

红细胞SEM图像的 三维重构及形状特征提取

——基于VXL开源视觉库

王瑞胡 房 斌 著

Three Dimension Reconstruction and
Feature Extraction for Red Blood Cell SEM Image
——VXL Open Source Vision Library



科学出版社

红细胞 SEM 图像的三维 重构及形状特征提取

——基于 VXL 开源视觉库

王瑞胡 房 斌 著

科学出
北 京

前 言

红细胞对维持人体的正常生理功能具有重要作用,它向身体的各个组织输送氧气,同时将细胞代谢产生的二氧化碳运送回肺部。这些功能能否正常运行很大程度上依赖于红细胞的柔韧性,而柔韧性又取决于其形变能力。临床诊断中大量实践经验表明很多疾病都与红细胞的形变能力有关,红细胞的形变能力对血液的过滤性具有决定性的作用。在病理学研究中,如多发性硬化等疾病的直接诱因皆源于红细胞形变能力的减弱。因此在医学诊断中,红细胞形状的分析将有利于医生准确判断病人病情。

分析红细胞形变能力的一个主要途径是采用人工分析方法,计算红细胞图像中各类细胞的形状分布。这类分析方法耗时长、精度低,分析结果很大程度上取决于直观印象判断等不利因素。同时,很多文献对于红细胞形状特征的提取都是基于二维图像处理方法,如计算红细胞的边界轮廓周长、中心点等。但由于红细胞本身形状的多变性,这些常用的特征提取方法并不适用于这类特殊对象。因此,需要将红细胞的形变特征与其形状结合起来综合考虑,而形状的变化特征需要通过三维立体形式才能准确表征。

本书中待处理的输入图像为 SEM 600 倍放大之后得到的红细胞高清晰度二维灰度级数字图像,为得到三维形状特征,首先需要研究三维重构算法,并基于重构之后的三维立体高度场进行图像的表面分割。采用的开发平台和实现语言均为开源系统,包括 Linux Ubuntu 操作系统和开源视觉库 VXL。

全书内容包括:(1)提出了一种 SEM 成像条件下的基于线性逼近的用于解决反射映射函数的 SFS 红细胞表面形状三维重建方法。采用 Lambertian 反射模型,图像亮度偏微分方程的求解利用基于 Taylor 展开的线性逼近差分运算得到。重建的三维高度场形状可视为距离图像作为细胞图像的表面分割输入。(2)针对由 SEM 得到的红细胞数字图像中包含大量相互重叠的红细胞,考虑到叠加细胞的统计特征,只提取出处于最上层的细胞。利用基于边界轮廓的区域生长算法分离出各个细胞的图像,整个分离算法主要由轮廓跟踪和区域

生长两个步骤构成。(3)提出一种针对不规则多形变红细胞数字图像的自适应曲面拟合以及曲率计算方法。通过阴影恢复技术重构的细胞表面的三维高度场形状,利用三维数据点根据最小二乘法进行曲面拟合。选定深度均方根误差阈值来决定参与拟合的邻域点,计算得到的高斯曲率、平均曲率可用来表征某一点的表面类型,主曲率则用来观察曲面变化较大的区域。通过多尺度二元多项式函数分别对不同类型表面进行曲面拟合,得到的分割结果可将不同形状部分区分开来,并以此作为进一步对细胞进行分类的依据。

本书得以出版,要感谢国家留学基金管理委员会(200421Y086)、重庆市人力资源和社会保障局留学人员科技活动项目择优启动(09958023)、重庆文理学院校级重点科研项目(Z2007SJ05 和 Z2009JS07)、重庆文理学院专著出版基金的资助,还要感谢新西兰奥塔哥大学计算机科学系 Brendan McCane 博士、Zhiyi Huang 博士、Da Deng 博士,以及重庆大学模式识别与智能信息研究中心的研究人员。

