

技术与方法

基于灰度共生矩阵的植物细胞微管骨架纹理分析

吕毅¹ 倪云鹿² 商澎^{1*}

(¹西北工业大学生命学院空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所, 西安 710072; ²西北工业大学航海学院, 西安 710072)

摘要 微管骨架在植物细胞内担负着许多重要功能, 其形态结构的改变预示着功能可能发生了变化。目前, 研究者普遍采用荧光成像技术对微管骨架形态进行观察, 鲜有从量化角度对其进行描述和分析。该文根据植物细胞间期周质微管阵列的自身特点, 采用灰度共生矩阵法对植物细胞微管骨架进行纹理分析, 并结合因子分析筛选出2个有代表性的特征参数(逆差距和方差), 主要反映了纹理的规则程度和纹理的周期性等信息。为了进一步验证所选参数的应用效果, 选取两种不同排列状态的周质微管图像进行比较分析, 统计结果显示, 两种图像的逆差距和方差值差异显著, 说明所选参数有较好的代表性, 并且减少了灰度共生矩阵分析过程的计算量, 为微管骨架的定量分析及更好地描述微管骨架形态变化提供了借鉴和参考。

关键词 微管; 灰度共生矩阵; 纹理分析; 因子分析

Texture Analysis of Plant Microtubule Cytoskeleton Based on Gray Level Co-occurrence Matrix

Lü Yi¹, Ni Yunlu², Shang Peng^{1*}

(¹Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environment Biophysics, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; ²School of Marine, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract Microtubules play an important role in plant cell biochemical and physiological process. It is recognized that the changes of microtubules structure will be indicated the functional alter. At present, most researchers used fluorescence imaging technology to observe and describe microtubule cytoskeleton. Few quantification methods are applied in microtubules analysis. In this paper, according to the characteristic of plant cortical microtubule array, gray level co-occurrence matrix algorithm was used to make texture analysis for plant cortical microtubule and 2 representative texture parameters (inverse different moment and variance) were selected which reflected the regularity degree and periodicity information of texture. In order to identify the application of the selected parameters, two types of plant cortical microtubule image were compared by statistical analysis. The result showed that the differences of Inverse different moment and Variance between the two groups are significant, respectively. It is indicated that the two selected texture parameters are representative as well as convenient and time-

收稿日期: 2012-12-03 接受日期: 2013-01-29

*通讯作者。Tel: 029-88460391, Fax: 029-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: December 3, 2012 Accepted: January 29, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-29-88460391, Fax: +86-29-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

网络出版时间: 2013-04-11 17:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130411.1716.003.html>

saving by using this kind of analyzing method. In conclusion, it is provided a reference to better description and quantitative image analysis of microtubules morphology changes in this paper.

Key words microtubules; gray level co-occurrence matrix; texture analysis; factor analysis

微管骨架在维持细胞形态结构^[1]、参与细胞分裂^[2]、细胞信号传导^[3]、细胞壁形成^[4]等方面发挥着重要功能,它几乎参与到细胞的所有生命活动过程中。微管的聚合和解聚是一个高度动态的过程,外界环境(如温度^[5]、水分^[6]、力学刺激^[7]等)的微小变化就可能引起微管骨架结构发生改变。传统方法一般采用抗体标记的免疫荧光染色方法来观察微管形态,尽管该方法已经在微管结构功能研究方面取得了进展,但其操作流程复杂,而且很难进行实时观测。GFP与微管及其相关蛋白的融合表达技术的出现和应用,使得对微管骨架结构和功能的观察更方便,研究更深入。然而,迄今为止,对微管骨架形态进行的观察等多属于定性研究,使用定量手段对其进行深入分析的研究并不多,尤其是对植物微管骨架分析的更鲜有报道。

