

影响生物组织图像灰度测量的因素探讨

曹云新* 陈滨复

(西安第四军医大学中心实验室 西安 710032)

摘要 本文在 MIAS-300 型图像分析仪上对影响生物图像灰度测量的因素进行了探讨, 发现显微光照强度、增益校正值 (*Gain*) 和半灰度门限分割值等 (T_2) 均可影响灰度测量结果, 并直接影响到生物样品化学成份的定量分析, 这些因素应引起测试者的高度重视。

关键词 生物组织图像, 灰度测量, 影响因素

1 前言

MIAS-300 型图像分析仪是采用国内外软硬件为一体的多功能形态学计量仪器, 可用于几何参数测量、金相测量和灰度测量。其中灰度测量在生物医学领域广泛应用。然而在测量中怎样把握灰度测量条件, 使一批样品的测量结果具有较好的可比性是测试者十分关注的。笔者结合灰度测量实践, 对影响灰度测量结果的几个因素进行了探讨。

2 实验

2.1 样品制备

胰酶消化收取小鼠心肌细胞, 无血清 DMEM 培养基洗涤后转入玻璃培养瓶, 加 20% 小牛血清 DMEM 培养基, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。细胞贴壁后生长一定时间, 胰酶消化收取单个心肌细胞悬液, 甩片机制片, HE 染色。

2.2 改变显微光照强度

令显微光照强度未改变时的测量灰度值为 Light^+ , 光照强度增加后为 Light^{++} , 对同一例标本在两种不同的显微光照强度下视场对应各采集 15 幅图像进行处理分析。其步骤为: 图像获取 → 分割 - 单门限分割方式 2 → 自动测量 - 3。

2.3 输入校正 (Clib) 中改变增益校正值 (*Gain*)

固定输入光照条件、对同一例标本在 $\text{Gain}=40$ 和 $\text{Gain}=50$ 处视场对应各采集 15 幅图像进行处理分析, 步骤同前。

2.4 改变门限分割值

在显微光照强度和 *Gain* 条件均固定的输入条件下, 对同一例标本取 15 幅图像, 分别对每一幅图像在 $T_2 < X$ 、 $T_2 = X$ ($T_2 = X$ 为目标物适合的门限分割据值)、 $T_2 > X$ 处各分割测量一次, 步骤同前。

* 通讯联系人。

3 结果与讨论

3.1 显微光照强度与灰度测量结果

显微光照强度与灰度测量结果见表 1。如表 1 所示在显微光照强度为 Light^{++} 时，每幅图像的灰度测量值均低于 Light^{+} 时的值。对两组灰度测量值进行成对 t 检验有显著差异 ($P<0.01$)。

表 1 显微光照强度与灰度测量值间的关系
Table 1 Relation between microscopic light intensity and greyness measured

图像号	灰度值	
	Light^{+}	Light^{++}
1	135.2	118.9
2	142.1	116.3
3	137.9	108.7
4	142.0	120.0
5	128.5	108.3
6	138.0	109.0
7	143.7	116.1
8	139.4	112.9
9	142.1	114.0
10	136.0	110.6
11	143.5	111.2
12	146.5	114.5
13	150.1	112.6
14	147.3	113.7
15	131.0	111.4
$\bar{X}\pm\text{SD}$	140.2 ± 6.0	113.2 ± 3.5

在生物组织图像的灰度测量中，一批样品一般分为多组，需采集上百上千幅图像。由于各组样品含量多少不一，造成染色深浅和背景明暗各有差异。测试者在采集目标图像的过程中，常常需要借助调节显微镜的光圈及光照度的强弱来达到较易观察和快速寻找目标图像的目的。但是在输入图像时，如果忽视了显微光照强度对灰度测量值的影响，必将造成表 1 所示的结果，使本来无差别的同一例标本产生图像灰度测量组间的显著性差异，或者使组间有显著性差异的而测不出差异，甚至出现与实验相反的测量结果。

因此，根据分析以及几年来大量样品的测量经验，我们认为在同一批样品的灰度测量中，应在染色较深与染色较浅样品之间选择一个适中值，在输入图像不丢失灰度层次的情况下，要固定显微光照条件并同时注意室内自然光线的影响。图像最好同批输入。如在时间或计算机容量不允许同批输入时，应对光照条件

做好记录，以便使同一批实验的测试样品有相同的输入条件。这样才能保证灰度测量的准确性和实验组间具有较好的可比性。

3.2 Gain 改变与灰度测量值间的关系

Gain 改变与灰度测量值间的关系见表 2。表 2 表明灰度测量值随 Gain 值的升高均减小。对 Gain=40 组和 Gain=50 组的灰度测量值进行配对 t 检验有显著性差异 ($P<0.01$)。

