

基于边缘检测的防风显微图像的分割与表征

梁丽金, 卢文彪*, 王凤梅

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**通过编程实现对防风药材中多种组织结构的量化表征,为定量描述中药材显微鉴定特征提供技术支持。**方法:**根据药材显微图像中主要形态结构的特征,利用数字图像处理技术和采用 MATLAB R2013a 软件编程的方法,进行防风药材横切面各视野显微图像的摄取和编码,采用模板匹配法对各视野灰度图像进行配准并拼接,用 Canny 算子对拼接图像进行边缘检测,通过形态学基本操作对拼接图像进行图像二值化以及分割各种显微特征目标物和分析其大小、形态、数量,并采用系统聚类法对油管和导管的分布进行表征;将提取的4个产地防风药材的数据进行判别分析。**结果:**从样品图像中分割出了防风药材的木栓层、韧皮部、木质部、油管、导管等横切面中的主要显微特征;从分割的图像中各提取了20个参数,经逐步判别分析筛选出12个参数,以此对4个产地防风药材样品在组织形态方面的差异进行判别分析,总正确率为91.4%。**结论:**该方法能较准确地描述4个产地防风药材横切面组织结构的细微差别,这对不同产地防风药材的显微鉴别具有一定的参考意义。

[关键词] 防风; 显微图像; MATLAB; 边缘检测; 定量分析

[中图分类号] R284.1; R931.71; R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0037-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180608

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1229.008.html>

[网络出版时间] 2017-12-26 17:57

Segmentation and Characterization of Saposhnikovia Radix Micrograph Based on Edge Detection

LIANG Li-jin, LU Wen-biao*, WANG Feng-mei

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To realize the quantitative characterization of varied morphological structures in Saposhnikovia Radix by programming, in order to provide technical support for the quantitative description of the microscopic identification characteristics of the Chinese herbal medicines. **Method:** According to the characteristics of the main structures in micrograph of the materials, digital image processing technology and MATLAB R2013a software programming were used for taking and encoding cross sectional micrographs of the materials; registration and stitching for each gray image were completed by template matching; edge detection was conducted for mosaic images using Canny operator; binarization and segmentation were made for microscopic characteristics to analyze the size, shape and number by basic morphological operation; distribution characterization was made for oil tubes and vessels using by hierarchical clustering; and discriminant analysis was performed for the data of the samples from four origins. **Result:** The main microscopic characteristics in the transverse section images of the materials, such as phellem, phloem, xylem, oil tubes and vessels, were respectively segmented into sub images; 20 parameters were extracted from the sub images, and 12 parameters of them were screened out by stepwise discriminant analysis. Through the discriminant analysis of the morphological parameters, the total accuracy of the sample discrimination was 91.4%. **Conclusion:** The method can accurately describe the fine differences of the transverse section tissues

[收稿日期] 20170904(009)

[第一作者] 梁丽金,在读硕士,从事中药质量标准研究,E-mail: 1298915760@qq.com

[通信作者] *卢文彪,博士,副教授,从事中药及其制剂质量标准研究,E-mail: luwb1@gzucm.edu.cn

of the samples, which has certain reference significance for the microscopic identification of the medicinal materials from different origins.

[Key words] Saposhnikoviae Radix; micrograph; MATLAB; edge detection; quantitative analysis

常见的药材横切面显微鉴别大多是通过专业人员的镜下观察,对药材的细胞组织等特征进行描述,现已积累了丰富的宝贵资料;但也存在效率较低、许多鉴别特征(如特征物形状及其在横切面中的分布)难于定量表征^[1]以及不易进行研究资料的统计处理等问题。计算机技术的快速发展和普及应用对中药鉴定新技术的发展起了很大的推动作用^[2-5],可概述为计算机技术在中药鉴定中的应用较多地集中在对各种新技术获取的数据进行模式识别方面^[6-7];而在从图像中提取特征数据方面主要是应用各种图像分析软件(如 Image Pro Plus)进行测算^[8];在编程实现中药材图像特征提取与处理方面仍鲜见报道。由于应用现有图像软件分析图像需要交互式操作和人工观察确定待测对象的边界,因此在效率和精度方面不够理想,也难于对特征物的分布进行定量分析。根据药材显微图像的特点,针对性地研究算法和编程实现图像处理,可望较好地解决上述存在的问题,这对提高药材的显微鉴别水平具有重要的意义。

