 HUVEC 细胞微管结构和形态　(激光共聚焦显微镜)

2.3　像素比和粒度分析

单因素方差分析结果提示:在 3 种状态下,细胞微管荧光图像的像素比和粒度分析中共 5 个指标差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。方差齐性检验后,以 Tukey HSD 法进行多重比较,结果提示:各组间该指标差异均具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

2.4　Fisher 多元判别分析

利用 Fisher 多元判别准则,对 3 组实验细胞的 5 个特征参数数据进行重新判别(表 2),结果提示:共有 48 个细胞进入了正确的分组,准确率达到 80.0%。

表 2　各组 HUVEC 细胞特征参数的 Fisher 多元判别（$n=20$）

原分组	预测组			总数
	正常对照组	微管解聚组	微管聚合组	
正常对照组	16	4	0	20
微管解聚组	3	17	0	20
微管聚合组	0	5	15	20

3　讨论

微管是真核细胞重要的细胞骨架成分之一,对于维持细胞正常的生理结构和功能至关重要。秋水仙素能特异性地破坏微管组装,并使已形成的微管解聚;紫杉酚能促进微管蛋白聚合,并稳定已形成的微管[15]。乙酰化微管蛋白含量可以间接反应聚合态微管蛋白的含量[16],通过 Western blot 测定 Acetyl-αMT 的含量,确定实验处理条件确实造成了微管的解聚或聚合。另外,免疫荧光图像中也清楚地呈现了相同的微管结构改变趋势。微管解聚后微管纤维断裂,聚合态微管减少,像素比数值较正常对照组小;同时,胞质中出现了数量较多的点样小荧光斑,呈现弥散性分布,这说明荧光颗粒半径小,分布较均匀,因此平均粒径和分选度较正常对照组小,偏度和峰度较正常对照组大。反之,微管聚合后微管纤维数量多且粗大,聚合态微管增加,像素比数值较正常对照组大;同时胞质中荧光斑点变大,呈现类似的束状或放射状分布。这说明荧光颗粒半径变大,分布不均,因此平均粒径和分选度较正常对照组大,偏度和峰度较正常对照组小。

一直以来,有两个方面的缺陷制约了微管传统研究方法的应用:一是观察者主观定性的描述造成的偏

倚;二是观察者肉眼难以把握形变细节。因此,探索一种客观定量的微管分析方法显得尤为重要。目前多采用 Image Pro Plus(IPP)软件计算平均光密度值或平均荧光强度对免疫荧光图像进行半定量分析[17-18],该方法敏感性低,可靠性差。也有学者选用图像灰度特征参数、拓扑和分形参数,甚至是兴趣点运动特征参数等量化微管的动态变化[2-3, 5-7],这些方法均涉及复杂的数学理论且需要专门的观察设备和数据处理软件。本研究利用了像素比和粒度分析的定量分析理论,原理简单,容易理解,且对实验条件无特殊要求,一般的激光共聚焦图片即可作为样本进行分析。本研究全程通过 Matlab 7.0 编程自动获取特征指标参数值,保证了结果的客观性和可比性,更重要的是具有较高准确率。本文选取的像素比和粒度特征参数侧重反应图像全域和大体形态的改变,故无法量化图像局部区域的细节改变,这导致该方法的判别灵敏度降低。

本研究基于微管荧光数字图像,以图像像素比和粒度分析理论为基础,通过图像处理和分析提取了像素比和粒度特征参数中的平均粒度、分选度、偏度、峰度共 5 个量化指标,它们可以客观而准确地量化微管形变。该方法也可应用于细胞其他目的蛋白的量化分析。

参考文献:

[1] ROBERTS K. Cytoplasmic microtubules and their functions [J]. Prog Biophys Mol Biol, 1974, 28: 371-420.

