

# Research of Medicine Micrograph Segmentation Based on Component Selecting

Wang Guoqiang<sup>1</sup>, Xu Xiaoyan<sup>2</sup>

1. Signal and Information Processing Key Laboratory, Heilongjiang University, Harbin, China

2. Heilongjiang Science and Technology Institute, Harbin, China

1. wangguoqiang@hlju.edu.cn

**Abstract:** In this paper, immunohistochemical micrograph of gastric adenocarcinoma marked with Ki67 is studied because characteristics of cell gastric adenocarcinoma is diagnose basis. In order to extract and quantificational analyze accurately, the technology of pre-processing for the gastric adenocarcinoma image, the segmentation of positive objects and the method of average positive stained area percentage have been re-researched. Considered the relationship between the information of color and the content of the micrograph, the primary picture is converted from RGB color space to YIQ. Based on YIQ color space by OTSU threshold segmentation strategy, the interesting area in component I is marked for the difference between foreground and background in the component I is very evident. As is showed in experiments, the segmentation results by the algorithms presented in this paper is very good to extract positive stained area of immunohistochemical micrograph. Quantification result is accurate.

**Keywords:** immunohistochemistry; threshold; image-segmentation

## 基于分量选择的医学显微图像分割方法研究

汪国强<sup>1</sup>, 徐晓燕<sup>2</sup>

1. 黑龙江大学信号与信息处理重点实验室, 哈尔滨, 中国, 150080

2. 黑龙江科技学院利民校区, 哈尔滨, 中国, 150025

1. wangguoqiang@hlju.edu.cn

**【摘要】**本文以 Ki67 标记的胃腺癌细胞免疫组化显微图像为主要研究对象, 胃腺癌细胞的区域特征信息可为病理专家提供诊断依据。为了准确地提取阳性目标区域, 并对其定量分析, 论文对胃腺癌细胞图像预处理技术、阳性区域分割和平均阳性染色区域百分比分析法三个方面进行研究。考虑到颜色信息与图像内容的关系, 对原图像进行了变换色系的处理, 把原始的 RGB 图像变换到 YIQ 颜色空间。基于 YIQ 颜色空间, 利用 OTSU 阈值分割方法, 选取前景和背景区分最明显的 I 分量对感兴趣区域进行阈值分割, 并做标记, 提取目标区域。实验表明, 本文所示的算法对免疫组化显微图像的阳性染色目标区域的提取效果好, 定量准确算法简便。

**【关键词】**免疫组化; 阈值; 图像分割

## 1 引言

免疫组织化学技术从 20 世纪 70 代开始应用于病理组织学诊断中, 近 10 年由于免疫组化技术的发展和进步, 使此项技术广泛应用于肿瘤病理的诊断和鉴别诊断等领域。它是一种综合定位、定性和定量, 将形态机能和代谢密切结合为一体的病理研究和病理诊断技术。

病理科免疫组化定量结果的判断是由病理科医师在显微镜下, 依据阳性细胞的数量、阳性细胞的着色位点和染色的强度进行半定量分析, 但常常因为病理医师的主观因素造成人为误差, 从而影响了肿瘤的评估, 误导了肿瘤治疗。因此, 对免疫组

化阳性表达的细胞核的目标进行计算机识别提取和定量分析有重要的实用意义。

目前国内外在肿瘤免疫组化自动分割方面的研究, 主要研究成果局限在对一些特征明显的组织结构进行自动分割。对肿瘤细胞免疫组化染色结果进行自动分割, 报道较少。其主要原因是肿瘤细胞免疫组化染色结果组织纹理结构复杂, 形态各异, 不同类型的特征难以确定; 此外, 免疫组化显微图像是彩色图像, 颜色是很重要的信息, 传统对灰度图像分割的方法忽略了颜色这一重要特征, 对于这种以颜色为重要判断依据的肿瘤细胞免疫组化染色结果分割有其局限性。

本文主要以 Ki67 标记的胃腺癌细胞显微图像为研究对象, 提取 Ki67 标记的阳性表达区域, 并进行定量

分析。

免疫组化图像的计算机分析方法已逐渐被科研和临床人员接受,其应用程度也越来越深入。计算机分析免疫组化结果,需要操作人员有一定的图像处理专业知识,因此,研究一种简便,可行的方法,来提取免疫组化阳性表达区域是非常有实际价值的。

## 2 免疫组织化学显微图像分析技术

### 2.1 免疫组织化学方法

免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)是用特异性抗体显示组织化学成分的一种方法,抗原多是一种肽或蛋白质。免疫组织化学方法具有特异性强、灵敏度高优点,目前被广泛应用于神经解剖学、病理学等医学基础研究和临床检查,已成为一种重要的科研和临床手段<sup>[1]</sup>。