由于作者水平有限,书中难免有不妥之处,恳请诸位专家、学者及广大读者不吝赐教,批评指正。

编 者

2012年3月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 红细胞机理与形状特征	1
1.2 扫描电子显微镜成像原理	4
1.3 红细胞图像处理研究综述	6
1.4 本书主要研究内容	11
第 2 章 VXL 概述	14
2.1 Linux Ubuntu 操作系统	14
2.2 CMake	14
2.3 VXL 简介	15
2.4 VXL 的几个核心库简述	16
2.4.1 vnl 数字化容器	16
2.4.2 vil 图像管理类库	17
2.4.3 vgl 几何图形类库	17
2.4.4 vsl 数据流输入/输出类库	17
2.5 VXL 安装与配置	18
2.6 VXL 库在计算机视觉中的简单应用	18
2.6.1 VXL 用于数学形态学操作	19
2.6.2 VXL 用于基本图像处理运算	27
2.6.3 VXL 用于实现图像处理中的算法和数据结构	29
第 3 章 边界轮廓跟踪与细胞图像提取	39
3.1 图像预处理	39
3.2 轮廓跟踪	40
3.3 细胞图像提取	45

3.4	边界轮廓数据存储与访问的 XML 解析器 Expat	49
3.5	附录：区域生长算法实现代码	50
3.6	附录：用于 XML 保存数据与解析的参考代码	55
第 4 章	医学图像 SFS 三维重建	59
4.1	Shape from X	59
4.2	基于线性逼近的 IRE 求解	61
4.2.1	泰勒展开 ^[40]	61
4.2.2	雅可比迭代 ^[41]	62
4.3	SEM 成像条件下的明暗度恢复重建	63
4.3.1	光照模型	63
4.3.2	SFS 与 IRE	65
4.3.3	SEM 红血细胞图像	65
4.4	线性逼近方法求解 IRE	66
4.4.1	线性逼近 ^[43]	66
4.4.2	SEM 成像条件下的线性逼近	67
4.5	其他	69
4.6	附录：主要代码	69
第 5 章	微分几何与红细胞图像曲率计算	73
5.1	最小二乘法	73
5.2	多项式拟合	74
5.3	高斯消去法	75
5.4	曲面定义与曲率 ^[47]	77
5.4.1	曲面的第一基本形式	77
5.4.2	曲面的第二基本形式	78
5.4.3	面上的曲率	78
5.5	曲面拟合与曲率计算	80
5.6	曲率计算的自适应方法	85
5.6.1	自适应算法求解	85
5.6.2	函数描述	85
5.6.3	算法流程图与伪代码描述	87
5.6.4	结果分析	89

5.7 附录：主要代码	93
第6章 基于曲面拟合的医学图像表面分割	102
6.1 常用的图像分割算法简介	102
6.1.1 区域分割	103
6.1.2 边缘检测	103
6.2 曲率计算与初始分割	104
6.2.1 数字曲面的导数计算 ^[52]	105
6.2.2 基于曲率的曲面类型划分	106
6.3 多尺度二元多项式曲面拟合分割	108
6.3.1 自适应多尺度曲面函数的拟合思想	108
6.3.2 算法描述	111
6.3.3 分割结果	117
6.4 附录：主要代码	122
参考文献	136

第 1 章 绪 论

随着医学成像技术的发展和进步,图像处理在医学研究与临床医学中的应用越来越广泛.与一般意义上的数字图像处理相比,医学图像处理具有其特殊性和不同的侧重点^[1],包括图像去噪、直方图均衡、边缘提取和增强等.医学影像计算机辅助诊断(medical image computer aided diagnose, MICAD)是指通过影像学、医学图像处理技术以及其他可能的生理、生化手段,结合计算机的分析计算,辅助影像科医师发现病灶,提高诊断的准确率.目前, MICAD 研究在乳腺和肺部病变方面较为成熟;而在红细胞形变特征提取、虚拟腔镜、肝脏疾病诊断和中医学等方面的研究还正在进行之中.通常, MICAD 过程分为三步:第一步是把病变从正常结构中提取出来;第二步是图像特征量化;第三步是对数据进行处理并得出结论.因为计算机可以全面利用影像信息进行精确的定量计算,能去除人的主观性,避免因个体知识和经验的差异引起“千差万别”的诊断结果,所以它的结果是不含糊的、确定的,它使诊断变得更为准确和科学.

1.1 红细胞机理与形状特征

红细胞是脊椎动物体内血液运送氧气的最主要的媒介. 血红素在特定的细胞中进行机能活动,这种血细胞称为红细胞. 在常规化验中它常缩写成 RBC, 是血液中数量最多的一种血细胞. 红细胞中含有血红蛋白,它使血液呈红色. 血红蛋白中含有铁元素,贫血的人宜多吃铁含量丰富的食物来补血. 血红蛋白能和空气中的氧结合,因此红细胞能通过血红蛋白将吸入肺泡中的氧运送给组织,而组织中新陈代谢产生的二氧化碳也通过红细胞运送到肺部,通过肺泡同体外的氧气进行气体交换,将二氧化碳排出体外.

