

三维显微图像中神经元树突棘自动检测与分析

汪 迁, 李 杨, 都思丹

(南京大学电子科学与工程学院, 江苏南京 210023)

摘要:利用荧光标记显微成像研究树突棘的形态结构是神经学的重要研究手段之一,现阶段在低信噪比图像中对树突棘检测并进行形态学分析主要依赖人工参与,使得分析缺乏客观参照系且极其耗费人力.提出了一种基于断点匹配搜索和分段采样曲线拟合的算法,能够自动检测神经树突的边缘,实现树突与突棘的分离,并计算出繁杂图像的树突与突棘的大小、个数、密度等参量.分析结果表明,此方法为树突棘图像的分析提供了高效、准确的分析工具.

关键词:神经树突;突棘;分段采样;匹配搜索

中图分类号:R74 **文献标识码:**A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2014.02.012

引用格式:Wang Qian, Li Yang, Du Sidan. Automatic dendritic spine detection and analysis in 3D microscope images[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2014,44(2):160-164.

汪迁,李杨,都思丹. 三维显微图像中神经元树突棘自动检测与分析[J]. 中国科学技术大学学报, 2014,44(2):160-164.

Automatic dendritic spine detection and analysis in 3D microscope images

WANG Qian, LI Yang, DU Sidan

(School of Electronic Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Fluorescence microscopy imaging is one of the important methods for the study of the dendritic spine structures. Most of the current morphologic analyses in low SNR images involve a significant component of manual labor and is susceptible to operator bias. An algorithm based on endpoint match-searching and segmentation-sampling curve fitting was presented to automatically detect the edge of the dendrite, separate dendritic spines and calculate their size, number and density in complex images. Analysis of the results shows that it provides an efficient, accurate tool for dendritic spine analysis.

Key words: dendrite; spine; segmentation-sampling; match-searching

0 引言

在神经生物学研究中,获取和分析大量的高分辨率神经树突微观图像是一项艰巨的任务,但这对神经和精神病的研究至关重要^[1]. Lee 等^[2]的研究

表明,动物学习运动技能同浦肯雅细胞中的神经树突棘的形态变化也有很大关系.突触可塑性与神经树突棘的形态变化也有很大的关联^[3].因此研究树突棘密度和分布的形态变化,对神经网络功能的认识和分析具有重要的意义.

收稿日期:2013-06-16;修回日期:2014-02-19

基金项目:国家自然科学基金(61300157,61201425,61271231),江苏省自然科学基金(BK2011337)资助.

作者简介:汪迁,男,1990年生,硕士生.研究方向:图像处理. E-mail: winnieryl@gmail.com

通讯作者:李杨,博士/副教授. E-mail: yogo@nju.edu.cn

在实际分析过程中,由于获取的图像中存在噪声、干扰等问题,因而以往的神经图像分析需要大量的人力介入,而且分析过程缺乏客观标准.因此,迫切需要研究树突棘自动分析的方法.

目前,国内外有一些半自动化的树突棘分析方法. Koh 等^[4-6]提出了半自动的树突棘分析方法.这种方法能够在一定程度上提高分析效率,但是在分析过程中需要人工设置全局阈值,这些阈值的选取也和人的经验有很大关系,不同阈值的选取会对分析结果产生很大的影响. Cheng 等^[7]提出了一种自动方法,较 Koh 等的方法效果有了一些提高,但是在检测粘连突棘时,假设每个中心线上的分支对应一个突棘,这在情况复杂的图像中并不正确,因此会导致错误的结果. Zhang 等^[8-9]提出了一种基于曲线结构检测器的方法寻找神经树突的骨架及边缘,实现了神经树突和突棘的分离,但是由于实际上神经树突和突棘在很多地方密切粘连,从而导致了边界线的误检测. He 等^[10]通过非线性退化方程(NDE)的方法来实现树突棘的分离,它的原理是神经树突棘不同的形态结构导致其在上述方程作用下有不同的退化速率,通过一个速率阈值即可辨别出二者.但是在实际图像中,树突棘的退化速率在粘连处区别不大,很难通过一个全局阈值分离所有的树突棘,造成分离精确度不高.