Clib 的功能是对视频输入通道的增益 (Gain) 和偏移 (offset) 进行校正。通常在视场图像较亮或较暗时可通过增加或减小增益值来改善图像质量。然而在进行生物组织图像的灰度测量时能否随意改变 Gain 值，往往使测试者初用图像仪时十分疑惑。表 2 的测试分析结果说明，Gain 值的改变会使灰度测量值发生变化。

因此，在进行灰度测量时，Gain 不能随视场图像的明暗随意赋值，而应根据一批实验测试样品，在染色较深与染色较浅的样品两端调试出一个使灰度层次不失真的 Gain 值，用以作为一致的输入校正条件，这样才能使灰度测量结果具有意义。

3.3 门限分割值与灰度测量值之间的关系

门限分割值与灰度测量值间的关系如表 3 所列。

表 2 Gain 与灰度测量值的关系
Table 2 Relation between Gain and greyness measured

图像号	灰度值	
	Gain = 40	Gain = 50
1	102.2	73.6
2	99.2	67.4
3	104.8	74.1
4	101.6	72.9
5	98.6	63.5
6	102.8	70.3
7	99.4	65.5
8	99.6	66.1
9	96.3	63.9
10	95.2	62.8
11	101.2	67.5
12	98.4	65.8
13	93.3	60.5
14	97.9	65.5
15	95.9	63.2
$\bar{X} \pm SD$	99.0 $\pm$ 3.0	66.8 $\pm$ 4.1

表 3 门限分割值与灰度测量值的关系
Table 3 Relation between threshold segment values and greyness measured

图像号	灰度值		
	T2 < X	T2 = X	T2 > X
1	159.2	143.2	134.3
2	149.1	142.8	130.1
3	155.1	137.6	129.5
4	152.2	142.7	128.4
5	145.0	136.3	125.1
6	151.2	138.2	130.7
7	149.8	140.1	129.4
8	150.3	137.4	127.2
9	135.4	121.4	110.4
10	145.6	139.2	126.0
11	155.1	133.7	124.2
12	150.1	140.1	131.2
13	156.2	141.8	130.3
14	153.5	140.2	126.4
15	139.1	129.7	116.6
$\bar{X} \pm SD$	149.8 $\pm$ 6.4	137.6 $\pm$ 5.8	126.7 $\pm$ 6.1

在进行灰度测量时，常常需要把图像目标物分割成半灰度图后再进行测量，在此过程中必须设定门限分割值。对于同一批测试样品的各组或各个视场间用统一的门限分割，还是根据视场目标物的灰度设定门限值，是一个在测试中有疑议的问题。为此我们做了大量的样品测试分析工作，从表 3 的结果中可看到：对于同一例标本中抽取的 15 幅图像，仅因门限分割值有所改变，便使每幅图像灰度测量出现不同的差别，对三种门限分割值的灰度测量数据进行统计学处理有显著性差异 ($P < 0.01$)。

对于门限分割值的设定应视各个视场分割的目标物不失真时为最佳分割值。我们用该标准进行了重复性试验，对 15 幅图像作了 6 次测定 (由 3 名操作者分别进行)，结果灰度测量值的变异系数：批内 (同一操作者) $< 1.62\%$ ，批间 (不同操作者) $< 2.98\%$ 。由此，我们认为门限分割值也是影响灰度测量的一个重要因素。

本文对影响灰度测量诸因素的分析，不仅适用于 MIAS-300 型图像分析仪，同时也适用于其它类型的图像分析仪，供更多的测试者在今后有关的定量研究工作中参考。

参 考 文 献

[1] 汤耀法, 李晓群. 上海医科大学学报, 1992, 19 (6): 461-465.
[2] 田村秀等. 《计算机图像处理技术》, 北京师范大学出版社, 1986, 111-119.

Factors Influencing Greyness Measurement of Bio – issues

Cao yunxin Chen Binfu

(Central Laboratory, 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract Microscopic greyness measurement of bio – issues is widely applied in the field of biological medicine. In this study, using MIAS – 300 (Image Analyzer System), we explored the factors influencing the greyness measurement of biological issues. The results of our study indicate that all the microscopic light intensity, Gain values and threshold segment values can influence the measurement results and the quantitative analysis of chemical components of biological samples directly. Therefore, we suggest that the researchers should attach much more importance to these influencing factors in their greyness measurement of bio – issues.

Key words Image of bio – issues, greyness measurement, influencing factors