[2] LAN X D, LI L F, HU J Y, *et al*. A quantitative method for microtubule analysis in fluorescence images [J]. Microsc Microanal, 2015, 21(6): 1582-1590. DOI: 10.1017/S1431927615015202.

[3] APPLEGATE K T, BESSON S, MATOV A, *et al*. Plus TipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics[J]. J Struct Biol, 2011, 176(2): 168-184. DOI: 10.1016/j.jsb.2011.07.009.

[4] BUÑO I, JUARRANZ A, CAÑETE M, *et al*. Image processing and analysis of fluorescent labelled cytoskeleton [J]. Micron, 1998, 29(6): 445-449.

[5] DANG Y M, LAN X D, ZHANG Q, *et al*. Analysis of grayscale characteristics in images of labeled microtubules from cultured cardiac myocytes[J]. Microsc Microanal, 2015, 21(2): 334-342. DOI: 10.1017/S1431927615000185.

[6] LU Y, HUANG C Y, WANG J, *et al*. An improved quantitative analysis method for plant cortical microtubules[J]. Sci World J, 2014, 2014: 637183. DOI: 10.1155/2014/637183.

[7] VASSY J, BEIL M, IRINOPOULOU T, *et al*. Quantitative image analysis of cytokeratin filament distribution during fetal rat liver development[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 630-638. DOI: 10.1002/hep.510230331.

[8] XU X, ZHANG Q, HU J Y, *et al*. Phosphorylation of DYNLT1 at serine 82 regulates microtubule stability and mitochondrial permeabilization in hypoxia[J]. Mol Cells, 2013, 36(4): 322-332. DOI: 10.1007/s10059-013-0114-x.

[9] UCHIDA S. Image processing and recognition for biological images[J]. Dev Growth Differ, 2013, 55(4): 523-549. DOI: 10.1111/dgd.12054.

[10] CHEEZUM M K, WALKER W F, GUILFORD W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescentparticles[J]. Biophys J, 2001, 81(4): 2378-2388. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75884-5.

[11] LI K, SCHNEIDER M. Quantitative evaluation and visualization of size effect on cellular uptake of gold nanoparticles by multiphoton imaging-UV/Vis spectroscopic analysis[J]. J Biomed Opt, 2014, 19(10): 101505. DOI: 10.1117/1.JBO.19.10.101505.

[12] BAGHERI-KHOULENJANI S, MIRZADEH H, ETRATI-KHOSROSHAHI M, *et al*. Particle size modeling and morphology study of chitosan/gelatin/nanohydroxyapatite nanocomposite microspheres for bone tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(6): 1758-1767. DOI: 10.1002/jbm.a.34481.

[13] MCALINDEN N, GLASS D G, MILLINGTON O R, *et al*. Accurate position tracking of optically trapped live cells[J]. Biomed Opt Express, 2014, 5(4): 1026-1037. DOI: 10.1364/BOE.5.001026.

[14] FOLK R L, WARD W C. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters[J]. J Sediment Res, 1957, 27(1): 3-26. DOI: 10.1306/74d70646-2b21-11d7-8648000102c1865d.

[15] JORDAN M A, KAMATH K. How do microtubule-targeted drugs work? An overview[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(8): 730-742.

[16] JANKE C, BULINSKI J C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(12): 773-786. DOI: 10.1038/nrm3227.

[17] TENG M, DANG Y M, ZHANG J P, *et al*. Microtubular stability affects cardiomyocyte glycolysis by HIF-1alpha expression and endonuclear aggregation during early stages of hypoxia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(6): H1919-H1931. DOI: 10.1152/ajpheart.01039.2009.

[18] FANG Y D, XU X, DANG Y M, *et al*. MAP4 mechanism that stabilizes mitochondrial permeability transition in hypoxia: microtubule enhancement and DYNLT1 interaction with VDAC1[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e28052. DOI: 10.1371/journal.pone.0028052

(**收稿**:2019-06-21;**修回**:2019-08-04)

(编辑 黄 超)