

活体细胞三维图像科学可视化方法的研究

熊俊, 李栋栋, 瞿安连, 徐涛

(华中科技大学生命科学与技术学院生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074)

摘要: 科学可视化是指运用计算机图形学和图像处理技术, 将科学计算过程中或者是计算结果的数据转换为图形或图像, 在屏幕上显示出来并进行交互式处理的理论技术或方法。介绍了用反卷积荧光显微成像技术获得活体大鼠胰腺 β 细胞三维图像及其进行科学可视化的主要过程和两种常用可视化算法, 并运用这两种方法对所得到的三维图像进行处理以分析和研究细胞内分泌囊泡的空间分布。结果显示, 当仅观察细胞三维图像的二维切片时, 三维图像中的某些重要信息会被忽略, 而使用科学可视化方法则可以从三维角度直观观察活体细胞内分泌囊泡的空间分布, 并且可以观察到分泌囊泡的释放趋势和整体分布, 从而为细胞生物学研究提供重要的信息。

关键词: 科学可视化; 反卷积荧光显微技术; 光学切片; 三维图像

中图分类号: Q334

1 引言

科学计算可视化 (visualization in scientific computing) 是指运用计算机图形学和图像处理技术, 将科学计算过程中或计算结果的数据转换为图形或图像, 在屏幕上显示出来并进行交互式处理的理论、方法和技术^[1], 一般简称为科学可视化 (scientific visualization)。其主要功能是从复杂的多维数据中产生图形, 也可以分析处理送入计算机的图形数据。

近年来的研究表明, 细胞对胞内各种活动存在着空间特异的调节功能。对胞内钙库和分泌活动关系的研究也表明, 不同胞内钙库对分泌的激发效率不同, 说明不同钙库与分泌囊泡的空间位置不同。因而研究囊泡的空间分布和定位, 对于了解细胞如何对分泌活动实现空间特异的调控有着重要意义。

为观察分泌囊泡和钙离子在细胞内的空间特性, McNally 等^[2]提出了三维反卷积荧光显微成像技术。在弱荧光条件下沿显微镜光轴采集生物样本的二维光学切片图像, 然后应用反卷积图像恢复算法对因受到焦外光影响而变得模糊的原始图像进行恢复, 在一定程度上改善图像质量, 从而以三维图像反卷积结果为基础, 使用科学可视化技术实现三维图像数据的显示。科学可视化技术使我们能够更加直观地观测和研究囊泡的空间大小和位置分布, 有利于我们对活体细胞内囊泡进行空间定位和对分

泌活动进行定量分析。

2 材料和方法

2.1 数据采集处理系统

数据采集处理系统由宽场荧光显微镜 (IX70, Olympus, Japan), 物镜 (APO 100x/1.65 NA Oil HR, UPlanApo 100x/1.35 NA Oil Iris, Olympus), 单色光源及控制器 (POLYCHROME IV, Till Photonics GmBH, Germany), 电荷耦合器件 (charge-coupled device, CCD) (SensiCam, SVGA, PCO, Germany), 计算机 (P4 1.7 G, 1 G RAM), 压电 z 轴扫描控制器 (E-662 LR, Physik Instruments, Germany), 图像采集软件 (Till vision 4.0, Till Photonics GmBH) 等构成, 如图 1 所示。实验中使用图像采集软件控制单色激发光波长及曝光时间, 激发光通过二色分光镜照射到样本, 样本受激发射的荧光经同一个二色分光镜和随后放置的滤光片到达 CCD, 三维样本此时位于显微镜焦平面的

收稿日期: 2003-01-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (60071030), 国家自然科学基金重点项目 (30130230), 国家杰出青年基金项目 (30025023)

通讯作者: 瞿安连, 电话: (027)87464579-86;