本文提出了一种基于断点匹配搜索和分段采样曲线拟合的算法,这种算法能够在高分辨率图像中排除神经突棘对神经树突边界的干扰,准确地寻找出神经树突的边界曲线.在分离之后,由于突棘的情况较为复杂,存在不同突棘粘连以及同一个突棘不相连的情况,因此,我们结合三维图像信息和突棘结构特征实现了对突棘个数、长度、大小的精确检测,为生物学研究提供了更为直观、丰富的数据.

1 基于断点匹配搜索和分段采样拟合的神经树突边缘提取算法

1.1 图像采集

本文所分析的图像样本来自 E18 的大鼠胚胎的皮层原代培养神经元,体外培养至 22 d 时,采用 Lipofectamine 2000 进行转染,24 d 时采用徕卡 SP5 共焦激光扫描显微镜(CLSM)系统在 63 倍镜下成像.图像的大小为 $1\ 024 \times 1\ 024$ 像素,焦平面上分辨率为 $0.24\ \mu\text{m}/\text{像素}$.成像中对样本进行了 $10 \sim 15$ 层间隔为 0.5 的 z-stack 模式成像.

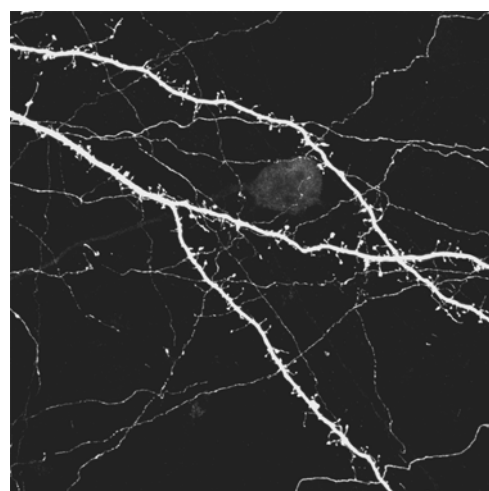


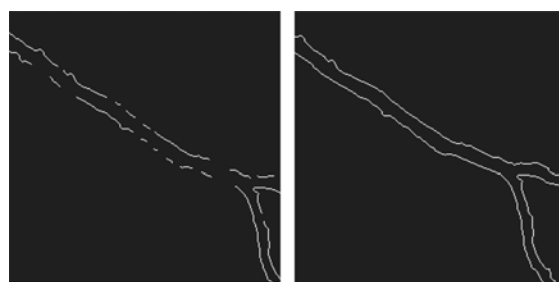
图 1 典型的神经树突棘图像

Fig. 1 Typical dendritic spine image

1.2 断点匹配搜索算法

神经树突与突棘的生长情况比较复杂,图像信噪比低,干扰多,干扰有交叉、间断,背景中存在死细胞等噪声.为了精确地寻找到神经树突的边缘,本文提出了断点匹配搜索算法和曲线分段采样拟合算法.

神经树突边缘可以通过它的骨架来获得.得到的边缘图像如图 2(a)所示.由于神经突棘的存在,边缘曲线是一些间断的曲线,并未连成完整的曲线,因此需要通过连接算法将它们连接起来.连接算法描述如下:



(a) 处理前的树突边缘曲线 (b) 处理后树突边缘曲线

图 2 间断点匹配算法处理前后效果图

Fig. 2 Result of the match-searching algorithm

找到图 2(a)中所有的间断点(八连通点个数为 1),根据几何特性寻找匹配点.匹配点寻找遵循下面的规则:

$$I_{\text{skeleton}} \cap L_{(x_1, y_1)} = \emptyset$$

$$C_{(x, y)} \neq C_{(x_1, y_1)}$$

$$L_{(x_1, y_1)} \cap I_{\text{edge}} = \emptyset$$

式中, I_{skeleton} 为树突的骨架图像; I_{edge} 为得到的边缘

图像,如图 2(a)所示; $L_{(x_1, y_1)}$ 为过点 (x_1, y_1) 与当前待匹配点 (x, y) 的直线; $C_{(x, y)}$ 为点 (x, y) 所在的连通域.假设满足上述条件的所有终点的集合为 G ,则匹配点为

$$(x_1, y_1) = \min(D_G)$$

式中, D_G 为集合 G 中点与当前点 (x, y) 的距离的集合.算法处理结果如图 2(b)所示.

