DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.024

经验交流

用图像分析作交点计数的尝试

Application of intersection counting method in image analysis

张成岗* 蔡文琴 曹云新** 黄威权*** 苏慧慈*** (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室)重庆, 400038

提 要 目的:探讨如何利用图像分析仪定量测量血管表面神经纤维密度。方法:对相同视野中的神经纤维分别采用灰度法和交点计数法进行测量,然后分析二者之间的函数关系,并进行统计学分析。结果:建立了测量血管表面神经纤维密度的灰度法和交点计数法之间的对数关系进行验证。结论:在图像分析仪上可以利用灰度法测量进行神经纤维密度的定量分析。

现有的图像分析仪在分析一些特殊要求的测量时仍然无法满足。例如有时需要对血管表面的神经纤维密度用交点计数法[1]来测量,而目前的图像分析仪却无法实现这个功能[2]。交点计数法的原理是"计数测试线与测试结构界面相交的交点数(Ik),用交点密度(IL)表示单位测试线上具有的交点数 Ik,用 Ic表示测试线长度,则: IL= Ik/Ic"[1]。具体测量血管表面的纤维密度时"于 40× 物镜和 10× 目镜(内装测微网格)下计数长为 1 mm 目镜网格线上纤维的交点数"[3]。它是目前测量纤维密度的一种较为成熟的方法,但是一般是由人工在显微镜下操作进行测量的,所以存在很大缺点,例如所测数据不一定准确,不同的人测量同样的图像时也可能获得不同的测量结果,而且,在遇到大量需要测量的图像时,无法自动、快速地完成测量工作。如果能在图像分析仪上实现交点计数法的测量,显然有很大的实用性。

1 实验方法

常用的图像分析仪中有点测量(Point measurement)、直线测量(Line measurement)、曲线测量(Curve measurement)、面积测量(Area measurement)等测量方式。考虑到交点计数法的方法要求,我们选用直线测量方式。遵循交点计数法的原则[1],在血管表面沿任意方向绘一条直线,直线与血管相交,形成两个交点,交点之间的线段即为测试线。单位长度测试线上的交点数称为交点密度(Df)。通过图像分析仪,可以直接获得这条线段的长度和平均灰度(Mean grey level, Gm)。在这条测试线上,神经纤维越多,它所压过的纤维也就越多(交点密度越大),则其上的平均光密度(αm)也就越大,于是我们设想在交点密度 Df 和平均光密度 αm 之间可能具有线性关系,则 Df 和 Gm 之间应该存在一定的关系。倘此,即可由 Gm 推导出 Df 值,这就意味着在图像分析仪上间接地实现了交点计数法的测量。

为方便计,我们引进以下符号:

I: 测试线(Line)

G: 灰度级别(Grey level)

Gm: L上的平均灰度(m, mean)

Gn: L上无纤维处的灰度(n, no fibre)

Gf: L上有纤维处的灰度(f, fibre)

α: 光密度

αm: L上的平均光密度(m, mean)

αt: L上的总光密度(t, total length)

αn: L上无纤维处的光密度(n, no fibre)

αf: L上有纤维处的光密度(f, fibre)

P: 测试点数(Point number)

Pt: 测试线 L的总长度(t, total length)

Pn: L上无纤维处的测试点数(n, no fibre)

Pf: L上有纤维处的测试点数(f, fibre)

D: 密度值(Density)

Df: 单位测试线长上的交点数,即交点密度(f, fibre)

于是有以下等式:

$$Pt = Pn + Pf \quad (1)$$

$$\alpha t = Pt \times \alpha m \quad (2)$$

$$\alpha t = Pn \times \alpha n + Pf \times \alpha f \quad (3)$$

$$Df = \frac{Pf}{Pt} \quad (4)$$

而已知光密度 α 与平均灰度(G)之间的关系为:

$$\frac{G}{255} = 10^{-\alpha} \quad (5)$$

即 $$\alpha = \lg(255) - \lg(G) \quad (6)$$

* 张成岗,男,29岁,博士,讲师,现为军事医学科学院博士后
** 第四军医大学中心实验室 西安,710032 *** 第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室 西安,710032

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

据此可推导出:

$$Pf = Pt \times \frac{\alpha m - \alpha n}{\alpha f - \alpha n} \quad (7)$$

$$Df = \frac{Pf}{Pt} = \frac{\alpha m - \alpha n}{\alpha f - \alpha n} \quad (8)$$

$$Df = \left[\frac{\lg(Gn)}{\lg(Gn) - \lg(Gf)}\right] - \left[\frac{1}{\lg(Gn) - \lg(Gf)}\right] \times \lg(Gm) \quad (9)$$