快速制片和自动存取图像及数据是便捷地批量处理药材显微图像的前提。石蜡切片是较普遍应用的基本制片方法,虽然可根据切片材料的性质和对制片的具体要求而简化制片步骤,但切片脱蜡需要用到有机溶剂且较费时^[9]。考虑到大多数中药材并非鲜活材料,且希望制片过程中能较完整地保存组织中的后含物等鉴别特征的形态,以及采用水溶性包埋材料时易于脱除等因素,相应的制片方法一般无需经过固定、洗涤、染色等步骤。参考已报道方法并进行适应性改进^[10],材料经过聚乙二醇快速包埋(假包埋),切片,漂洗切片等步骤制成临时片,能较好地满足实验要求。在批量处理药材显微图像前,应按一定的顺序依次摄取各张图像并按一定的规则编码保存,编写的模块化程序中包含了图像自动读取、数据按规定格式自动存储等功能,这用一般图像分析软件无法做到。

防风主产于东北、内蒙古等地。实验中选择不产地的防风药材,经过制片、摄图、图像处理等环节,提取了较低倍数光镜下多种鉴别特征的定量参数,并进行统计检验,目的在于开展方法学研究,考察该方法对同种药材因生态环境等因素不同可能引

起的形态结构的细小差别进行分辨的能力。结果表明,所测各组样品的形态结构定量参数的差别具有一定的统计学意义($P < 0.05$)。这可弥补定性、半定量观测资料不易进行统计分析的不足。

1 材料

YL3 型回旋式切片机(上海仪表厂),KQ-500 型超声清洗器(昆明市超声仪器有限公司),YPX-30 型生物显微镜(江西友邦可教仪器有限公司),TDCT 型电子目镜(江南光电集团股份有限公司),MATLAB 软件(R2013a 版,美国 MathWorks 公司)。防风药材购于广州清平药材市场,东北防风(批号 160403,野生品),内蒙古防风(批号 160520,栽培品),山东防风(批号 160811,栽培品),河北防风(批号 170521,栽培品)。经文献和标本对照,并经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定均为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的干燥根。聚乙二醇 2000(PEG2000),水合氯醛等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材抽样与切片 分别随机抽取一定数量的各产地药材样品,各取药材试样中部,切成小段,置于恒湿容器至药材软化;将软化的药材横切面朝下垂直放入包埋模具中,将 PEG2000 加热融化,适当冷却后倒入模具中,置冰箱中冷冻 15~30 min,至凝固变硬;将样品包埋块调整好方向,置切片机上夹紧,切制横切片(厚度 25 μm);抽选完整的切片置于水中展开,超声清洗几秒钟,将切片转移到载玻片上,吸走多余的水分,滴加 2 滴水合氯醛溶液,酒精灯下微微加热使其透化,盖上盖玻片,即得临时装片。

2.2 图像采集与处理

2.2.1 药材横切面显微图像 将切片置于光镜下[20(电子目镜) \times 4(物镜)],按一定顺序摄取各视野图像(部分重叠),将图像灰度化并编码,用最大相关系数模板匹配法配准,并调整各视野图像的灰度值,通过程序可自动拼接得到药材横切面全景显微图像。经裁剪的局部横切面显微图像见图 1。

2.2.2 图像的二值化 为了减少摄图时光照不均匀和各种形态结构灰度不一致对图像二值化的影响,采用 top-hat 滤波,逐级提取灰度图中粗细不同的组织

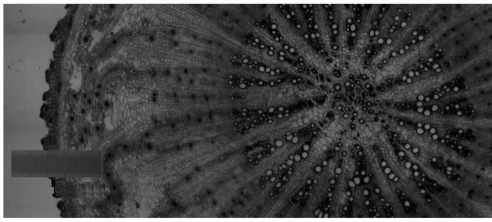


图 1 东北防风样品的局部横切面灰度
Fig. 1 Grey image of local transverse section of Saposhnikovia Radix from northeast China