1.3 分段采样曲线拟合算法

神经树突直径变化较大,在用断点匹配算法处理之后的图中仍然会存在神经突棘的边缘信息,这表现在图像上为树突边缘曲线上的一些突起,如图 3(a)所示.需要对这些曲线进行进一步处理,得到更加精确的树突边缘曲线.

在曲线中小部分点偏离真实边缘曲线较远,在拟合时应尽量消除这些点对拟合曲线的影响.本文提出了一种基于最佳平方逼近的分段采样曲线拟合方法.此问题的数学模型可表述如下:存在一点集 $\{x_0, \dots, x_n\}$,其中 $m(m < n+1)$ 点准确地位于真实曲线 $f(x)$ 上,求 $f(x)$ 的多项式拟合曲线.考虑到在实际情况下,拟合曲线的阶数 $t \leq 4$,而 $n \geq 25$,因而可以采取抽样的方式,每次取其中的一部分点进行拟合,将多次拟合出来的曲线进行比较.假设抽取 x 组数据,对于每组数据,用最佳平方逼近方法获得多项式的参数数据:

$$\{a_{10}, \dots, a_{1t}\}, \{a_{20}, \dots, a_{2t}\} \dots \{a_{x0}, \dots, a_{xt}\}$$

$$a_i = \frac{1}{x-2} \left(\sum_{j=1}^x a_{ji} - \min(a_{ji}) - \max(a_{ji}) \right)$$

$$(i \in \{0, \dots, t\})$$

$$P_t(x) = \sum_{i=0}^t a_i x^{t-i}$$

最终得到多项式的各系数.采用分段采样曲线拟合

方法处理前后的曲线效果如图 3(a),3(b)所示.

Zhang 等^[8-9]提出的用曲线结构检测器寻找神经树突的骨架及边缘的方法,效果如图 3(c)所示.对比图 3(b),3(c)可以看出,本文所采用的边缘提取算法在细节更为清晰的生物图像中仍能精确检测出树突的边缘曲线,而在图 3(c)中某些树突和突棘相粘连的地方,Zhang 采用的算法不能精确检测出神经树突与突棘的边界(白色方框所示).

2 树突棘的分离结果及分析

2.1 二维图像分析及结果

选取 3 幅处于不同生长状态的神经树突棘图像进行预处理之后,采用本文方法进行神经树突棘的分离,并计算出 3 幅图像神经树突棘的大小、体积、密度等参数,结果如图 4 和表 1 所示.

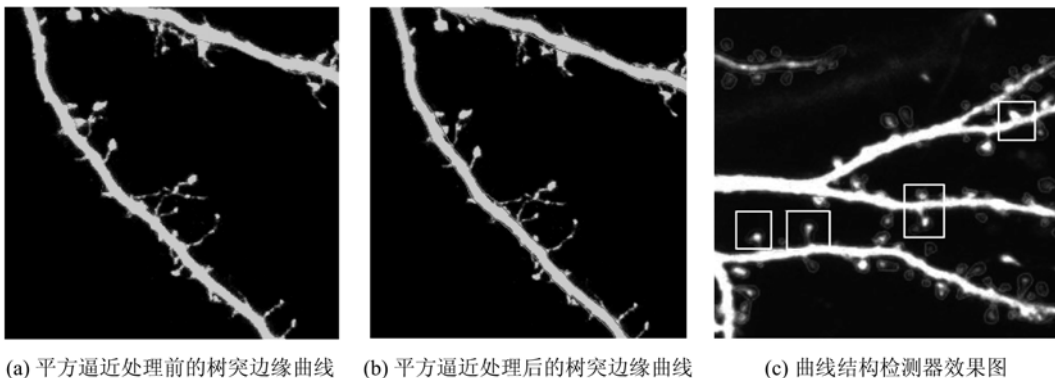
分析各参数可知,图 4(a)中,神经突棘平均体积最大,生长情况最好;图 4(b)中神经突棘最多,但是平均体积较小,生长情况最差;图 4(c)中神经突棘生长情况介于图 4(a)和图 4(b)之间,但是个数最少,在神经树突上分布稀疏.