E-mail: alqu@mail.hust.edu.cn

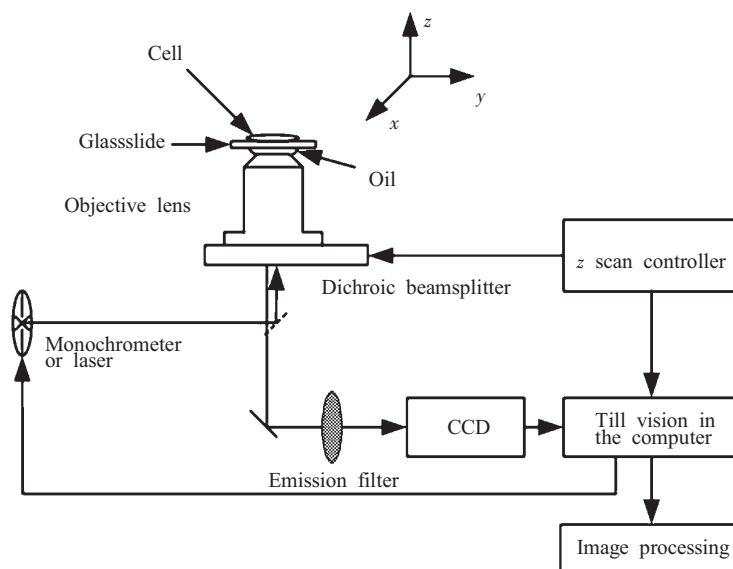


Fig.1 Essential components of the digital imaging microscope system

荧光图像被 CCD 记录到, 随后图像数据被送到计算机。控制压电 z 轴扫描控制器使显微镜焦平面沿 z 轴步进就可以对三维样本逐面成像。本文将光轴定义为 z 轴, 显微镜焦平面定义为 x - y 面。采集的图像然后在计算机里进行反卷积恢复处理和科学可视化工作。

2.2 细胞准备和囊泡标记

大鼠胰腺 β 细胞的原代培养方法本研究所已有报道。吖啶橙(acridine orange)是一种可以跨膜扩散的荧光染料, 主要被分泌囊泡等嗜酸性囊泡摄取, 因此本文使用吖啶橙(Molecular Probes, Eugene, OR)对细胞内分泌囊泡进行标记。细胞贴壁后, 使用 $3 \mu\text{mol/L}$ 吖啶橙溶液在 21°C 条件下孵育 15 min ^[3], 然后用 β 细胞标准外液将细胞冲洗干净。外液成分为(mmol/L): NaCl 138; KCl 5.6; MgCl_2 1.2; CaCl_2 2.6; Glucose 3; HEPES 5 ($\text{pH}=7.4$)。观察时, 先在明场条件下找到活性较好的细胞, 然后用波长为 488 nm 激发光激发, 发射光波长峰值约为 540 nm 。

2.3 光学切片技术

光学切片(optical sectioning)方法是从厚样本中提取三维信息的一种方法。当二维平面处于光学系统物空间焦平面时, 其在像空间的成像最为清晰, 因此光学切片方法也就是将显微镜的聚焦平面以一定步进间隔依次置于三维生物样本的不同位置并采集样本位于聚焦平面的二维图像。采集到的二维切片图像称为光学切片, 样本的三维图像由一组

光学切片图像重构而成。

假设显微镜的点扩展函数(point spread function)为 $h(x,y,z)$ 、样本函数为 $f(x,y,z)$ 、图像函数为 $g(x,y,z)$, 在理想的光学系统中我们可以建立如下成像数学模型:

$$g(x,y,z) = \iiint h(x_1,y_1,z_1)f(x-x_1,y-y_1,z-z_1)dx_1dy_1dz_1 \quad (1)$$

也就是样本函数和图像函数之间是一种线性关系, 即卷积关系。我们通常把式(1)写成

$$g(x,y,z) = f(x,y,z) \otimes h(x,y,z) \quad (2)$$

式中 \otimes 为卷积符号

2.4 反卷积图像恢复

用宽场荧光显微镜对经荧光染料标记的活体细胞进行观察时, 存在的主要问题是每片二维光学切片图像实际上是焦平面光信息和焦平面外光信息的叠加, 这会导致焦平面图像变得非常模糊。我们必须通过图像恢复算法去除焦外光影响, 即对图像将 $g(x,y,z)$ 进行反卷积运算。

