



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

医学图像处理 课程论文

题目: nnU-Net 在荧光染色细胞分割中的
应用

姓名:

专业:

学号:

中国 · 武汉

二〇二三年五月

目录

摘要	1
1. 前言	1
2. 实验方法	2
2.1 数据集介绍	2
2.2 nnUNet 介绍	3
2.3.1 数据转换	3
2.3.2 预处理	3
2.3.3 模型训练	3
2.3.4 运行预测	4
2.3.5 预测结果评价	4
3. 实验结果	4
3.1 模型训练	4
3.2 测试集结果	5
4. 总结	6
参考文献	7

摘要: 许多生物学分析需要从荧光显微镜图像中分割出细胞。传统的细胞分割方法需要手动标记,不仅耗时费力,也不能适应大量的数据集。近年来随着深度学习的发展,使得自动化细胞分割取得了巨大进展。语义分割将原始生物医学图像数据转化为有意义的、有空间结构的信息,因此在科学发现方面起着至关重要的作用。nnU-Net 是一种基于深度学习的语义分割方法,可以实现自动配置,包括预处理、网络架构、训练和后处理。本文使用了 10 张带有人工标注信息的荧光染色细胞图像作为训练集,基于 nnU-Net 进行模型训练,最后在 5 张荧光染色细胞图像上进行测试。测试集结果显示平均 Dice 系数值为 82.3%, 平均 IOU 系数值为 70.1%。结果表明即使在只有少量训练集的情况下,nnU-Net 也能够实现相对准确的细胞分割效果。

关键词: 细胞分割;深度学习;nnU-Net

Abstract: Many biological analyses require the segmentation of cells from fluorescent microscope images. Traditional cell segmentation methods require manual labeling, which is not only time-consuming and labor-intensive, but also cannot adapt to large datasets. In recent years, with the development of deep learning, great progress has been made in automated cell segmentation. Semantic segmentation transforms raw biomedical image data into meaningful, spatially structured information, playing a crucial role in scientific discovery. nnU-Net is a deep learning-based semantic segmentation method that can achieve automatic configuration, including preprocessing, network architecture, training and post-processing. In this paper, 10 fluorescently stained cell images with artificial annotation information were used as the training set, and the model was trained based on nnU-Net, and finally tested on 5 fluorescently stained cell images. The test set results showed an average Dice coefficient value of 82.3% and an average IOU coefficient value of 70.1%. The results indicate that even with only a small amount of training data, nnU-Net can achieve relatively accurate cell segmentation results.

Key words: cell segmentation; deep learning; nnU-Net

1 前言

许多生物学分析中经常需要测量多个细胞属性,如形状、数目、位置、RNA 表达和蛋白质表达等。为了将这些属性分配给单个细胞,首先必须对图像中的细胞进行分割。研究人员通常会基于细胞质或细胞膜的标记物进行人工分割。然而,随着生物学图像数据的增加,人力已经无法满足大规模数据集分析的需求。特别是在空间转录组学领域^[1],近年来随着高通量测序技术和原位测序技术的发展,研究人员往往需要处理数百张上万个细胞的图像。因此迫切需要自动化细胞分割工具来适应大型数据集的分析。

目前对于细胞分割相关工具的研究已经取得了许多进展。美国霍华德休斯医学研究所的 Albert Cardona 团队开发的 ImageJ^[2]和英国牛津仪器公司开发的 Imaris^[3]是使用最为广泛的两个生物学图像处理工具。它们功能特别的全面,能够满足大部分生命科学领域的图像分析。Ilastik^[4]是德国海德堡大学的 Anna Kreshuk 团队开发的半自动图像分割工具,主要基于随机森林算法,使用的时候需要手动用不同的颜色标记背景和细胞。CellProfiler^[5]是麻省理工的 David M Sabatini 团队开发的综合的细胞分析工具,它综合了阈值,分水岭分割等方法实现对细胞的分割。近年来基于深度学习的方法也在细胞分割中得到了应用。StarDist^[6]是德国普朗克研究所的 Uwe Schmidt 团队开发的细胞分割工具,它主要使用了 CNN 来训练模型,并且可以作为 imagej 的一个插件来使用。Cellpose^[7]是美国霍华德休斯医学研究所的 Marius Pachitariu 团队开发的细胞分割工具,它主要使用了 U-Net 结构,并且它提供了大量荧光染色细胞分割的训练集。