人类的红细胞是双面凹的圆饼状,边缘较厚,中间较薄^[2],如图 1.1、图 1.2 所示,这种形状可以最大限度地从周围摄取氧气. 同时,它还具有柔韧性,这使得它可以通过毛细血管释放氧分子. 人类的红细胞直径通常是 $6\sim 9\ \mu\text{m}$,大于

此范围的为大红细胞(macrocyte),小于此范围的为小红细胞(microcyte).小红细胞在正常人中偶见,大红细胞多见于溶血性贫血及巨幼细胞贫血.

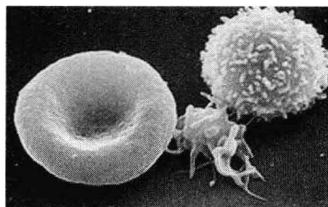


图 1.1 血液中常见的血细胞
(从左到右依次为红细胞、血小板、白血球)

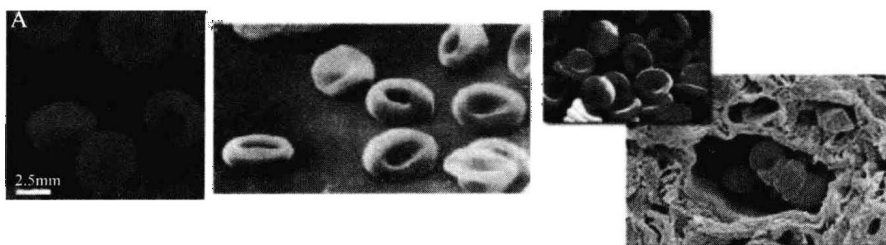


图 1.2 电子显微镜下的红细胞

红细胞形状改变之后的形态有球形红细胞、椭圆形红细胞、靶形红细胞、口形红细胞、镰形红细胞、棘红细胞、裂红细胞、缙钱状红细胞等^[3].球形红细胞中央着色深、体积小,直径与厚度比小于 2.4 : 1(正常值为 3.4 : 1),如图 1.3 所示,其中用粗线框标出的即为球形红细胞.此种红细胞直径缩短,厚度增加,细胞中心区的血红蛋白比周围多,呈小球形状,其气体交换功能与正常红细胞相比较弱,且容易被破坏、溶解,常见于遗传性和获得性球形红细胞增多症(如自身免疫溶血性贫血、直接理化损伤如烧伤等).

椭圆形红细胞呈椭圆形或杆形,两端钝圆,长轴增大,短轴缩短,长是宽的 3~4 倍,长径约为 12.5 μm,横径约为 2.5 μm,如图 1.4 所示.椭圆形红细胞生存时间一般正常,也可能缩短,血红蛋白正常,与遗传性细胞膜异常基因有关.其成熟后呈椭圆形,置于高渗、等渗、低渗、正常血清内,其椭圆形均保持不变,见于遗传性椭圆形红细胞增多症(可达 25%~75%)、大细胞性贫血(可达 25%)、缺铁性贫血、骨髓纤维化、巨幼细胞贫血、镰形细胞性贫血和正常人(约占 1%,不超过 15%).^[3]