纹理分析是通过获取图像的纹理特征,来对纹理定量或定性描述的一种图像分析技术。纹理分析方法一般可分为四大类:统计法、结构法、模型法以及基于频谱分析的转换法^[8]。作为经典的统计分析方法,灰度共生矩阵法被证明是行之有效的,目前已被广泛地应用于地质勘测^[9]、植被监测^[10]、木材评价^[11]、织物检验^[12]以及医学图像处理^[13]等研究领域。姚宇华等^[14]采用灰度共生矩阵特征参数,对心肌细胞细胞骨架形态进行定量分析,认为此方法能很好地描述模拟微重力条件下细胞骨架形态的改变。然而,植物与动物细胞微管骨架形态存在明显差异,因此,有必要根据植物微管骨架的自身特征,来建立一种适合植物细胞微管骨架形态定量分析的方法。基于此,本文利用灰度共生矩阵对植物细胞微管骨架图像进行纹理分析,并筛选合适的特征参数,旨在为植物微管骨架定量分析研究提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本文采用GFP-TUA6转基因拟南芥为实验材料,GFP-TUA6是Granger等^[15]利用基因工程手段,将绿色荧光蛋白GFP与拟南芥微管蛋白 α -tubulin融合表

达,来用于拟南芥微管骨架的活体观察。本实验的GFP-TUA6种子由中国农业大学袁明教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥培养 将表面灭菌的转基因拟南芥种子接种在1/2 MS培养基上,置于光照培养箱内生长4天,待观测用。

1.2.2 图像获取 用镊子将拟南芥幼苗从培养基上轻轻取下,放在载玻片上,封好片后置于激光共聚焦显微镜(Leica sp50)下观察,拍照(63倍油镜),GFP激发光波长为488 nm。获取的图片像素为1 024×1 024,保存为TIFF格式,以备进一步分析。

1.2.3 灰度共生矩阵分析 灰度共生矩阵是Haralick等^[16]在上世纪70年代初期提出的方法,是通过计算图像中一定距离和方向上的两点灰度之间的相关性,来反映图像的综合信息。其具体定义和构建方法可概述如下:

设图像在水平和垂直方向的像素对总和为 N_x 和 N_y ,最高灰度级为 N_g ,则像素的水平和垂直空间域及灰度量化集可记为: $L_x=\{1, 2, \dots, N_x\}$; $L_y=\{1, 2, \dots, N_y\}$; $G=\{1, 2, \dots, N_g\}$ 。

定义图像中的两个像素点为 (k, l) 和 (m, n) ,两点间距离为 d ,夹角为 θ ,点 (k, l) 和 (m, n) 所对应的灰度为 i, j ,统计两个像素点在图中的出现概率 $P(i, j, d, \theta)$,生成灰度共生矩阵记为: $C(d, \theta)=[P(i, j, d, \theta)]$ 。

由于 $C(d, \theta)$ 是一个对称矩阵,因此,计算时 θ 一般只需取 $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$,即对应的 k, l, m, n 取值为以下4种: $(m-k=0, n-l=d), (m-k=d, n-l=d), (m-k=d, n-l=0), (k-m=d, l-n=d)$ 。因此,这两个像素点在 $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 四个方向出现概率生成的共生矩阵应计算如下:

$$P(i, j, d, 0^\circ) = \text{Count}\{[(k, l), (m, n)] \mid L_x \times L_y\}_{m-k=0, n-l=d, G(k, l)=i, G(m, n)=j}$$

$$P(i, j, d, 45^\circ) = \text{Count}\{[(k, l), (m, n)] \mid L_x \times L_y\}_{m-k=d, n-l=d, G(k, l)=i, G(m, n)=j}$$

$$P(i, j, d, 90^\circ) = \text{Count}\{[(k, l), (m, n)] \mid L_x \times L_y\}_{m-k=d, n-l=0, G(k, l)=i, G(m, n)=j}$$

$$P(i, j, d, 135^\circ) = \text{Count}\{[(k, l), (m, n)] \mid L_x \times L_y\}_{k-m=d, l-n=d, G(k, l)=i, G(m, n)=j}$$