表 1 各图检测结果

Tab. 1 Detecting results of the images

	神经突棘 总面积 / μm^2	神经树突 总长度 / μm	神经突 棘个数 /个	神经突棘 平均面积 / μm^2	神经突棘 面积线 密度/ $\mu\text{m}/(\text{个} \cdot \mu\text{m}^{-1})$	神经突棘 个数线 密度/ $(\text{个} \cdot \mu\text{m}^{-1})$
图 4(a)	689.76	886.5	201	3.432	0.778	0.223
图 4(b)	574.44	890.6	215	2.672	0.645	0.241
图 4(c)	477.45	1131.3	155	3.080	0.422	0.137

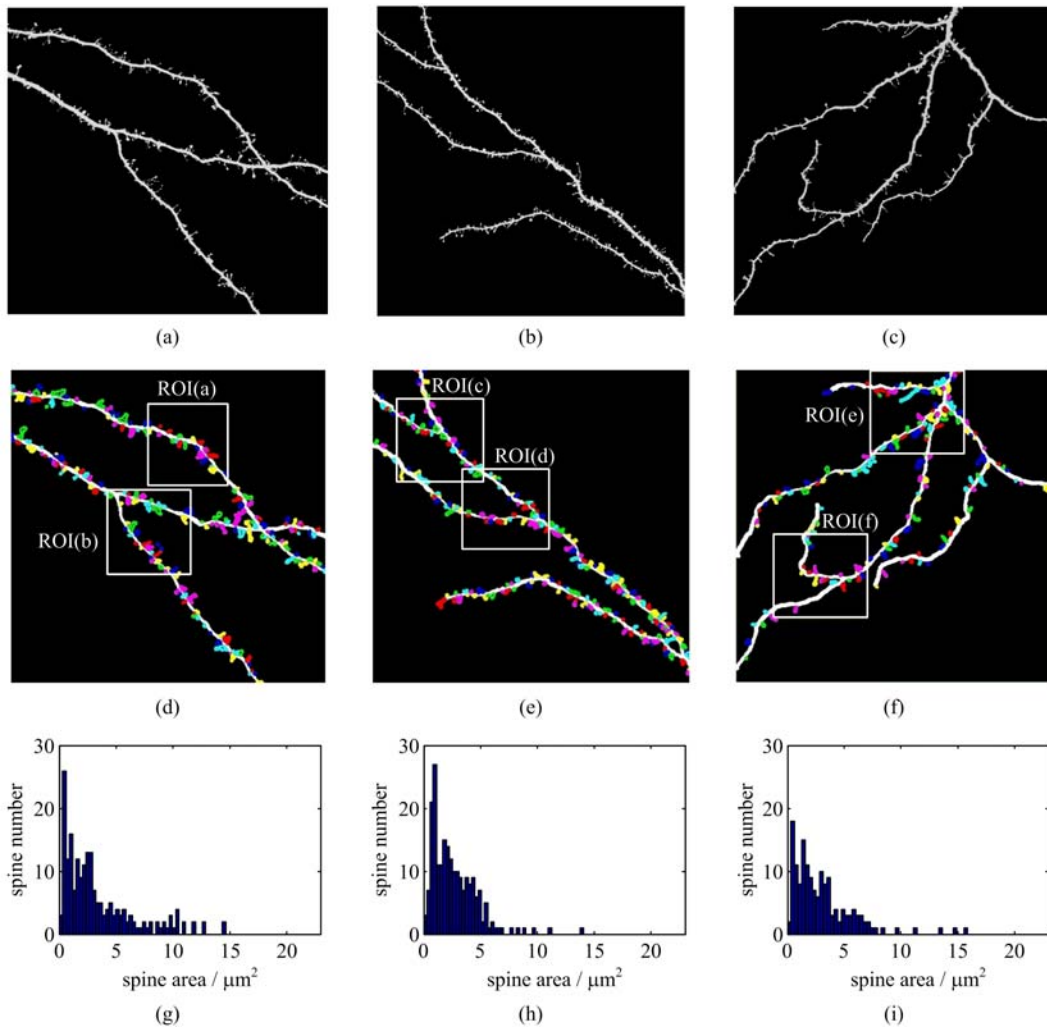
He 等^[10]通过非线性退化方程(NDE)的方法来实现树突棘的分离,对本文图像应用此方法,每个像素选取半径为 5 的邻近区域进行计算,并将计算结果作为输入,进行迭代计算,经过 4 次迭代之后,选