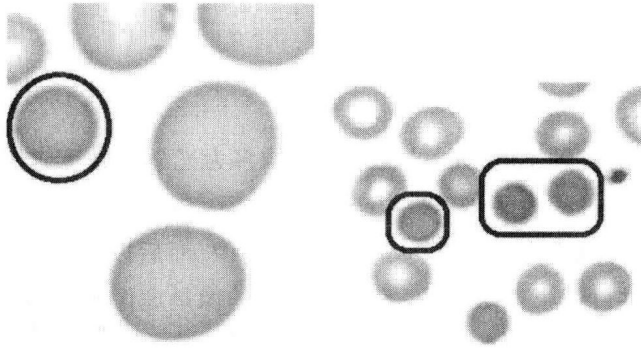


图 1.3 球形红细胞

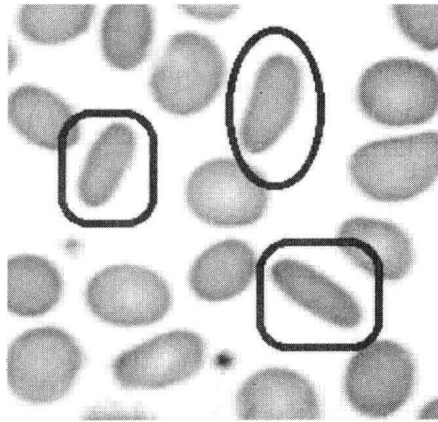


图 1.4 椭圆形红细胞

棘形红细胞表面有针状突起,其突起的间距不规则,且长和宽不一致,如图 1.5 所示.棘形红细胞见于遗传性或获得性 β -脂蛋白缺乏症(高达 70%~80%)、脾切除后遗症、酒精中毒性肝病、尿毒症,须与皱缩红细胞(锯齿状红细胞)区别.皱缩红细胞边缘呈锯齿形,其锯齿排列紧密、大小相等、外端较尖.^[3]

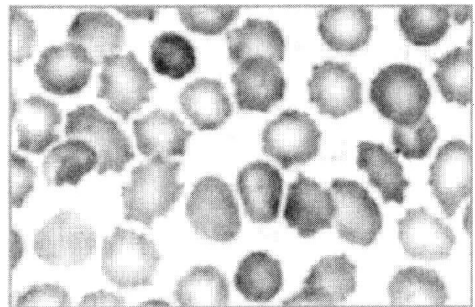


图 1.5 棘形红细胞

1.2 扫描电子显微镜成像原理

以上见到的各种不同形状的红细胞图像多为光学显微镜成像系统得到的。光学显微镜成像过程为两步，第一步成像由物镜完成，第二步成像由目镜完成。第一次先经过物镜成像，得到放大的倒立的实像。而后以第一次形成的物像作为“物体”，经过目镜第二次成像。第二次形成的像是虚像，其成像原理如图 1.6 所示。

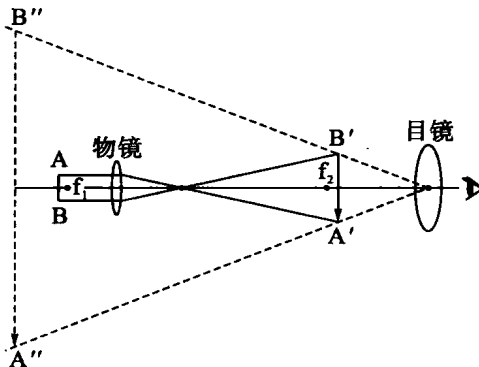


图 1.6 光学显微镜成像原理

与光镜相比，电镜用电子束代替可见光，用电磁透镜代替光学透镜，并使用荧光屏将肉眼不可见电子束成像。常用的电子显微镜有透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)。电子束在样本上进行动态扫描时，将样品上带有形态和结构信息的二次电子逐点逐行地轰击出表面，经检测器处理后在荧光屏上显示出该范围的动态画面。

如图 1.7 所示^①，入射的电子导致样本表面被激发出次级电子。显微镜观察的是每个点散射出来的电子，放在样品旁的闪烁晶体接收这些次级电子，通过放大后调制显像管的电子束强度，从而改变显像管荧光屏上的亮度。显像管的偏转线圈与样品表面的电子束保持同步扫描，这样显像管的荧光屏就显示出样品表面的形貌图像，这与工业电视机的工作原理类似。由于在这样的显微镜中，电子不必透射样本，因此使电子加速的电压不必非常高。