本文使用的 nnU-Net 是德国癌症研究中心的 Klaus H. Maier-Hein 团队开发的生物医学图像分割工具^[8]。nnU-Net 是一种基于深度学习的分割方法,可以自动配置自己,包括生物医学领域任何新任务的预处理、网络架构、训练和后处理。nnU-Net 是一种简单易用的分割工具,无需任何用户干预,适用于广泛的生物医学成像数据集。已经有研究将 nnU-Net 应用于 COVID-19 CT 数据集的图像分割,并且取得了良好的分割效果^[9]。

2 实验方法

2.1 数据集介绍

本文使用的数据集下载自 <https://www.cellpose.org/dataset> 网站。数据集主要为荧光染色的细胞图像，每张图片都带有一张相同大小的人工标注的细胞分割掩膜图像作为 **ground truth**。本文从这些数据集中选择了 10 张图像作为训练集，另外选择了 5 张图像作为测试集。如图 1 所示，展示了 10 张训练数据集的可视化结果。其中第 1、4 行为原始的荧光染色图像，第 2、5 行为人工标注的细胞分割掩膜图像，第 3、6 行为将掩膜图像的细胞轮廓绘制到原始的荧光染色图像上的效果图。图 2 展示了 5 张测试数据集的可视化结果。

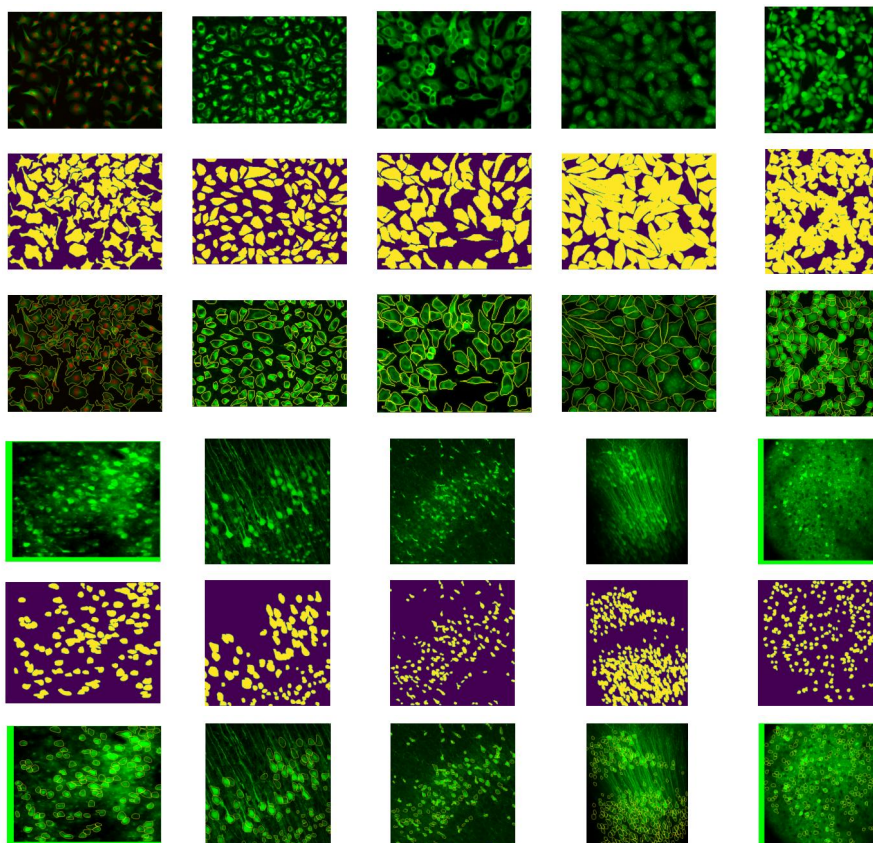


图 1 训练数据集的可视化

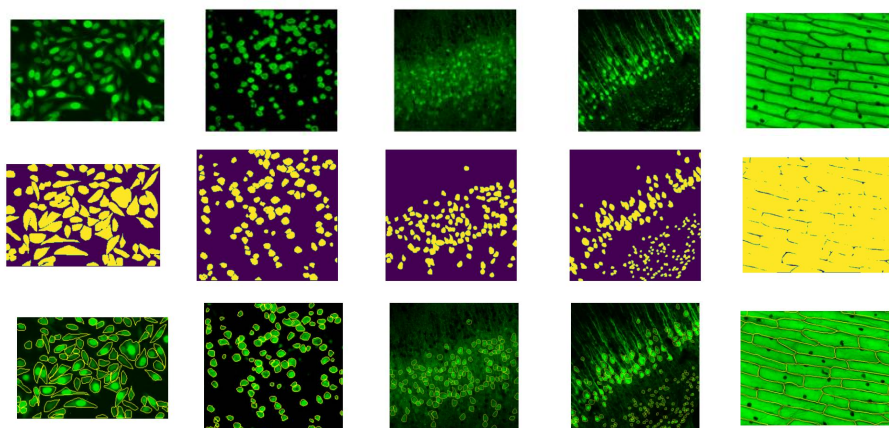


图 2 测试数据集的可视化

2.2 nnUNet 介绍

nnU-Net 是一种基于深度学习的分割方法，可以自动配置自己，包括生物医学领域任何新任务的预处理、网络架构、训练和后处理。nnU-Net 的自动配置基于将领域知识分为三个参数组：固定参数、基于规则的参数和经验参数。首先，收集所有不需要在数据集之间进行调整的设计决策，并优化它们的联合配置，以实现开发数据集的稳健泛化。其次，对于尽可能多的剩余决策，制定了 dataset fingerprint 与 pipeline fingerprint 之间的明确依赖关系，其中 dataset fingerprint 是标准化的数据集表示，包括关键属性，如图像大小、像素间距信息或类别比例，而 pipeline fingerprint 则定义为在方法设计期间做出的所有选择的总和。这些依赖关系以相互依赖的启发式规则的形式建模，以实现几乎即时的执行。

2.3 工作流程

如图 3 所示，展示了 nnU-Net 的工作流程和相应的代码，nnUNet 大部分参数都能自动配置，因此只需要几行简单的命令就能完成整个工作流程。