结构,在控制噪声的基础上逐级选择合适的阈值进行二值化,经去噪、图像合并得到二值图。见图 2。

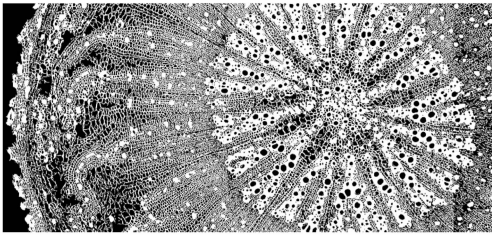
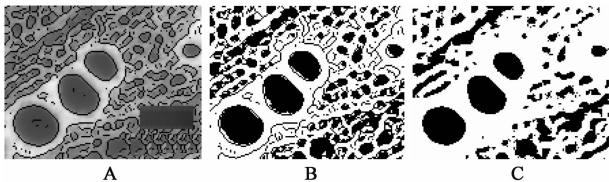


图 2 东北防风样品的局部横切面二值
Fig. 2 Binary image of local transverse section of Saposhnikovia Radix from northeast China

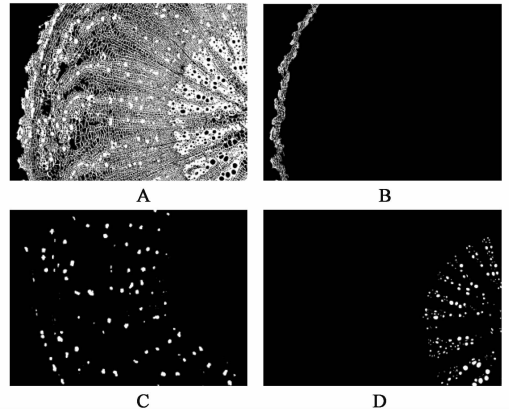
2.2.3 二值图像的误差控制 采用边缘检测的方法控制图像二值化过程出现的误差。为了兼顾灰度图中的强弱边缘,选择 Canny 算子对灰度图象进行边缘检测(双阈值为 0.1 乘以 Canny 算子自动选择的高、低阈值),再将二值图与检测的边缘经过异或、滤除小面积等运算得到界定边界的二值图。经裁剪的局部相关结果见图 3。



A. 标示边缘的灰度反转;B. 标示边缘的二值;C. 界定边界的二值
图 3 东北防风样品局部切面二值图像界定边界示意
Fig. 3 Defining boundaries of binary image of local transverse section of Saposhnikovia Radix from northeast China

2.2.4 图像分割 图像分割是从图像处理到图像分析的重要环节,它是指将一幅图像分解为若干互不交叠、有特定意义的区域^[11]。根据药材中各组织结构在壁厚、空腔大小、分布等形态方面的差异,应用 bwareaopen, imopen, imclose 等函数,对二值图像进行填孔、开闭运算、定位、面积筛分等形态学基本操作,得到相应区域的二值掩模,再与二值图进行逻辑运算,可分割出木质部、韧皮部、木栓层等特征区域;在区域分割的基础上,通过孔隙面积的逐级搜索并以腔孔的圆形度及其周边面积等为约束条件,可从木质部分割出导管内腔(腔面积搜索范围 50 ~ 2 500 像素),从韧皮部和栓内层分割出油管内腔(50 ~ 1 000 像素)。对于充满油的油管内腔,通过二值图逻辑非运算后,以同样方法分割。部分分割结果见图 4。

辑运算,可分割出木质部、韧皮部、木栓层等特征区域;在区域分割的基础上,通过孔隙面积的逐级搜索并以腔孔的圆形度及其周边面积等为约束条件,可从木质部分割出导管内腔(腔面积搜索范围 50 ~ 2 500 像素),从韧皮部和栓内层分割出油管内腔(50 ~ 1 000 像素)。对于充满油的油管内腔,通过二值图逻辑非运算后,以同样方法分割。部分分割结果见图 4。