① <http://Old.blog.edu.cn/vser2/pengfeillo/archives/2006/1438210.shtml>

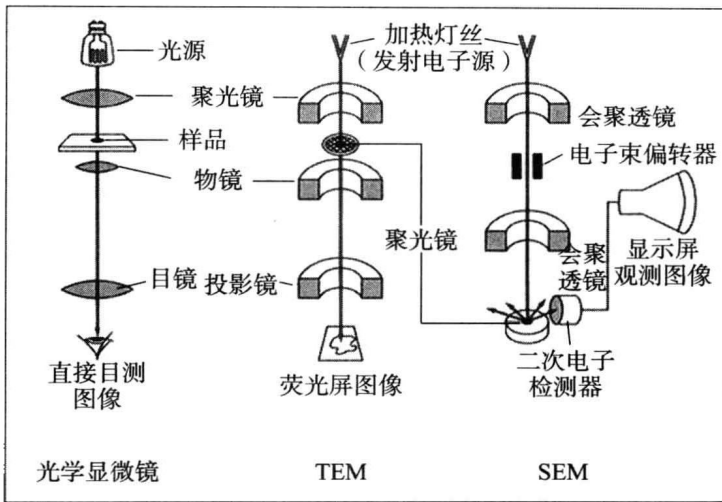


图 1.7 SEM 成像原理

电子束与样品作用时,由于样品表面形貌、结构的差异,各处被激发出的次级电子数量不同,从而在显像管上显示出对应的明暗反差图像,即为样品形貌特征.通过 SEM 获取优质图像必须具备以下几个条件^[4].

(1) 足够的分辨率

SEM 的分辨率取决于电子束斑点的大小,小于斑点尺寸的细节不能被分辨清楚.

(2) 丰富的像素

SEM 图像由许多明暗相间的小点组成,这些小点是构成图像的基本单元,称为像素.像素越多,图像质量越好.

(3) 充足的扫描线条

电子束对样品进行扫描,是从左到右,自上而下进行的,分别称为行扫描和帧扫描.行扫描比帧扫描快得多.对于 1000 条扫描线的图像,行扫描完成一行时,帧扫描仅完成一格,即 1/1000 的距离.行扫描转行时留下的痕迹称为“扫描光栅”,光栅越密,行间隔越小,能呈现出的细节也越多.

SEM 生物制品的制备还需要经过取样、清洗、固定、脱水、干燥、样品黏台、样品导电处理七个阶段.

通过 SEM 对血涂样片进行 600 倍放大得到的图像如图 1.8 所示,图像宽度为 1024 像素,高度为 768 像素,水平、垂直分辨率均为 71 dpi,24 位灰度.可以发现,图像中存在大量的相互重叠的细胞.由于我们最终感兴趣的不是每一

幅图像中所包含的细胞个数,而是不同红细胞的形状分布,因此可作合理简化:所有重叠细胞在整个分布中具有有一致性,即等概率分布,处理时只需检测和识别叠加图像中处于最顶层的细胞.

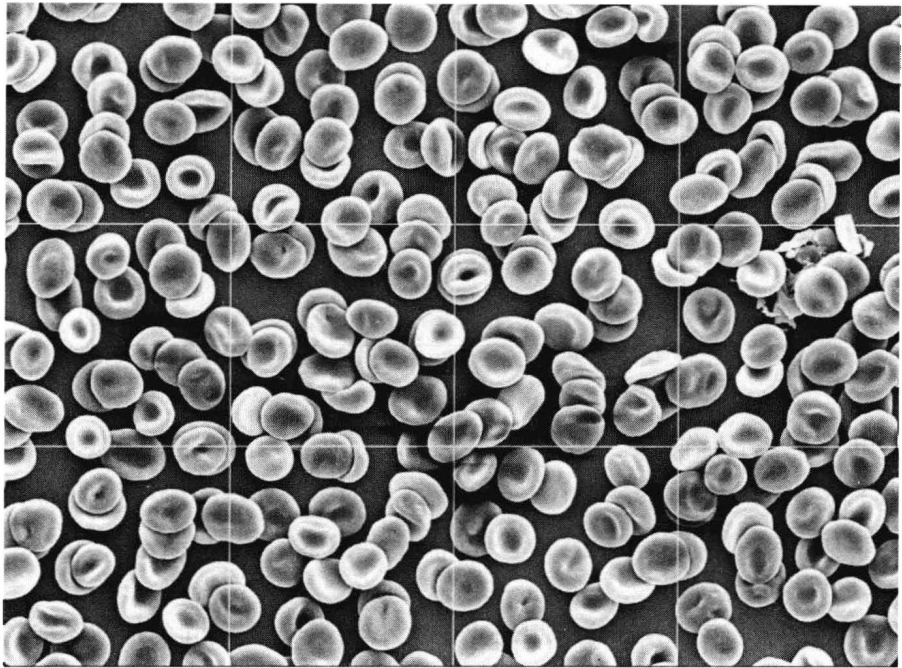


图 1.8 SEM 成像获取的红细胞

1.3 红细胞图像处理研究综述

图像处理在生物医学领域正得到越来越多的应用,细胞图像自动识别分析系统是其中一个比较典型的应用实例.通过对细胞图像进行分析,将单个细胞提取出来,作为细胞数目和细胞特征信息的统计依据.