本文使用Matlab 7.0软件对正常环境下生长的拟南芥下胚轴中部细胞周质微管骨架荧光图像进行灰度共生矩阵分析。

1.2.4 纹理特征参数 从共生矩阵可求得以下8个反映图像信息的纹理特征参数, 具体计算公式如下:

$$(1) \text{角二阶距(angular second moment, ASM)} \quad ASM = \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} \{P(i, j)\}^2 \quad (1)$$

$$(2) \text{逆差距(inverse difference moment, IDM)} \quad IDM = \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} \frac{1}{1+(i-j)^2} P(i, j) \quad (2)$$

$$(3) \text{对比度(Contrast)} \quad Contrast = \sum_{n=0}^{G-1} n^2 \left\{ \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^G P(i, j) \right\}, |i-j|=n \quad (3)$$

$$(4) \text{熵(Entropy)} \quad Entropy = - \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} P(i, j) \times \log(P(i, j)) \quad (4)$$

$$(5) \text{方差(Variance)} \quad Variance = \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} (i-\mu)^2 P(i, j) \quad (5)$$

$$(6) \text{明暗度(Shade)} \quad Shade = \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} \{i+j-\mu_x-\mu_y\}^3 \times P(i, j) \quad (6)$$

$$(7) \text{显著性(Prominence)} \quad Prominence = \sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} \{i+j-\mu_x-\mu_y\}^4 \times P(i, j) \quad (7)$$

$$(8) \text{相关(Correlation)} \quad Correlation = \frac{\sum_{i=0}^{G-1} \sum_{j=0}^{G-1} \{i \times j\} \times P(i, j) - \{\mu_x \times \mu_y\}}{\sigma_x \times \sigma_y} \quad (8)$$

1.2.5 统计分析和数据作图 采用SPSS 19.0软件, 对灰度共生矩阵分析所得的8个参数用主成分分析法进行因子分析。使用GraphPad Prism 5.0软件进行t检验分析, 绘制柱状图和折线图。

2 结果

2.1 d值取值筛选

d值的不同会对纹理特征参数值造成影响, 因此为了选择合适的d值, 先暂时忽略方向差异的影响(即 θ 值取 $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 四个方向的平均值)。

从图1可以看出, 除方差外, d值的大小对其余参数均有影响。综合分析比较, 当 $d=4$ 时, 各参数值变化趋于稳定, 因此认为, 在本研究中d值取4有代表性。

2.2 θ 取值的影响

θ 的取值同样会对纹理分析的结果产生影响, 图2反应了d取4时, 不同方向8个纹理特征参数的变化情况。

从图中可以看出, 大多数纹理特征参数在4个方向上的变化趋势比较一致, 但从折线偏离程度来

看, 除方差外, 其余7个参数在 θ 取 45° 时与其余3个方向有明显差异, 说明这几个纹理特征参数在 45° 方向受到的影响比较大, 这与正常环境下快速生长的细胞周质微管骨架一般为横向排列的现象相吻合。因此, 在对这类排列方式的微管骨架图像进行比较分析时, 只需计算 45° 方向的值即可。如果微管排列方式混乱, 纹理特点在每个方向都有不同的表现, 在进行计算时就应该取4个方向的平均值然后再来比较分析。

2.3 特征参数归类筛选

虽然文中的8个特征参数均能反映纹理的特定信息, 但存在信息冗余和重复表述的问题, 因此, 本文采用主成分分析法对8个参数进行归类, 并从其中筛选出独立且代表性强的参数。

由表1可知, 部分特征参数(如角二阶距和逆差距、熵、逆差距和对比度、熵、相关、明暗度和显著性、相关和对比度等)间存在很强的相关性。KMO检验(KMO值为0.678)和Bartlett检验(相伴概率为0.000, 小于显著水平0.05)结果均显示本文中的特征参数变量适合做因子分析。