2.3.1 数据转换

将数据导入 nnU-Net 的唯一方法是以特定格式存储数据。nnU-Net 数据集由三个部分组成：原始图像、相应的分割图和指定一些元数据的 dataset.json 文件。每个训练案例都与一个标识符相关联，nnU-Net 使用此标识符将图像与正确的分割连接起来。在 nnU-Net 中图像文件必须遵循以下命名约定：`{CASE_IDENTIFIER}_{XXXX}.{FILE_ENDING}`。其中 CASE_IDENTIFIER 为样本名称，XXXX 是四位模态/通道标识符，FILE_ENDING 是图像格式使用的文件扩展名。分割文件必须与相应的图像具有相同的几何形状。分割是整数映射，每个值表示一个语义类。背景必须为 0，语义类的整数值必须是连续的（0、1、2、3、...）。分割文件命名为`{CASE_IDENTIFIER}.{FILE_ENDING}`。数据集必须位于 nnUNet_raw 文件夹中，并且需要创建以下几个文件：1. imagesTr 包含属于训练集的图像，nnU-Net 将使用这些数据执行管道配置、交叉验证的训练以及找到后处理和最佳集合。2. imagesTs 包含属于测试集的图像。3. labelsTr 包含带有训练集分割标签的 ground truth 图像。4. dataset.json 包含数据集的 metadata。在 dataset.json 文件中，对于荧光染色的图像 channel_names 只有一个通道。对于标签信息将 background 指定为 0，将 cell 指定为 1。训练集样本设置为 10 个，文件结尾设置为.png 格式。

2.3.2 预处理

之后进行预处理命令。给定一个新的数据集，nnU-Net 将提取数据集特定的属性，如图像大小、体素间距、强度信息等作为 dataset fingerprint，这些信息用于设计三个 U-Net 配置。使用 nnUNetv2_plan_and_preprocess 命令来一步运行 fingerprint extraction、experiment planning、preprocessing 这三个步骤。其中 -d 参数用于指定数据集 ID，--verify_dataset_integrity 参数用于检查程序中一些常见的错误。命令完成后会在 nnUNet_preprocessed 文件夹中创建一个名为数据集的新的子文件夹，子文件夹中会生成一个 dataset_fingerprint.json 文件以及一个 nnUNetPlans.json 文件，同时还将有包含预处理数据的子文件夹，以供 nnU-Net 配置使用。