A. 对照二值;B. 木栓层;C. 油管内腔;D. 导管内腔
图 4 东北防风横切面组织分割
Fig. 4 Tissue segmentation of local transverse section of Saposhnikovia Radix from northeast China

2.3 图像分割结果的参数化表征

2.3.1 横切面各组织的比值参数 由于药材的大小参差不齐,选择与尺度无关的比值参数来描述各组织结构特征较为适宜。试样横切面中主要包括木栓层、韧皮部、木部质等特征区域,以及油管和导管等特征物。应用 blabel 和 regionprops 等函数对各分割图像中的连通区域进行标记、测量和计算,可得各连通区域的面积和直径(以像素为单位,直径以相同面积时圆的直径表示),并参考文献[12]计算目标区域的圆形度和长短轴比等形状参数。面积分数按相同属性连通区域的面积之和除以横切面的面积计算;直径比等于相同属性连通区域的直径之和除以横切面的直径,再除以该种连通区域的个数;目标物的单位面积个数以横切面的面积为计算基准。数据用 SPSS 19.0 中 Kruskal-Wallis 法进行检验,结果见表 1 ~ 3。

2.3.2 导管和油管的分布参数 对于类圆形药材横切面中呈向心分布的各种目标物,采用极坐标来描述并计算各种与尺度和旋转无关的分布参数。以二值图像中横切面的质心为极点,各种目标物的质心为其坐标,通过边界跟踪得到横切面最外周各点

表 1 不同防风组织结构的面积分数 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Area fraction of some tissues of different Saposhnikovia Radix ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

种类	木栓层 (X_1)	韧皮部 (X_2)	木质部 (X_3)	油管内腔 (X_4)	导管内腔 (X_5)
东北防风	0.053 ± 0.011 ^a	0.534 ± 0.067 ^a	0.125 ± 0.049 ^a	0.003 ± 0.003 ^a	0.010 ± 0.005 ^a
内蒙古防风	0.068 ± 0.013 ^b	0.486 ± 0.056 ^b	0.161 ± 0.034 ^a	0.002 ± 0.002 ^a	0.005 ± 0.002 ^b
山东防风	0.054 ± 0.011 ^a	0.542 ± 0.049 ^a	0.135 ± 0.025 ^a	0.003 ± 0.003 ^a	0.003 ± 0.001 ^c
河北防风	0.103 ± 0.024 ^c	0.514 ± 0.046 ^a	0.086 ± 0.035 ^b	0.005 ± 0.001 ^b	0.004 ± 0.002 ^c

注:同列数据的上标字母不同者表示差异有统计学意义 $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 不同防风导管的比值参数 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Ratio parameters of vessels of different Saposhnikovia Radix ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

种类	直径比 (X_6)	长短轴比 (X_7)	离心率 (X_8)	单位面积个数 ($\times 10^5$) (X_9)
东北防风	0.005 ± 0.001 ^a	0.810 ± 0.021 ^a	0.552 ± 0.027 ^a	3.9 ± 1.0 ^a
内蒙古防风	0.004 ± 0.001 ^b	0.793 ± 0.022 ^b	0.577 ± 0.029 ^b	3.4 ± 1.3 ^a
山东防风	0.004 ± 0.000 ^c	0.813 ± 0.024 ^a	0.547 ± 0.033 ^a	2.6 ± 0.8 ^b
河北防风	0.006 ± 0.001 ^a	0.816 ± 0.024 ^a	0.545 ± 0.033 ^a	1.7 ± 0.8 ^c

表 3 不同防风油管的比值参数 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Ratio parameters of oil tubes of different Saposhnikovia Radix ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

种类	直径比 (X_{10})	长短轴比 (X_{11})	离心率 (X_{12})	单位面积个数 ($\times 10^5$) (X_{13})	圆形度 (X_{14})
东北防风	0.005 ± 0.001 ^a	0.698 ± 0.027 ^a	0.682 ± 0.029 ^a	1.4 ± 0.57 ^a	0.806 ± 0.046 ^a
内蒙古防风	0.004 ± 0.001 ^a	0.704 ± 0.036 ^a	0.673 ± 0.044 ^a	1.3 ± 0.50 ^a	0.876 ± 0.060 ^b
山东防风	0.005 ± 0.001 ^a	0.728 ± 0.036 ^b	0.639 ± 0.043 ^b	1.4 ± 0.53 ^a	0.901 ± 0.038 ^b
河北防风	0.007 ± 0.001 ^b	0.699 ± 0.019 ^a	0.686 ± 0.021 ^a	1.7 ± 0.99 ^a	0.907 ± 0.016 ^b