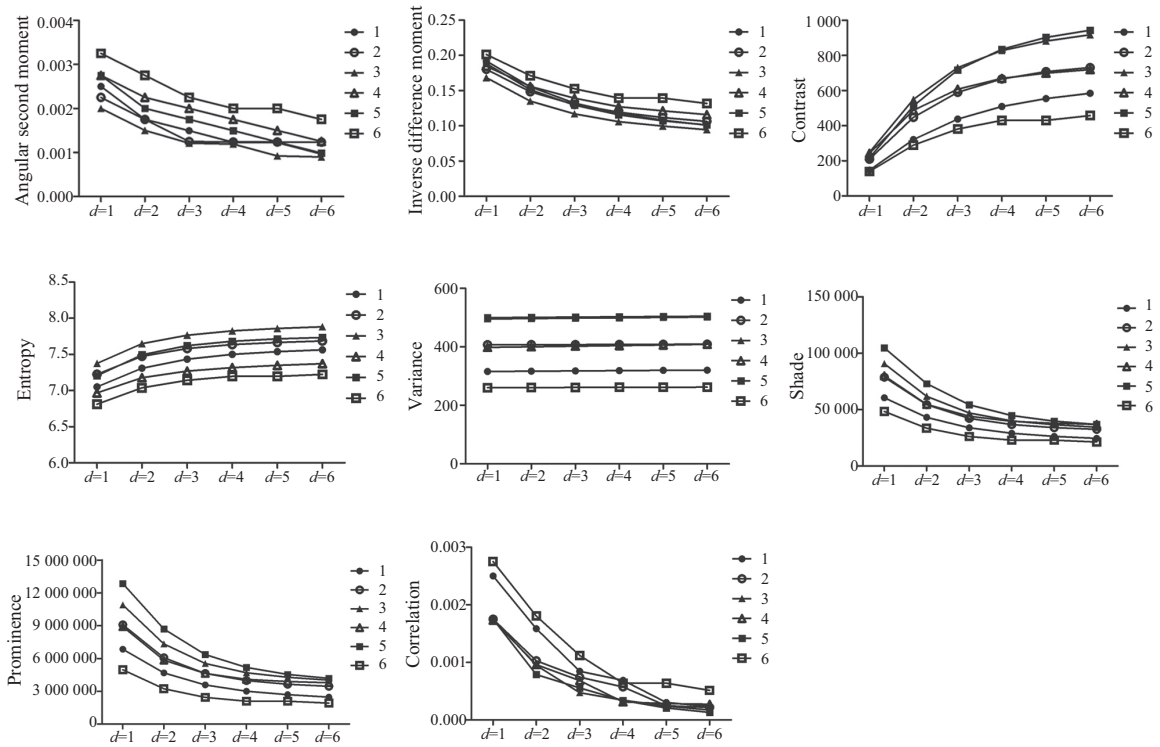


图1 纹理特征参数随d值大小的变化情况

Fig.1 The variation of texture parameters along with the d value

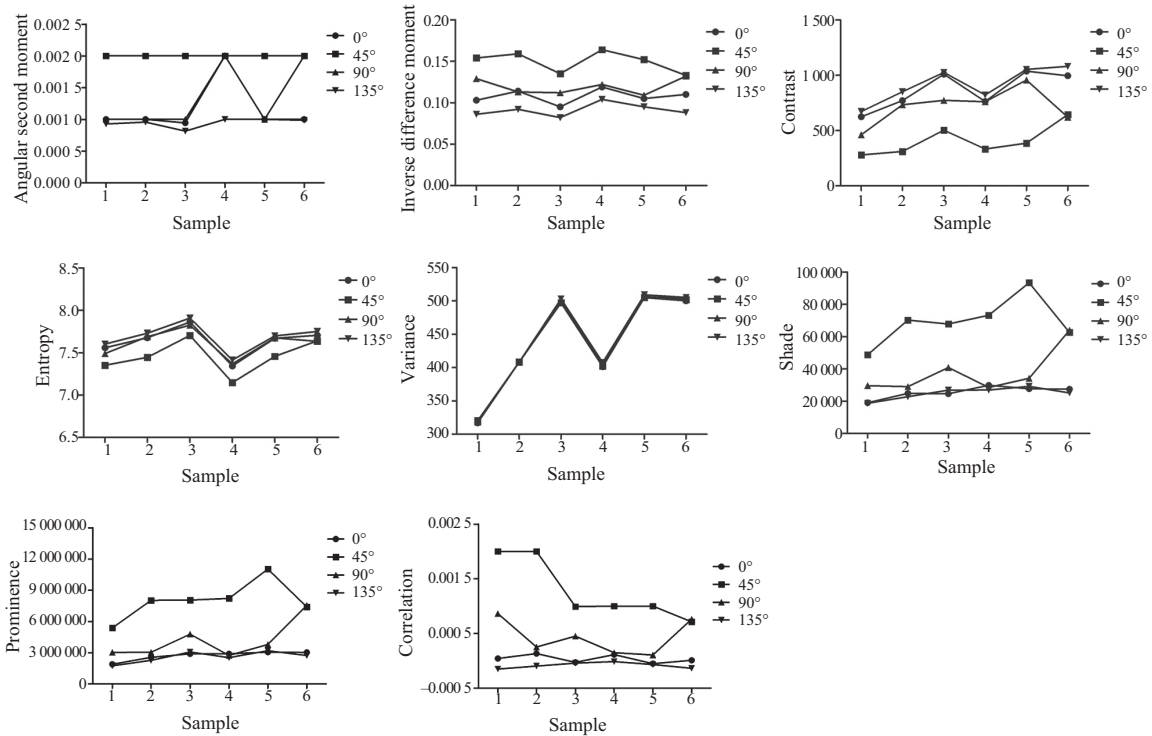


图2 纹理特征参数在4个方向上的变化情况

Fig.2 The status of texture parameters in the four directions

表1 纹理特征参数相关系数矩阵

Table 1 The correlation matrix of texture feature parameters

分组 Groups	角二阶距 Angular second moment	逆差距 Inverse difference moment	对比度 Contrast	熵 Entropy	方差 Variance	明暗度 Shade	显著性 Prominence	相关 Correlation
Angular second moment	1.00	0.90	-0.78	-0.89	-0.24	0.61	0.58	0.80
Inverse difference moment	0.90	1.00	-0.93	-0.93	-0.22	0.79	0.77	0.93
Contrast	-0.78	-0.93	1.00	0.89	0.40	-0.75	-0.73	-0.91
Entropy	-0.89	-0.93	0.89	1.00	0.48	-0.59	-0.56	-0.87
Variance	-0.24	-0.22	0.40	0.48	1.00	0.29	0.32	-0.30
Shade	0.61	0.79	-0.75	-0.59	0.29	1.00	0.99	0.73
Prominence	0.58	0.77	-0.73	-0.56	0.32	0.99	1.00	0.70