尤育赛、于慧敏等对图 1.9(a)中的原始红细胞灰度图像中存在的重叠(粘连)现象,利用红细胞近似圆形这一先验知识,用粒度测量来获取红细胞半径 R ,对重叠区域轮廓上的每个非凹陷点,估计其所对应的圆心点.每一个圆心点对应一个细胞的中心区域,然后对每一个中心区域,采用半径为 R 的圆形结构进行形态学的膨胀操作,然后与原二值图像进行交集运算,将其结果作为对各个细胞形状的估计.^[5]分离之后的细胞图像如图 1.10 所示.

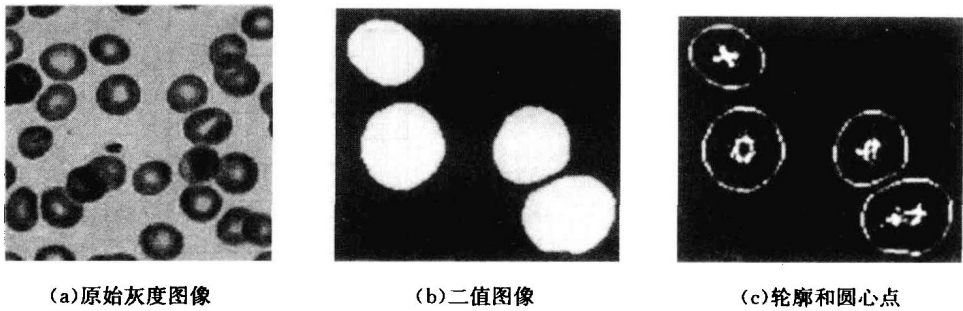


图 1.9 基于粒度的重叠红细胞图像分离

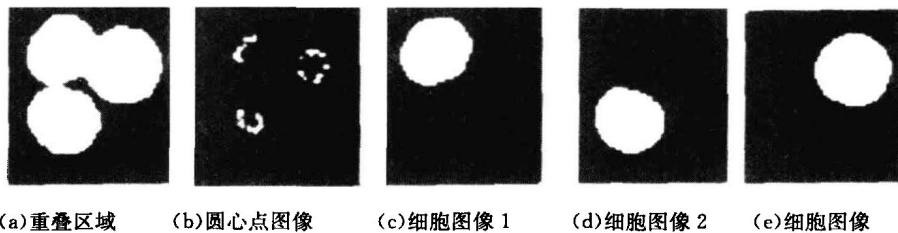


图 1.10 重叠区域的分离效果

郝葆青、罗教明等提出的红细胞形态特征统计分布算法^[6],将正常红细胞形态特征与病态相比,能够在一定程度上用于红细胞形态变化相关疾病的辅助诊断.但由于细胞和组织形态变化的复杂性,仅用面积、周长、等效半径、形状因子等指标来衡量是不够的,不足以反映细胞本身的形变特征.郝葆青、应广福、秦天银等随后提出的可作为红细胞图像的形态描述或细胞分类的图像特征参数——圆周率,仍然是基于二维平面几何特征^[7]的.

针对细胞图像分割中红细胞目标提取和重叠红细胞的分割难题,黄文明等提出了一种基于支持向量机(support vector machine, SVM)的红细胞彩色图像分割算法^[8],把原始细胞分割成红细胞和背景两类区域,然后使用改进距离标记的分水岭算法对红细胞区域进行重叠分割.该算法的思想是基于 SVM 算法的特点将分割问题转化为分类问题进行求解.由于分割的目的在于将目标区域(细胞)从背景区域中分离出来,所以其实质仍然是一个分类问题.基于 SVM 的红细胞彩色图像分割算法首先以像素点为单位,利用 SVM 对样本图像中的所有像素点进行分类,分出红细胞像素点和背景区域像素点,从而完成样本图像中的目标提取.提取出的重叠的红细胞图像再利用基于极限腐蚀距离标记的分水岭算法进行分割^[9],从而提取出单个细胞图像,算法流程如图 1.11 所示.