免疫组织化学的目的是将感兴趣的组织化学成分标记显示出来,以考察该物质的分布并进行定性或定量分析。通常按照被标记对象的不同,可将免疫组织化学分为直接法和间接法。直接法是直接用标记物标记抗体,一次孵育完成;间接法不直接标记第一抗体,而是在第一抗体与组织抗原结合后,用各种方法显示第一抗体。标记方法有多种,目前国内外多采用灵敏度较高的抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合体(Avidin-Biotin-peroxidase Complex, ABC)法,底物多为二氨基联苯胺(Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, DAB)。在免疫组化中,为保证实验结果的可比性,要求尽量保持染色过程的一致,即在操作过程中,尽可能保证孵育时间、试剂浓度及环境条件不变,使不同切片接受尽可能相同的处理,以减少非实验因素的影响。免疫组化的切片图像为彩色图像,其阳性目标依据所采用底物的不同,标记的颜色也不同。以DAB作为底物,目标显示为黄褐色。图像中的非目标区域(背景)有时会存在一定的非特异性染色。

### 2.2 显微图像分析方法

免疫组化的实验结果通常是以切片图像的形式体现的,传统上,免疫组化的切片须在显微镜下,通过人眼直接对显微图像进行信息提取,才能得到一个定性或半定量的实验结果。人工分析的最大优点是操作简单,对染色过程中的一致性要求不太高,较易实现。但是,人工分析方法精度不高,人工分析只能进行图像的定性或半定量分析;其次,由于工作量的限制,人工分析大多只能随机采样感兴趣区中的数个网格进行分析,这就造成了分析结果的代表性不强,准确性不高;此外,人工分析方法的信息丢失量大,

可用来说明实验改变的指标少,图像中较复杂的特征往往无法反映出来。如肿瘤等病灶对周围正常组织的浸润程度,蛋白在某个神经核团中的空间分布特征等。

近来,由于计算机图像采集和分析技术的迅速发展,一些能对图像特征(如分辨率、图像尺度、感兴趣区的大小和灰度)进行记录并量化分析的软件被开发出来,使应用计算机来代替人工对免疫组化图像进行精确的量化分析成为可能。一些学者探讨了图像分析与人工计数方法在免疫组化染色结果评分中各自的优缺点<sup>[20]</sup>,结果证明,图像分析对于免疫组化染色结果的判定,重复性是很好的。并提出了平均阳性染色面积百分比法(Average Positive Staining Area Percentage, APSAP)来进行免疫组化图像结果的分析,用数学方法对APSAP法作出了详细的证明。传统的免疫组化图像信息所参考的重要指标就是阳性细胞百分数,APSAP法从本质上说,也是衡量切片的图像中阳性细胞百分数的方法。统计阳性染色面积占被测量面积的百分比,最后取均值作为此例切片平均阳性染色面积的百分比值,因此对一些人为因素产生的干扰所受到的影响比较小。

现在普遍采用的图像分析方法,多以光密度、平均灰度作为测量指标。光密度是指灰度图像的灰度值或彩色图像的颜色亮度。光密度能较好的反映阳性细胞所表达的蛋白的强度,但由于目前免疫组化的各个步骤未能量化和标准化,所以很多因素,如DAB显色时间的长短、组织切片的厚度、玻片的清洁度、拍摄图像时的光源亮度等等,都可以对结果造成不同程度的影响。APSAP法的理论基础是阳性细胞的百分率,因此,上述因素不能对结果造成显著的影响。本文选用了合适的彩色空间,并应用了有效的分割算法将目标区域提取出来,并没有损失关于阳性染色灰度的信息,改进了APSAP法。

## 3 图像处理

本文以Ki67标记的胃腺癌细胞免疫组化显微图像为研究对象,需将原图中棕色阳性染色目标区域提取出来,并进行定量分析。本文研究的图片,采用S-P法(Streptavidin/Peroxidase)法进行Ki67(单克隆抗体)检测。用北京中杉金桥生物技术有限公司提供的一抗和S-P试剂盒(为过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒),Ki67单克隆抗体按1:80稀释。实验采用间接的方法,不直接标记第一抗体,而是在第一抗体与组织抗原结合后,通过加入过氧化物酶,在底物DAB上显色。

结果为:细胞核棕黄色为Ki67阳性表达。

### 3.1 在 YIQ 空间的均衡化

原图是用 RGB 颜色空间构成的彩色图象,在该图片的 RGB 三个分量的直方图中,并没有明显的波峰与波谷,因而,很难直接根据直方图获取该图片的阈值。将原图从 RGB 空间转换到 YIQ 颜色空间,并对 YIQ 图象进行均衡化。