Correlation	0.80	0.93	-0.91	-0.87	-0.30	0.73	0.70	1.00

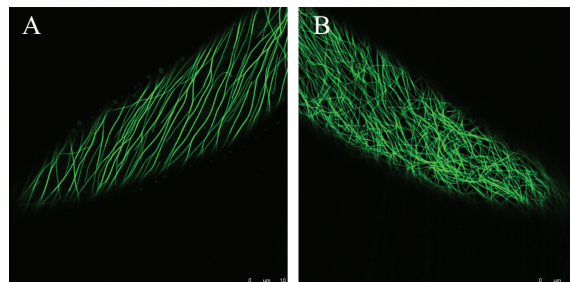
表2 主成分分析表

Table 2 The result of principal component analysis

	成分1 Component 1	成分2 Component 2
Angular second moment	0.882	-0.147
Inverse difference moment	0.987	-0.034
Contrast	-0.955	0.146
Entropy	-0.920	0.320
Correlation	0.942	-0.101
Shade	0.835	0.530
Prominence	0.816	0.556
Variance	-0.215	0.949
Eigenvalues	5.807	1.648
% of variance	72.583	20.605
Interpretation	Reflects the directivity, rules and complexity of texture and the image clarity	Reflects the change speed and periodically of texture

对8个特征参数进行主成分分析可得到2个主成分(表2)。其中,成分1贡献率为72.583%,包括角二阶距、逆差距、对比度、熵、明暗度、显著

性和相关,主要反映了纹理的方向性、复杂性和规则程度以及图像清晰度和纹理变化快慢等信息;成分2贡献率为20.605%,主要为方差所反映的纹



A: 正常对照组; B: 回转处理组。

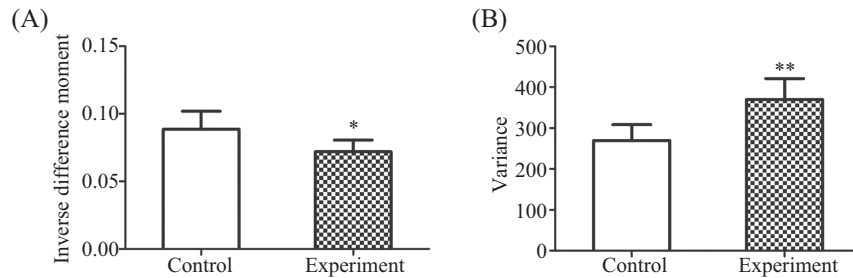
A: control group; B: clinostation group.