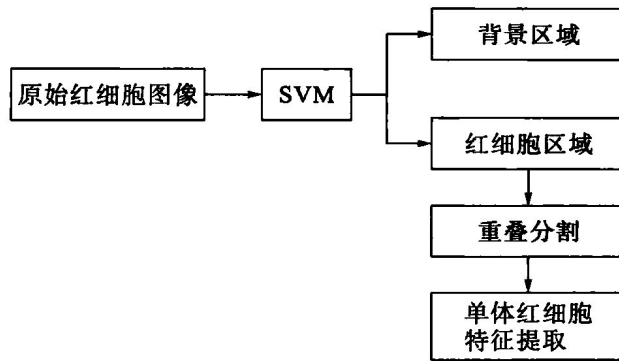


图 1.11 SVM 用于红细胞彩色图像分割

红细胞彩色图像 SVM 分割算法^[8]基于图像内像素之间的特征差别,构造一个 6 维特征向量 $\{R, G, B, AveR, AveG, AveB\}$, 其中 R, G, B 分别为像素点的三个颜色分量, $AveR, AveG, AveB$ 分别为该像素点 3×3 邻域内的所有像素点的 RGB 颜色分量的平均值. 也就是说, 基于 SVM 的红细胞图像目标提取算法中的每一个像数点, 既有颜色特征 (RGB 值), 又有空间特征 (邻域). 该算法对目标提取的步骤为: ①根据经验, 选择若干正样本点和负样本点, 如图 1.12 所示, 其中空心圆圈标注的是背景样本点, 即负样本点, 阴影圆圈标注的红细胞样本点, 即正样本点; ②选择样本点及其 3×3 邻域像素点作为 SVM 训练样本, $\{R, G, B, AveR, AveG, AveB\}$ 值作为样本的特征分量; ③利用标记好的测试样本集训练 SVM 分类器; ④利用训练好的 SVM 分类器对输入样本点进行分割, 分类效果如图 1.13 所示.

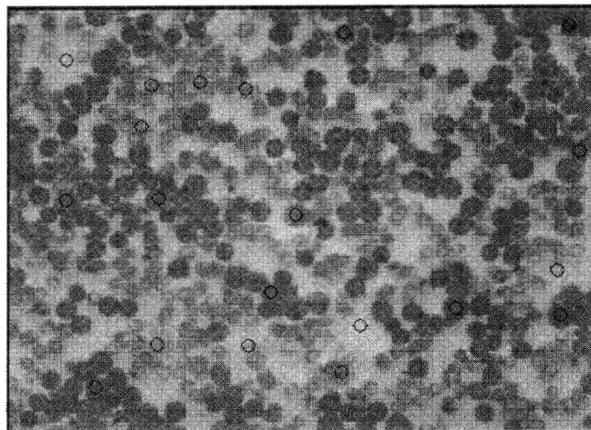


图 1.12 红细胞图像的正负样本点标注

图 1.13(a)为原始红细胞图像,1.13(b)为采用 RBF-SVM(径向基函数—支持向量机)的分类结果,其中核函数采用径向基函数, $C=1, \xi_i=0.2$.

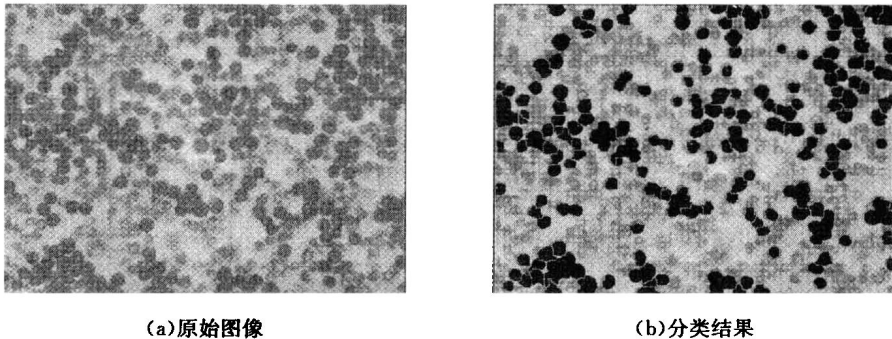


图 1.13 SVM 红细胞图像分类结果

潘晨、闫相国等针对彩色血细胞图像分割提出了一种主动选择样本简化训练集的方法,根据像素在颜色空间的统计特性构建可分的训练集,采用均匀抽样减少训练集规模,并发展出一种非监督算法与 SVM 相结合的自动图像分割方法,对 RGB 颜色空间中的细胞核、红细胞、背景以及白细胞胞浆等进行处理^[10].