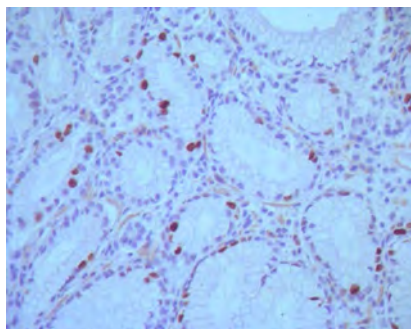


图 1 RGB 原图

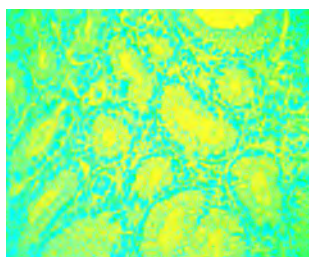


图 2 YIQ 均衡化后的图像

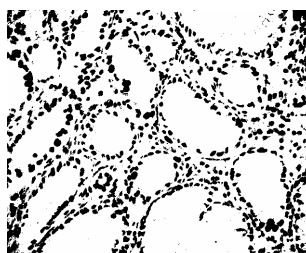
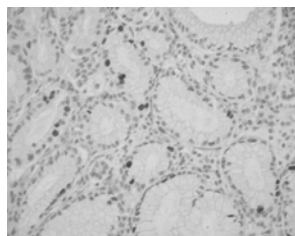
从图中可以看出, YIQ 图像均衡化后有明显的色差,整幅图片被区分为两个区域,即蓝色区域跟黄色区域,阳性标记与背景混在了一起,但是颜色分化是很明显的,我们可以考虑 YIQ 空间的某一分量。

### 3.2 基于 OTSU 法的免疫组化显微图像的阳性区域提取

OTSU 法是由大津于 1979 年提出的,对图像  $I$ , 记  $T$  为前景与背景的分割阈值,前景点数占图像比例为  $w_0$ , 平均灰度为  $\mu_0$ ; 背景点数占图像比例为  $w_1$ , 平均灰度为  $\mu_1$ 。图像的总平均灰度为:  $\mu_T = w_0 * \mu_0 + w_1 * \mu_1$ 。从最小灰度值到最大灰度值遍历  $T$ , 当  $T$  使得方差值  $\sigma^2 = w_0 * (\mu_0 - \mu_T)^2 + w_1 * (\mu_1 - \mu_T)^2$  最大时,  $T$  即为分割的最佳阈值。方差是灰度分布均匀性的一种度量,方差值越大,说明构成图像的两部分差别越大,当部分前景错分为背景或部分背景错分为前景都会导

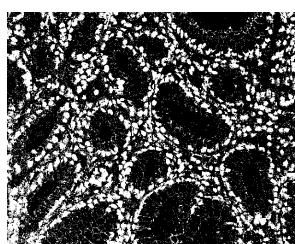
致两部分差别变小,因此使方差最大的分割意味着错分概率最小。

对于我们所研究的胃癌免疫组化显微图片,选择了各种颜色空间,对所选择的空间的某一分量,用 OTSU<sup>[66]</sup>的方法进行阈值分割,验证分割效果。



(a)

(b)



(c)



(d)

图 3 (a) YIQ 空间的 Y 分量 (b) Y 分量阈值分割结果  
(c) Q 分量阈值分割结果 (d) I 分量阈值分割结果

通过试验,从得到的图中我们可以看出,选用 HSI 以及 RGB 空间的分量,再应用 OTSU 的算法,并不能达到提取目标区域的目的。通过将原图像转化为 YIQ 空间,在 I 分量的灰度图中,前景与背景是能够明显区分的。通过读出 I 分量矩阵的值发现,我们所要提取的阳性表达目标区域 I 分量值基本在某个范围内。故考虑可以用阈值法对 I 分量进行分割。因此,空间及分量的选择是非常重要的。

因为所研究的对象为彩色图像,在对彩色图像进行大体了解的基础上,选择一个合适的颜色空间,然后在这一空间上应用灰度图像分割的方法进行处理。经过反复的实验,通过观察可知,基于 YIQ 颜色模型, I 分量图像的表达与我们所要得到的结果十分接近。因为在 YIQ 颜色空间中, Y 分量代表图像的亮度信息, I, Q 两个分量则携带颜色信息, I 分量代表从橙色到青色



的颜色变化,而 Q 分量则代表从紫色到黄绿色的颜色变化。而所要处理的免疫组化显微图像从图片中可明显的看出的阳性表达为棕褐色,阴性表达为青蓝色。这两种差别正好接近于 I 分量所代表的颜色变化,因此,这一分量很适合我们处理的要求。