反卷积算法分为线性和非线性算法两大类。和非线性算法相比, 线性算法方法简单, 处理时间较少, 但是处理后图像的质量相对较差; 非线性算法相对复杂, 处理效果好, 但耗时较长。因此需要根据特定试验要求选用反卷积算法, 在处理时间和图像恢复质量之间取得较好折衷。本文所采用的反卷积算法是基于最大似然的最大期望迭代算法(expectation maximization)^[4], 程序使用 Microsoft Visual

C++ 6.0 编写。

2.5 科学可视化

科学可视化的目标是运用计算机图形学和图像处理技术,将数据转换为图形或图像在屏幕上显示出来,并进行交互式处理。本文研究了两类最常用的可视化算法:等值面绘制算法和体绘制算法^[1]。

2.5.1 等值面绘制算法

等值面绘制算法(isosurface rendering)^[1-5]首先在三维空间数据场中构造中间几何图元,然后用传统的计算机图形学技术实现图形绘制。在三维空间数据场中构造等值面有很多算法,其中最常见的是行进方块(marching cube)算法,它主要用于三维空间规则数据场中。

在行进方块算法中体素(voxel)是一逻辑上的立方体,由相邻两层上的各四个像素组成的立方体的八个顶点组成。其基本思想是处理数据场中的所有立方体体素,首先比较体素顶点和所给定的等值面阈值以进行分类,从而构造体素状态表,由状态表得到与等值面有交点的体素边界,然后采用插值计算出等值面与立方体体素边的交点。利用中心差分法求出体素各顶点的法向,再通过线性插值求出三角形各顶点处的法向。最后根据各三角片各顶点的坐标值和法向量绘制等值面图像。

2.5.2 体绘制算法

体绘制(volume rendering)^[1]技术是将三维空间的离散数据直接转换为二维图像而不必生成中间几何元,它的实现实际上是一个三维离散数据场的重新采样和图像合成的过程。

本文所采用的体绘制算法是光线投射法(ray-casting),这是一种使用图像空间扫描实现体绘制的离散方法。其基本原理是把经过预处理后的数据进行数据值分类,根据数据值的不同,正确地将其分为若干类并给每类数据赋予不同的颜色值和不透明值,以正确地表示各种物质的不同分布或者是单一物质的不同属性;然后重新采样,即从屏幕上的每一个像素点根据设定的观察方向发出一条射线,穿过三维数据场,沿这条射线选择 k 个等距的采样点,并由距离某采样点最近的8个数据点的颜色值和不透明度值作三次线性插值,求出该采样点的不透明度值及颜色值;最后进行图像合成,即将每条射线上各采样点的颜色值及不透明度值由前向后或者是由后向前加以合成,即可得到发出射线的像素点处的颜色值,从而得到最终图像。

在实际应用中我们需要根据具体实验对成像效

果和算法效率的不同要求选择适当的方法。

3 结 果

3.1 图象采集及恢复后结果

本实验使用 APO 100x/1.65 NA Oil HR 物镜, x - y 平面采样间隔为 $0.067 \mu\text{m}$, z 轴步进间隔为 $0.2 \mu\text{m}$, 均满足奈奎斯特采样定理。三维数据矩阵大小为 $256 \times 256 \times 64$ 。原始图像和经过反卷积恢复之后的切片图像如图 2 所示。在得到的图像中,荧光亮点指示细胞内分泌囊泡的位置和形态。从图 2 中恢复前后的图像对比可以看出三维反卷积恢复算法能有效去除焦外光造成的模糊,指示囊泡位置的荧

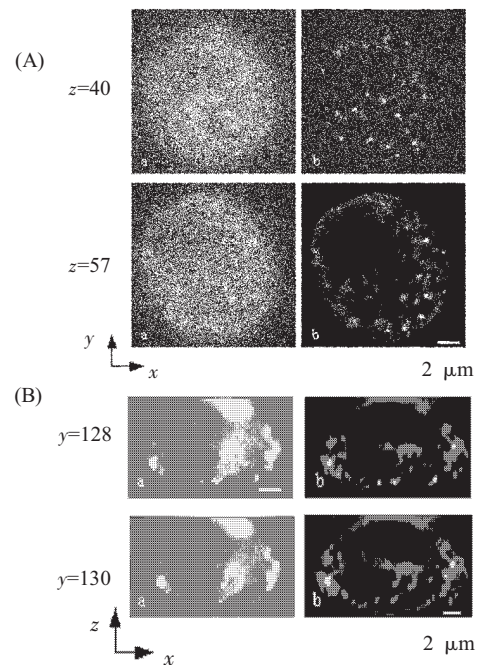


Fig.2 x - y plane and x - z plane images of rat pancreatic β cells three-dimensional images. a: Original images; b: Deconvolved images (1000 times iteration with EM). (A) is x - y plane images, the top is №13, the bottom is №19; (B) is x - z plane images, the top is №128, the bottom is №130. In №128 slice image of x - z plane the white line is the possible position of glassslide