图3 两种不同排列状态的微管骨架图像

Fig.3 Two different alignment state images of plant microtubules skeleton

理变化快慢和周期性大小信息。分别选取2个主成分中载荷最高的变量, 即得到逆差距和方差两个纹理特征参数。因此, 如果只选择逆差距、方

差这两个参数对微管骨架进行分析, 不但可以较好地反映图像的信息, 而且可以大大减少计算量, 节约分析时间。



A: 逆差距比较分析; B: 方差比较分析。* $P < 0.5$, ** $P < 0.01$ 。

A: *t* analysis of inverse difference moment; B: *t* analysis of variance. * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$ 。

图4 不同排列状态的微管骨架图像的两个特征参数*t*检验分析

Fig.4 *t* analysis of two image parameters of plant microtubules between different alignment states

2.4 特征参数应用验证

为了进一步验证本研究采用的灰度共生矩阵方法和所选的参数的应用效果, 我们对两种不同排列状态的微管骨架图像进行了比较分析(图3)。统计结果显示(图4), 与正常对照组相比, 回转处理组微管骨架图像的逆差距和方差两个参数均存在显著差异, 这与图像所反映的视觉信息一致, 说明文中所筛选的两个参数在区分不同排列状态的微管图像时是有代表性的。

3 讨论

作为细胞骨架的重要组成部分, 微管的研究一直是细胞生物学领域的研究热点之一。微管存在于所有真核生物细胞中, 是由 $\alpha\beta$ 微管蛋白二聚体装配而成的长管状细胞器结构。在植物间期细胞中, 微管相互平行排列在细胞膜下, 形成周质微管阵列。周质微管的排列方向和细胞生长密切相关, 它通过控制细胞壁微纤丝的沉积方向来控制细胞的生长^[17]。当细胞快速伸长时, 周质微管的排列方向垂直于细胞伸长方向; 当细胞生长速率降低或停止时, 周质微管排列方向呈斜向或与细胞伸长方向平行。许多因素, 如植物激素^[18-19]、光照^[20]、重力^[21]都会对周质微管排列方向产生影响。例如生长素和赤霉素可以使斜向或纵向的微管排列转变为垂直排列, 而乙烯和脱落酸则使微管阵列由垂直排列转变为斜向或纵向排列^[22]。

图像纹理是像素灰度值在空间域的变化模式。作为表面灰度变化的衡量标准, 纹理可用于反映图像清晰度、明暗度以及规则程度等性质。基于灰度共生矩阵的纹理分析方法是图像量化描述的常用方法。但作为一种传统的统计学方法, 灰度共生矩阵分析的特征参数众多, 计算工作量很大。通常, 大部分研究者直接根据文献资料和经验选取其中几个有代表性的特征参数进行后续分析。然而, 对植物微管骨架进行纹理分析的研究并不多见, 加之植物细胞周质微管阵列有其独特的结构模式, 为了快速、准确对其进行定量分析, 需要仔细筛选出有代表性的参数。

本研究基于灰度共生矩阵算法并结合因子分析方法, 筛选出逆差距和方差2个参数, 较好地代表了图像的大部分信息。逆差距反映纹理的规则程度: 逆差距越小, 说明纹理杂乱无章、难于描述; 反之, 逆差距越大, 则说明纹理规律较强, 易于描述。方差反映纹理变化快慢、周期性大小: 方差值越大, 表明纹理周期越大; 反之则越小, 这与文中特征参数应用验证的信息相吻合, 很好地反映出图像的自身属性。然而, 由于灰度共生矩阵法自身的特点, 此方法的应用有其局限性, 比如如果图像不清晰, 背景模糊, 就会对基于此方法进行的纹理分析产生很大影响, 因此, 在对这种背景噪音大的图像做纹理分析前, 首先需要进行降噪处理, 降低干扰后再来分析。

综上所述, 本文采用的基于灰度共生矩阵的纹理分析方法, 对于定量分析和描述植物细胞间期周质微管排列状态具有良好的应用性, 所筛选的代表性参数使得该方法更加简便, 不但可用作周质微管形态量化评价的一个方法, 同时也为其它图像的纹理分析提供了参考和借鉴。