## 4 图像分割处理

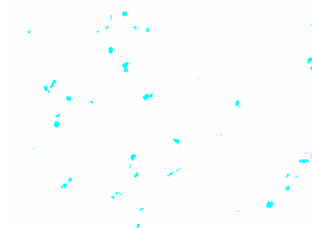
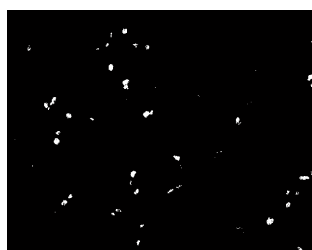
在 MATLAB 7.0 图像处理工具箱中提供了专门的函数 `bwarea`,可以用来获得二值图像的面积。这里的面积可以简单理解为图像前景中像素值为 1 的数量。

### 4.1 基于 YIQ 空间的分割结果处理

实验过程:

- 1.读入免疫组化显微图片。
- 2.将该图片由 RGB 空间转换到 YIQ 空间。
- 3.获得 YIQ 三个分量。
- 4.对 I4.分量用 OTSU 的方法阈值处理。
- 5.获得阳性目标区域,并标记出来。
- 6.计算面积及百分比。

实验结果:



(a)

(b)

图 4 I 分量阈值结果 I 分量标记结果

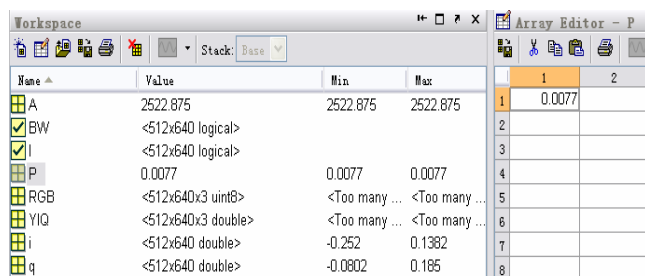


图 5 运行结果

最终得到胃腺癌细胞免疫组化显微图像中阳性染色区域面积百分比为 0.77%。

## 5 结论

本文结合胃腺癌细胞免疫组化显微图像的医学病理基础,结合彩色图像处理与医学图像分割的知识,对于用 Ki67 标记的胃癌细胞核的阳性染色区域进行了提取。实验证明,按照传统的灰度图像分割的方法很难区分前景和背景。而按照切片的颜色信息进行分割的方法,对于阳性染色目标区域的提取是比较简单高效的。

免疫组化显微图像的阳性染色目标区域的提取是肿瘤定量分析的关键一步,也是计算机分析的基础,因此,对图像的分割有很高的要求,目前的各种分割方法都不可能达到普遍适用。对此根据具体问题的特殊性,考虑到了颜色信息与图像内容的关系。对原图像进行了变换色系的处理,把原始的 RGB 图像变换到 YIQ 颜色空间,选取前景和背景区分最明显的 I 分量对感兴趣区域进行阈值分割,并做标记,提取目标区域。应用平均阳性染色区域的面积百分比方法对肿瘤细胞进行定量分析,这种算法是应用计算机的半自动分析方法,对于人工分析的方法有很好的辅助作用。

## 致谢

特别感谢哈尔滨医科大学的赵瑞波教授为本文的研究提供了大量的图像资料,以及许多病理学方面的技术支持。

## References (参考文献)

- [1] 于萍,步宏,王华等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究[J]. 生物医学工程学杂志,2003,20(2):288-290.
- [2] 张凤荣.萎缩性胃炎 Hp 感染率与 Ki67 增殖相关性研究[D].硕士学位论文,哈尔滨医科大学,2005.
- [3] 姜洋,金晓明,屠康. 平均阳性染色面积百分比分析免疫组化结果初探[J].生物医学工程学杂志,2007,24(3):650-653.
- [4] 林开颜,吴军辉,徐立鸿. 彩色图像分割方法综述[J]. 中国图像图形学报,2005,10(1):1-10.
- [5] 田捷,周明全. 医学影像处理与分析[M].北京:电子工业出版社,2003
- [6] Cheng HD, Jiang XH, SunY, et al. Color image Segmentation:advances and prospects [J]. Pattern Recognition,2001,4(12):2259-2281.
- [7] 殷蔚明,王典洪. Otsu 法的多阈值推广及其快速实现[J]. 中国模式学与图像分析,2004,9(4):219-223.
- [8] Si J Y, Nie SD, Chen Y, et al. The development of image analyzing technology in immunohistochemical micrograph [J]. Foreign Medical Sciences, 2002, 25 (3): 11.