光亮点得到突出,图像质量得到明显改善。

3.2 科学可视化结果

为了从三维的角度更加直观地观察细胞内囊泡的空间位置,我们用科学可视化技术显示反卷积处理后的三维体数据,这一过程属于三维标量场可视化技术范畴。考虑到采集图像时 x - y 平面采样间隔为 $0.067 \mu\text{m}$, 而 z 轴步进为 $0.2 \mu\text{m}$, 所以我们在科学可视化过程中设定 x 、 y 、 z 轴上空间距离大小

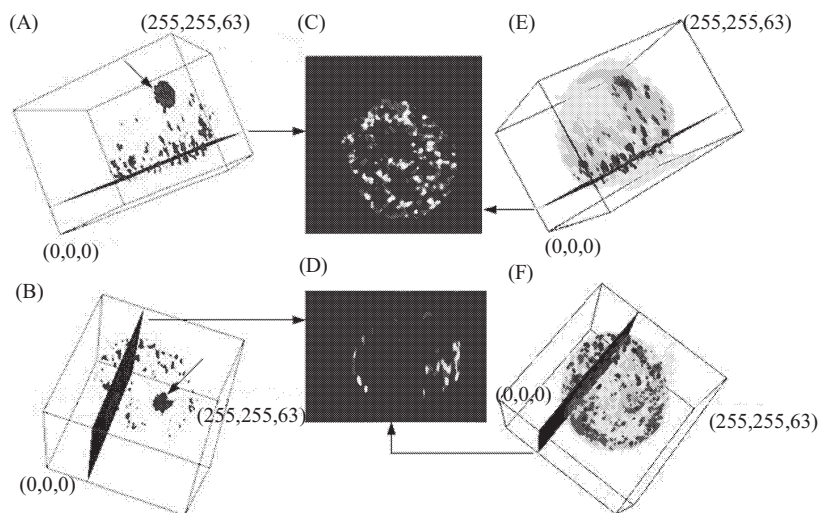


Fig.3 Display of scientific visualization of three-dimensional images of rat pancreatic β cells. (A、B) display views of isosurface rendering from different angles; (E、F) display views of volume rendering from different angles; (C、D) the slice image of (A、B、C、D) (display as black for view angle), (C) №15 slice image of x - y plane, (D) №77 slice image of x - z plane

比为 1 : 1 : 3, 以得到三维样本的真实形状。在图 3A、B 中采用等值面绘制时所选用的阈值为 3000, 所以显示出来的是所有灰度值为 3000 的点组成的一系列曲面。采用体绘制的时候最关键的是光照模型的建立, 本文中我们认为灰度值在 0~400 的像素是背景噪声和溶液, 灰度值在 400~3000 的像素是细胞膜和胞内物质, 灰度值在 3000 以上的像素是囊泡。运用上述光照模型我们得到图 3E、F 所示的三维图像。

在图 3 中我们可以看出通过科学可视化技术显示出的三维图像可以清晰直观地显示囊泡在细胞内部的空间位置和形态。

4 讨论和展望

图 3 中所显示的很大的荧光亮团(A 和 B 中箭头所指位置)很明显不是囊泡。由于吖啶橙是一种跨膜扩散的荧光染料, 在细胞内部被嗜酸性物质摄取并累积, 以一定的浓度和孵育时间处理细胞, 囊泡可以被标记, 但是因为吖啶橙的标记特异性不好, 所以高尔基体和内质网等酸性细胞器也有可能被标记, 所以荧光亮团可能是高尔基体或者内质网。同时通过科学可视化图像可以较为清晰地观察到细胞内分泌囊泡有一种由荧光亮团逐渐释放的趋势, 而这一点在观察普通切片图像时却被我们所忽略。分泌过程研究是细胞生物学研究中重要的组成部分, 虽然使用电生理方法和全内反射等荧光显微