式(8)表示出了 Df与 αm的直线相关关系。式(9)表示出了 Df与 Gm的对数相关关系,为用灰度法实现交点计数提供了理论依据。此 Df正是待求的数据。

实际操作时,需先测量出 Gn和 Gf,它们可用点测量方式获得。置光标于测试线上无纤维处,该点的灰度值即为 Gn;置光标于纤维上,该点的灰度值即为 Gf。一般需要多测量几组 Gn和 Gf,取其平均值则更有代表性。随后测出测试线 L的平均灰度(Gm)(图像分析仪自动记录),即可用公式(9)求出交点密度,或可直接以 Gm来作为密度指标(在仅需要相对指标时)。另外,如果需要转化为单位长度上的交点密度,可将 Df乘以一个转化因子(单位长度内的象素点数目)即可。

2　实例分析

我们取用 14张血管铺片按上述方法进行了测量,证实了其中的关系。首先,对每张血管铺片上的神经纤维用测微网格在 40×物镜和 10×目镜放大倍率下用灰度法和交点计数法均做了测量。在 MIAS-300系统下,先用点测量方式按前述方法测量出 Gn与 Gf,随后采用直线测量方式,用鼠标器在血管表面沿任意方向绘一条直线(即测试线),记录此线的长度(Length)、灰度(Grey level)及该线与神经纤维所形成的交点数(Count)。交点密度由二者的比值(Count/Length)获得,此即为 Df。重复此过程,直至获得足够的 Df数据(一般应大于 5次)。选用其中的一例数据,见表 1。

表 1　灰度法和交点计数法测量数据值

Gm	lg(Gm)	Df(测量值)	Df(估计值)	残差
58	1.7634	0.5490	0.5576	-0.0086
58	1.7634	0.5540	0.5576	-0.0036
60	1.7781	0.5600	0.5313	0.0287
55	1.7403	0.5700	0.5988	-0.0288
58	1.7634	0.5740	0.5576	0.0164
53	1.7243	0.6120	0.6276	-0.0156
48	1.6812	0.6780	0.7044	-0.0264
46	1.6627	0.7760	0.7374	0.0386

残差 = Df(测量值) - Df(估计值)

随后对 Df和 Gm进行相关分析,见表 2。

表 2　方差分析表

方差来源	自由度	方差总和	平均方差	*F*值
模型	1	0.0400	0.0400	54.1595
误差	6	0.0044	0.0007	
合计	7	0.0444		

曲线模型: Df = 3.7073 - 1.786 × lg(Gm)　　*r* = 0.9488

表 2表明,在平均灰度与交点密度之间建立了极显著的相关关系,证实了我们前面的分析,即式(9)在实践上也是成立的。通过这条回归曲线,可以很容易地实现灰度值与交点计数值之间的转换。分析软件可以自动记录该条线段的长度和平均灰度,所以同时也就可以获得其相应的交点计数值。这样,即实现了纤维密度的灰度法测量。

3　讨论

本研究所提出的用灰度法实现交点计数的测量,经过前面的理论推导及实践检验,证实了交点密度和灰度之间的函数关系是成立的,因而该方法在理论和实践上均是可行的。

使用本法进行测量时要求染色切片中纤维与周围背景之间应有较明显的差异(灰度差别明显),而且在测试线所压过的纤维中,纤维的粗细应基本一致,以免引起误差。事实上,这也是交点计数法所要求的。为了达到这一点,一般最好先对图像进行预处理,如图像增强、边缘锐化等,从而可以获得较好的效果。

目前在纤维定量方面的报道并不多见。Bjorklund等[4]以"-、±、+、++"等来粗略地描述神经纤维的密度。也有从体视学的角度来考虑的[5],但是还没有在图像分析仪上实现。而交点计数法已是一个测量纤维密度的较为成熟的方法,本研究用灰度法结合公式转换在图像分析仪上实现,有很大实用性。

关键词　灰度;交点计数法;图像分析

中图法分类号　R31

参考文献

1 申　洪,沈忠英 编著.实用生物体视学技术.广州:中山大学出版社,1991.31~35

2 蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学.成都:四川科学技术出版社,1988.116~120

3 毛秦雯,苏慧慈,黄威权,等.大鼠心瓣膜含 NPY、VIP、SP和 CGRP神经的分布及年龄变化.解剖学报,1994,25(1):65

4 Bjorklund A, Hokfelt T, Owman C. Handbook of chemical neuroanatomy. Vol 6. The Nervous System. Amsterdam: Elsevier, 1988.358~360

5 Scott T M, Robinson J, Foote J. The peptidergic innervation of the developing mesenteric vascular bed in the rat. J Anat, 1989, 162(2): 177

(收稿: 1998-09-06;修回: 1999-03-03)

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net