红细胞形态学研究是细胞学、病理学以及血液流变学研究领域中的一个重要方面^[11]. 红细胞在血液细胞成分中占 95%,红细胞的形变能力在血液循环过程中对血液流变特性会产生实质性影响^[12]. 在许多病理环境下,红细胞及其膜结构受到各种因素的影响会产生形态变化^[13]. 由于红细胞的边缘检测问题是红细胞形态学研究中的一个十分重要的领域,文献^[14]提出了一种基于模糊逻辑理论以及 Pal. King 算法的边缘检测方法,用于红细胞边缘提取,并对原始图像分别用 Sobel 算子、Pal. King 算法以及基于模糊理论的方法进行边缘检测. 但是由于细胞交叠、细胞形状不固定等因素的影响,仅利用边缘检测技术还无法有效地识别红细胞图像.

文献^[15]以病人的血液样本图片为原始数据,运用图像处理离散 K-L 变换的理论分析方法,结合 DSP(digital signal processor, 数字信号处理器)在生物学中的研究和应用,设计开发出了一套 DSP 软件及硬件系统,对红细胞图像进行采集及实时处理,使系统自动识别红细胞,并最终对红细胞数目进行精确计数.

针对传统的疟疾寄生虫感染诊断依靠对 Giemsa 染色的血涂片显微图像

进行人工处理的效率低下问题^[16], Heidi Berge、Dale Taylor 等提出了一种改进的用于薄血涂片的红细胞计数方法^[17]. 采用数学形态学方法和迭代阈值对红细胞图像进行分割. 分割得到的红细胞图像再通过边界曲率计算和三角剖分 (delaunay triangulation, DT) 方法对重叠图像进行分离.

图 1.14 显示了原始彩色红细胞图像, 及经过预处理和计算背景差的灰度图像. 应用迭代阈值方法^[18,19] 对红细胞图像进行分割的结果如图 1.15 所示. 然后进行边界提取并计算边界曲线曲率^[20], 找到最大曲率的点, 最后再选择分割线. 分离出来的红细胞计数结果如图 1.16 所示.

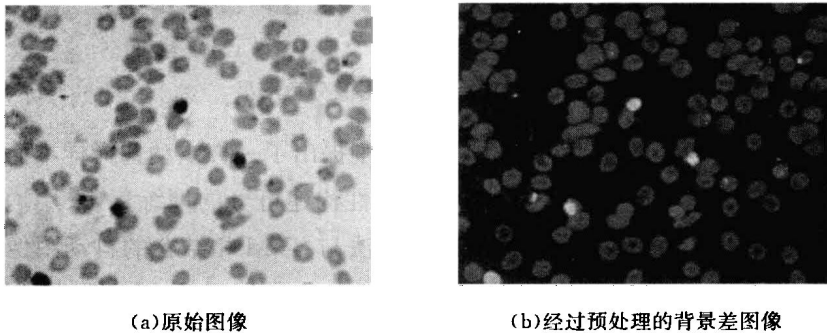


图 1.14 红细胞图像的预处理及背景差

很多文献对红细胞进行处理的图像都是光学显微镜成像图片^[20-24], 我们的输入图像如图 1.8 所示, 为 SEM 成像得到的高清晰度灰度图像, 与前述的二维图像处理方法不同, 我们拟重点关注红细胞的形变特征.

我们需要对多形变红细胞图像进行处理, 提取形状特征作为分割依据, 并进行分类, 从而为临床医学诊断提供辅助手段.

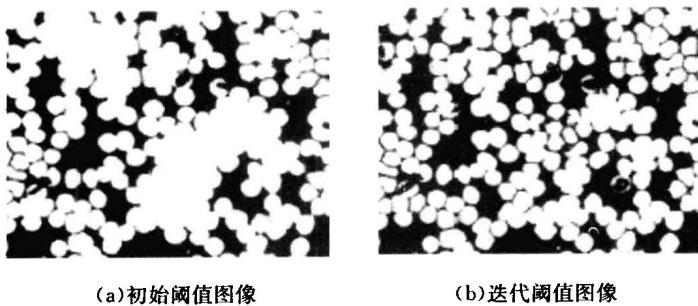


图 1.15 迭代式阈值红细胞分割图像