2.3.3 模型训练

nnU-Net 可以选择 2D、3D_fullres、3D_lowres、3D_cascade_fullres 这四种训练模式。因为本文使用的荧光染色图像数据是 2D 的，因此直接选择了 2d 模式。nnU-Net 使用交叉验证训练所有配置，这是为了让 nnU-Net 能够估计每种配置的性能，并告诉哪种配置适用于自己数据的分割问题，并且获得良好模型集合。可以使用 nnUNetv2_train 命令来完成模型训练步骤。训练完成后会生成以下文件：1. debug.json：包含用于训练该模型的蓝图和推断参数以及一堆其他内容的摘要。2. checkpoint_best.pth：在训练过程中识别出的最佳模型的检查点文件。3. checkpoint_final.pth：最终模型的检查点文件，用于验证和推理。4. network_architecture.pdf：带有网络体系结构图的 pdf 文档，需要安装 hiddenlayer。5. progress.png：显示训

练过程中的 loss、pseudo Dice、learning rate 和 epoch times。6. validation_raw: 这个文件夹中是在训练完成后预测的验证案例，其中 summary.json 文件包含了验证指标。

2.3.4 运行预测

之后对测试集进行预测，运行 nnUNetv2_predict 命令可以完成此步骤。其中 -i 参数用来指定存放验证集的文件夹，-o 参数用来指定输出结果的文件夹，--save_probabilities 参数用来保存预测概率以及预测分割掩码。默认情况下，nnUNet 将使用来自交叉验证的所有 5 折作为一个整体进行推理，指定 -f all 可以使用单个模型进行预测。

2.3.5 预测结果评价

最后对预测的结果进行评价，运行 nnUNetv2_evaluate_folder 命令可以完成此步骤。其中 labelsTs 为存放测试集分割 ground truth 的文件夹，inferTs 为运行预测后输出的文件夹，-djfile 和 -pfile 为运行预测后输出的文件。运行该命令后会在 inferTs 文件夹中生成一个 summary.json 文件，该文件中包含了对预测结果的一些评价指标。