坐标,以备转换坐标时建立插值方程。经过坐标转换,可得到各目标物的极角值;用目标物的极径除以相同极角时边界点的极径,得到目标物的相对极径(0~1)。采用系统聚类法, MATLAB 中各种可用的样品间距离和类间距离计算方法,选择 cophenet 复合相关系数最大时的距离计算方法创建分类(极角差值选择顺时针和逆时针两个方向中的较小值)。根据样品实际情况限定聚类数范围(≥ 3),选择

类间距离最大时的聚类数。

角向聚类(0~2 π)是以各目标物的极角值为变量进行聚类,旨在反映目标物在一定角度范围的成束特征;径向聚类(0.2~1)则以目标物的相对极径为变量进行聚类,用于目标物聚集成环的表征;坐标聚类的变量为极角和相对极径,它描述坐标相近的目标物聚集成群的情况。数据用 SPSS 19.0 中的 Kruskal-Wallis 法进行检验。结果见表 4。

表 4 不同防风导管和油管分布特征的聚类分析 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Cluster analysis results of distribution characteristics of vessels and oil tubes of different Saposhnikovia Radix ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

种类	导管角向聚类 (X_{15})	导管径向聚类 (X_{16})	导管坐标聚类 (X_{17})	油管角向聚类 (X_{18})	油管径向聚类 (X_{19})	油管坐标聚类 (X_{20})
东北防风	15.62 ± 5.14 ^a	3.65 ± 1.93 ^a	17.25 ± 5.69 ^a	16.18 ± 5.04 ^a	4.25 ± 2.22 ^a	16.05 ± 4.25 ^a
内蒙古防风	15.70 ± 6.68 ^a	6.23 ± 4.23 ^b	22.90 ± 6.98 ^b	19.83 ± 8.32 ^a	3.60 ± 1.43 ^b	17.48 ± 7.72 ^a
山东防风	18.00 ± 6.38 ^a	11.48 ± 4.50 ^c	23.53 ± 6.31 ^b	16.38 ± 7.09 ^a	3.75 ± 1.92 ^a	20.15 ± 8.14 ^a
河北防风	21.72 ± 5.69 ^b	3.48 ± 0.83 ^a	20.82 ± 4.96 ^b	25.05 ± 3.11 ^b	3.55 ± 1.57 ^c	24.60 ± 2.74 ^b

2.4 判别分析 采用逐步判别分析法,以 Wilks' Lambda 作为评价指标,表 1~4 中的 20 个参数 ($X_1 \sim X_{20}$) 为变量,经标准化后,按照变量的贡献大小逐个引入和剔除变量(当计算的 F 值大于指定的 2.0 时,保留该变量, F 值小于 0.5 时,则剔除),最终选定其中 12 个参数建立判别函数。根据 SPSS 19.0 计算的标准化判别函数系数,得到 3 个典型判

别函数式,其中第一判别函数的特征值为 1 160.009,特征值贡献率达到了 99.6%,典型相关系数为 1.000。第一判别函数式见下式, $F_1 = -0.102X_1^* - 0.033X_3^* + 0.441X_5^* - 0.147X_6^* - 0.167X_8^* - 0.495X_9^* - 0.161X_{10}^* + 2.579X_{11}^* + 3.313X_{12}^* + 1.138X_{14}^* - 0.173X_{15}^* - 0.036X_{16}^*$,式中带星号的变量 X^* 为标准化后的相应编号的参数。

用 Wilks' Lambda 对判别函数进行检验,结果显示该判别函数有统计学意义($P = 0.000$)。该方法对初始分组的 80 个样品判别正确率为 93.8%,对交