参考文献 (References)

- 1 Paradez A, Wright A, Ehrhardt DW. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9(6): 571-8.
- 2 Lloyd C. Plant cytokinesis: Circles within circles. *Curr Biol* 2011; 21(22): 926-7.
- 3 Yang Z. Cell polarity signaling in *Arabidopsis*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 551-75.
- 4 Lloyd C. Dynamic microtubules and the texture of plant cell walls. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; 287: 287-329.
- 5 Sheremet YA, Yemets AI, Blume YB. Inhibitors of tyrosine kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response. *Tsitol Genet* 2012; 46(1): 3-9.
- 6 Wang C, Zhang L, Chen W. Plant cortical microtubules are putative sensors under abiotic stresses. *Biochemistry (Mosc)* 2011; 76(3): 320-6.
- 7 Ikushima T, Shimmen T. Mechano-sensitive orientation of cortical microtubules during gravitropism in azuki bean epicotyls. *J Plant Res* 2005; 118(1): 19-26.
- 8 Materka A. Texture analysis methodologies for magnetic resonance imaging. *Dialogues Clin Neurosci* 2004; 6(2): 243-50.
- 9 Li N, Frei M, Altermann W. Textural and knowledge-based lithological classification of remote sensing data in Southwestern Prieska sub-basin, Transvaal Supergroup, South Africa. *J Afr Earth Sci* 2011; 60(4): 237-46.
- 10 Wood EM, Pidgeon AM, Radeloff VC, Keuler NS. Image texture as a remotely sensed measure of vegetation structure. *Remote Sens Environ*, 2012.
- 11 王 晗, 白雪冰, 王 辉. 基于空间灰度共生矩阵木材纹理分类识别的研究. *森林工程*(Wang Han, Bai Xuebing, Wang Hui. Wood texture classification and recognition based on GLCM. *Forest Engineering*) 2007; 23(1): 32-6.
- 12 Ravanidi SA, Pan N. The influence of gray-level co-occurrence matrix variables on the textural features of wrinkled fabric surfaces. *J Text I* 2011; 102(4): 315-21.
- 13 Gandhi DK, Sagale KS, Gupta V. Detection of brain tumor and extraction of texture features using magnetic resonance images. *IJEIR* 2012; 1(5): 412-4.
- 14 姚宇华, 严 洪, 熊江辉. 基于灰度共生矩阵特征的对模拟微重力条件下心肌细胞骨架的图像分析. *航天医学与医学工程*(Yao Yuhua, Yan Hong, Xiong Jianghui. Image analysis of cardiac muscle cytoskeleton under simulated microgravity based on gray-level co-occurrence matrix (GLCM). *Space Medicine & Medical Engineering*) 2003; 6: 422-5.
- 15 Granger CL, Cyr RJ. Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 2001; 216(3/4): 201-14.
- 16 Haralick RM. Textural features for image classification. *IEEE transactions on systems, man and cybernetics* 1973; 3(6): 610-21.
- 17 Chan J. Microtubule and cellulose microfibril orientation during plant cell and organ growth. *J Microsc* 2012; 247(1): 23-32.
- 18 Polko JK, van Zanten M, van Rooij JA, Marée AF, Voesenek LA, Peeters AJ, *et al.* Ethylene-induced differential petiole growth in *Arabidopsis thaliana* involves local microtubule reorientation and cell expansion. *New Phytol* 2012; 193(2): 339-48.
- 19 Sauret-Gueto S, Calder G, Harberd NP. Transient gibberellin application promotes *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cell elongation without maintaining transverse orientation of microtubules on the outer tangential wall of epidermal cells. *Plant J* 2012; 69(4): 628-39.
- 20 Zhang L, Li L, Wu J, Peng J, Zhang L, Wang X. Cell expansion and microtubule behavior in ray floret petals of *Gerbera hybrida*: Responses to light and gibberellic acid. *Photochem Photobiol Sci* 2012; 11(2): 279-88.
- 21 Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Hoson T. Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of *Arabidopsis* tubulin mutants. *Plant Physiol* 2010; 152(2): 918-26.
- 22 武维华. *植物生理学*. 北京: 科学出版社(Wu Weihua. *Plant Physiology*. Beijing: Science Press), 2003: 23.