技术对分泌囊泡锚定、胞吐等分泌最后过程的研究已经取得了巨大进展, 但对于分泌囊泡如何从胞内细胞器释放, 以及囊泡在胞内如何向膜转运的动态过程及分子机制目前还不清楚。虽然本文的实验数据只是对囊泡的释放趋势做了提示, 但这些提示必然会为我们更进一步进行囊泡释放和转运过程的研究产生积极的推动作用。

以往观察细胞三维图像只是从二维切片图像获得信息, 这会导致我们经常无法得到细胞在三维空间反映出的一些重要性质。科学可视化研究使我们可以直观地分析感兴趣目标在细胞内部三维空间的分布, 为细胞生物学提供了有利的研究手段。

科学可视化所采用的两类方法有自己的优缺点。等值面绘制算法能够对我们感兴趣的等值面产生清晰的图象, 但是不能表现数据的全貌及某些细节, 由图 3A、B 可见等值面绘制算法能够让我们很清楚的看到囊泡(图中显示为深色的部分)的大小和空间位置, 但是由于缺少细胞本身的信息, 所以不能观察到囊泡与细胞膜(未标记, 通过荧光阴影辨认)之间在空间上的关系。体绘制算法能够生成整体图像, 表现细节, 如图 3E、F 所示。运用体绘制算法能使我们观察到细胞的大小、空间位置等整体情况, 但是由于遮挡和光线阻光度的影响, 我们所观察到的囊泡有些模糊, 空间位置感不强。比较两种方法的成像处理时间和硬件要求, 等值面算法花费的时间较少, 对硬件要求也相对较低。所以在实际应用时应根据观察目标和所需要成像效果

的不同, 选用适当的算法。

使用三维荧光反卷积成像技术可以长时程连续采集活体细胞三维图像, 并得到清晰的反卷积处理后的图像。将科学可视化技术和三维荧光反卷积成像技术结合起来, 不仅可以使我们从某一时刻的细胞三维图像中获得重要的信息, 而且能够使我们观察连续采样不同时刻的三维动态图像, 这将有助于研究发生在细胞内的动态过程。

参考文献:

- [1] 唐泽圣. 三维数据场可视化. 北京: 清华大学出版社, 1999
- [2] McNally JG, Karpova T, Jahn C, Conchello JA. Three dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods*, 1999,19:373~385
- [3] Steyer JA, Almers W. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 1999,76:2262~2271
- [4] Conchello JA, McNally JG. Fast regularization technique for expectation maximization algorithm for computational optical sectioning microscopy. In: Cogswell CJ, Kino G, Wilson T. Three-dimensional microscopy: Image acquisition and processing. Proceedings of the 1996 IS&T/SPIE symposium on electronic imaging: science and technology. Bellingham, Washington, USA: published by SPIE-the international society for optical engineering, 1996, SPIE code No 2655-24:199~208
- [5] Lorensen WE, Cline HE. Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm. *Computer Graphics*, 1987, 21(4):163~169

STUDIES ON THE METHOD FOR SCIENTIFIC VISUALIZATION OF THREE-DIMENSIONAL IMAGES OF LIVING CELLS

XIONG Jun, LI Dong-dong, QU An-lian, XU Tao

(Institute of Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Scientific visualization can be used to deal with processing or processed scientific datum and to display them on the screen so as to analyze and process these images interactively by image processing and computer graphics technique. The article concerned in the program of scientific visualization of three-dimensional images of living rat pancreatic β cells by three-dimensional deconvolution imaging microscopy. Two visualization algorithms were studied and used to process the three-dimensional deconvolved images of rat pancreatic β cells in which granules was labeled by acridine orange. Scientific visualization results reveal some missed important information when only the two-dimensional slice images of the whole three-dimensional image were investigated, such as the possible trend of granules' release and the whole space distribution of granules.

Key Words: Scientific visualization; Deconvolution fluorescence microscopy; Optical sectioning slice; Three-dimensional image