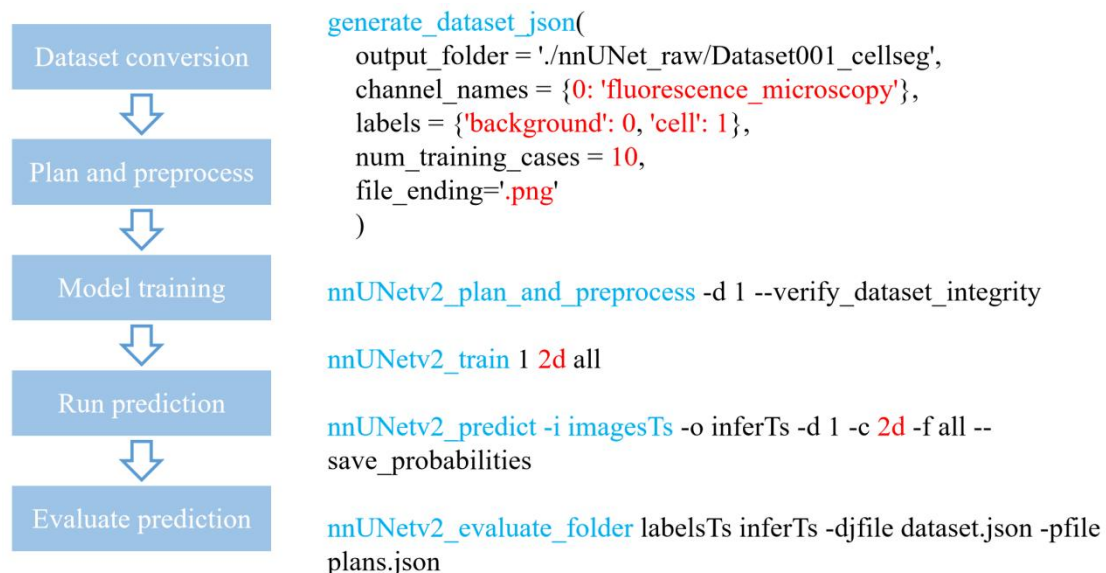


图3 nnUNet 工作流程

3 实验结果

3.1 模型训练

如图4所示，展示了 nnUNet 的模型训练过程。第一张图展示的是每一轮 epoch 运行的时间，nnUNet 默认会运行 1000 个 epoch。第二张图展示的是学习率的衰减曲线。第三张图展示的是模型训练过程中的 loss 值和 dice 系数。其中蓝色的线条为训练集的 loss 值，红色的线条为验证集的 loss 值。绿色的虚线为假定的 dice 值，绿色的实线为假定 dice 值的移动平均值。

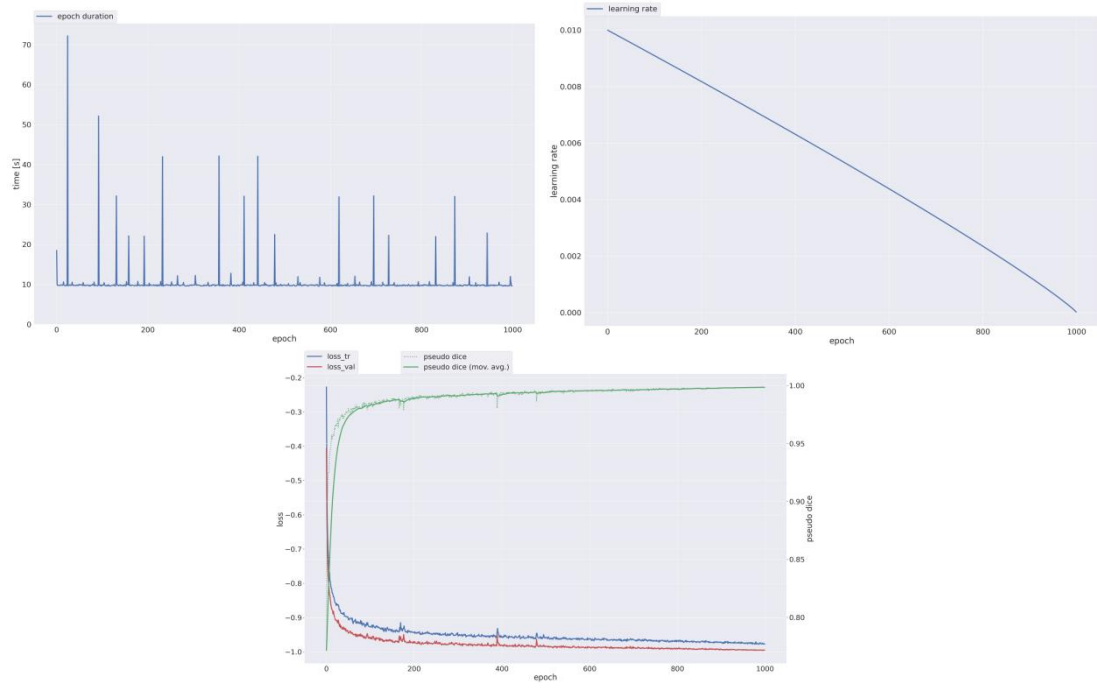


图 4 nnUNet 模型训练过程

3.2 测试集结果

如图 5 所示，展示了测试集结果的可视化效果。其中第 1、3 行表示 **ground truth** 数据，第 2、4 行表示 nnUNet 模型预测的结果。分别展示了将掩膜图像的细胞轮廓绘制到原始的荧光染色图像上的效果图和掩膜图像的可视化效果图。从视觉效果上看，nnUNet 整体上对于细胞分割的结果还不错，大部分细胞都能够被分割出来。

表 1 使用了 dice 系数和 IOU 系数对测试集的预测进行定量的评价。dice 和 IOU 是分割网络中最常用的评价指标，用来衡量分割结果与 **ground truth** 的 mask 之间的相似性。计算公式如下：

$$dice(A, B) = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}$$

$$IOU(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

通过对每个测试集样本计算 dice 和 IOU，然后再统计所有测试集样本的 dice 和 IOU 的平均值。结果表明 nnUNet 模型对于荧光染色图像的细胞分割实现了平均 dice 相似系数为 82.3%、平均 IOU 相似系数为 70.1%的分割效果。