(a) 平方逼近处理前的树突边缘曲线 (b) 平方逼近处理后的树突边缘曲线 (c) 曲线结构检测器效果图

图 3 分段采样曲线拟合算法的效果及对比

Fig. 3 Result and comparison of segmentation-sampling algorithm

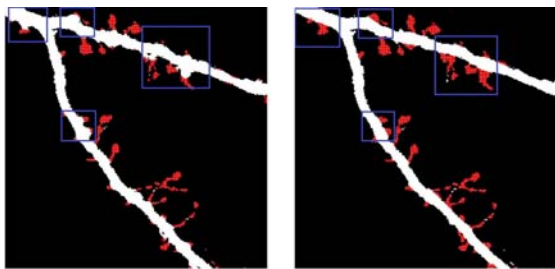


(a)~(c) 预处理后图像; (d)~(f) 彩色标注不同神经突棘; (g)~(i) 不同面积突棘个数统计

图 4 3 幅图像树突棘分离结果及分析

Fig. 4 Results and analysis of the three images

取合适的退化速率阈值, 所得分离结果与本文方法对比如图 5 所示。



(a) He 的 NDE 方法处理结果 (b) 本文方法处理结果

图 5 He 的方法^[10] 同本文方法结果对比

Fig. 5 The comparison with He's method^[10]

对比图 5(a) 和图 5(b), NDE 算法的原理是基于神经树突和突棘的不同形态结构来进行区分, 所以在某些神经突棘的大小与神经树突相差不大的地

方, 此方法无法准确地区分二者, 导致分离出现错误, 对比区域在图中用蓝色方框标出。

选取 3 幅图像不同区域的神经突棘处理结果与人工方法进行对比, 数据如表 2 所示。神经树突上面的突棘生长状况复杂、密集, 若采用人工方法, 费时费力, 且容易出错。本文采用的方法可以自动、高效、精确地计算出图像中突棘的个数。从表 2 可以看出,

表 2 突棘个数检测同人工方法对比

Tab. 2 Comparison of the number detection with manual results

	ROI (a)	ROI (b)	ROI (c)	ROI (d)	ROI (e)	ROI (f)
人工方法/个	21	33	32	38	43	22
自动方法/个	20	31	30	36	46	21
相异度/%	4.8	6.5	6.3	5.5	7.0	4.9

【注】 ROI(a)~(f) 分别为图 4(d), (e), (f) 部分区域, 并在图 4 中标注。

本文的方法在检测突棘个数方面同人工方法相差在 7% 以内。

2.2 三维图像分析及结果

在三维图像中,图像提供的树突棘的位置信息更多,在二维图像中存在交叉的树突棘在三维图像中可以借助深度信息进行分离.本文待处理的三维图像大小为 $1\ 024 \times 1\ 024 \times 14$.