叉验证分组样品判别正确率为 90%,其余未分组 14 个试验样品判别正确率为 86%,总正确率为 91.4%。结果见表 5。

表 5 不同防风样品判别分析

Table 5 Discriminant analysis results of different Saposhnikoviae Radix

种类	初始分组			交叉验证分组			未分组			综合		
	样品数 /个	正确分类 /个	正确率 /%	样品数 /个	正确分类 /个	正确率 /%	样品数 /个	正确分类 /个	正确率 /%	样品数 /个	正确分类 /个	正确率 /%
东北防风	20	19	95.0	20	17	85	3	2	66.7	43	38	88.4
内蒙古防风	20	18	90.0	20	17	85	4	4	100	44	39	88.6
山东防风	20	18	90.0	20	18	90	2	1	50.0	42	37	88.1
河北防风	20	20	100	20	20	100	5	5	100	45	45	100

3 讨论

由于受药材内部原有裂隙、切片制作过程以及拍摄时光照均匀性等因素的影响,药材中较大内腔的薄壁组织区域不易获得连续、完整的细胞壁图像,如要测算较大薄壁细胞的数量和大小则误差不易控制。现有鉴定特征也是以厚壁组织和较小内腔的薄壁组织为主的。

在分割油管和导管内腔时,图像中太小的孔隙有时意义不明确,影响因素较多,因此搜索范围排除了 50 像素以下的孔隙;测得各样品中导管内腔的圆形度比较一致,较接近 1,故没有选择导管内腔圆形度作为表征参数;少数油管周围的分泌细胞部分缺损,须经闭运算再搜索,其内腔面积会因形态学操作带来一定的误差,而缺损严重时无法闭孔,需辅以交互式操作。聚类分析导管和油管的分布参数时,结果受到不规则分布的少数目标物的影响较大,通过限定聚类范围(如相对极径范围为 0.2 ~ 1)可得到改善。

实验结果与文献描述基本一致,如韧皮部较宽、木质部导管甚多等^[13];测算的参数能较好地分辨出各组样品在形态结构方面的差异($P < 0.05$)。然而,这一探索性研究仍有许多不足,如在分割算法的自适应性、分布参数测算方法的抗干扰性等方面仍有较大的改进空间。

[参考文献]

[1] 马诗瑜,沈岚,洪燕龙,等. 化学计量学在中药定量表征中的应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(12): 2700-2707.

[2] 肖小河,夏文娟,秦松云,等. 国产姜黄属药用植物叶

表皮显微图像模式识别[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 523-528.

[3] 曹蕴虹. 中药鉴定新技术的发展概况[J]. 黑龙江科技信息, 2012(3): 107-108.

[4] 侯青,李伟,侯宝峰,等. 基于 VC 的叶类中药显微特征识别软件设计[J]. 计算机技术与发展, 2014, 24(6): 56-58, 62.

[5] 毛鹏飞,郭巧生,汪涛,等. 药用菊花种苗计算机快速鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 38(8): 1143-1147.

[6] 杨诗龙,王瑾,汪云伟,等. 基于电子鼻与人工神经网络的陈皮鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 112-114.

[7] 吕惠玲,万茶艳,程存归,等. ATR-FTIR 及人工神经网络分类法鉴别薏苡仁与伪品草珠子种仁[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 845-847.

[8] 刘峰群,贺承山,秦路平,等. 三种麦冬的显微图像分析与鉴定[J]. 解放军药学报, 2000, 16(4): 221-223.

[9] 雷忠萍,贺道华,曹翠兰. 中药显微鉴定常见的几种制片方法[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1922-1924.

[10] 潘春华,徐在海,刘景兰. 免疫病理组织的聚乙二醇包埋制片技术[J]. 军事医学科学院院刊, 1984(2): 231-233.

[11] 秦襄培,郑贤中. MATLAB 图像处理宝典[M]. 北京: 电子工业出版社, 2011: 341.

[12] 罗雪宁,彭云发,代希君,等. 基于 MATLAB 的红枣图像处理研究[J]. 农机化研究, 2015, 37(3): 183-186.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 149.

[责任编辑 顾雪竹]