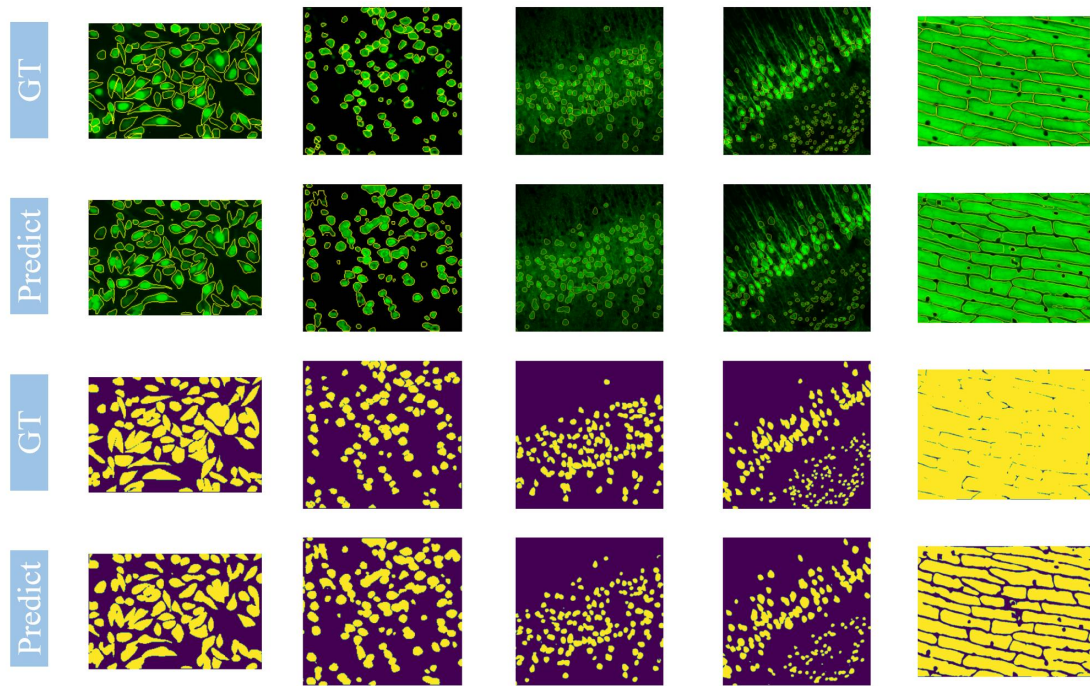


图 5 测试集结果可视化

表 1 测试集结果评价

	imagesTs_1	imagesTs_2	imagesTs_3	imagesTs_4	imagesTs_5	Mean
Dice	0.845	0.822	0.777	0.788	0.882	0.823
IOU	0.732	0.698	0.635	0.650	0.789	0.701

4 总结

本文测试了 nnU-Net 在荧光染色细胞分割中的应用，结果表明即使在只有少量训练集的情况下，nnU-Net 也能够实现相对准确的细胞分割效果。并且 nnU-Net 基于深度学习实现了完全自动化的细胞分割，解决了传统方法需要手动配置的复杂过程。未来随着生物学图像数据的不断增加，以及高通量测序技术和原位测序技术的发展，基于深度学习的细胞分割方法将会得到更广泛的应用。期望越来越多的图像分割工具的出现，能够解决生物学领域日益增长的图像分割需求。

参考文献

- [1] Method of the Year 2020: spatially resolved transcriptomics. *Nat Methods* 18, 1 (2021).
- [2] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682 (2012).
- [3] <https://imaris.oxinst.com/>
- [4] Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T. et al. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* 16, 1226–1232 (2019).
- [5] Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100 (2006).
- [6] Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018, 2018, Volume 11071
- [7] Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. et al. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 18, 100–106 (2021).
- [8] Isensee, F., Jaeger, P.F., Kohl, S.A.A. et al. nnU-Net: a self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation. *Nat Methods* 18, 203–211 (2021).
- [9] Ma, J., Wang, Y., An, X., et al. (2021). Toward data-efficient learning: A benchmark for COVID-19 CT lung and infection segmentation. *Medical Physics*, 48(3), 1197–1210.