经过预处理之后的三维原始图像如图 6(a)所示,借助二维图像的分析方法,并结合三维图像的深度信息分析,最终分离结果如图 6(b)所示,计算神经树突棘各个参数如表 3 所示。

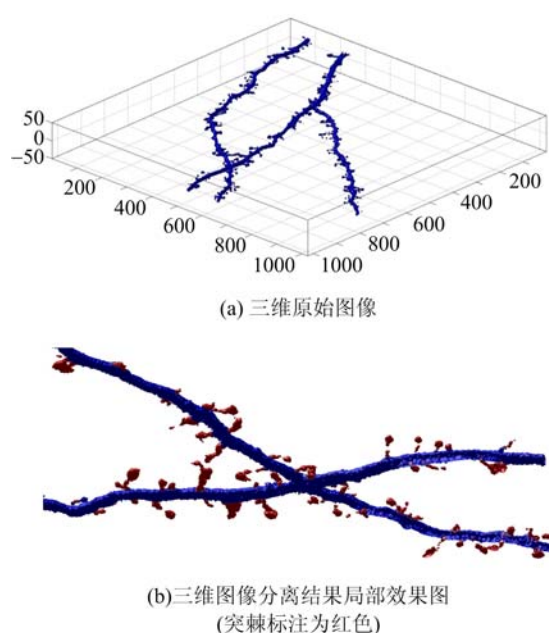


图 6 三维原始图像及其处理结果

Fig. 6 Original 3D image and the result after processing

表 3 三维图像检测结果

Tab. 3 Results of the 3D image detection

神经突棘 总体积 $/\mu\text{m}^3$	神经树突 总长度 $/\mu\text{m}$	神经突棘 个数 $/\text{个}$	神经突棘 平均体积 $/\mu\text{m}^3$	神经突棘 体积线密度 $/\mu\text{m}^2$	神经突棘 个数线密度 $/(\text{个} \cdot \mu\text{m}^{-1})$
476.13	886.5	201	2.369	0.537	0.223

3 结论

本文通过断点匹配搜索和分段采样拟合算法,在二维和三维层面对神经树突棘图像进行了分析计算,对噪声背景复杂,目标尺度、形状各异的图像进行了准确、高效的处理,并且与人工处理的方法进行

了比较.该方法人工参与少,而且计算速度快,准确性较高,得到的树突棘的各个参数能够很好地反映神经树突棘的形态、生长状态,对于定量分析不同神经树突棘的生长特征,以及同一树突棘不同时间的生长状态都有很大的帮助。

参考文献 (References)

- [1] Harvey C D, Yasuda R, Zhong H, et al. The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine [J]. *Science*, 2008, 321 (5885): 136-140.
- [2] Lee K J, Jung J G, Ariei T, et al. Morphological changes in dendritic spines of Purkinje cells associated with motor learning[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2007, 88(4): 445-450.
- [3] Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2001, 24(1): 1 071-1 089.
- [4] Koh I Y Y, Lindquist W B, Zito K, et al. An image analysis algorithm for dendritic spines [J]. *Neural Computation*, 2002, 14(6): 1 283-1 310.
- [5] Xu X, Cheng J, Witt R M, et al. A shape analysis method to detect dendritic spine in 3D optical microscopy image [C]// 3rd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro. Piscataway: IEEE Press, 2006: 554-557.
- [6] Chen Z, Molloy S. Automatic 3D vascular tree construction in CT angiography [J]. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 2003, 27(6): 469-479.
- [7] Cheng J, Zhou X, Miller E, et al. A novel computational approach for automatic dendrite spines detection in two-photon laser scan microscopy [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2007, 165 (1): 122-134.
- [8] Steger C. An unbiased detector of curvilinear structures[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1998, 20(2): 113-125.
- [9] Zhang Y, Zhou X, Witt R M, et al. Dendritic spine detection using curvilinear structure detector and LDA classifier[J]. *Neuroimage*, 2007, 36(2): 346-360.
- [10] He T, Xue Z, Wong S T C. A novel approach for three dimensional dendrite spine segmentation and classification[C]// Proc SPIE 8314, Medical Imaging 2012: Image Processing. SPIE, 2012:831437; doi:10.1117/12.911693.