

使用 u-net 网络进行细胞核识别分割

018072910062 鲍洄含

摘要：使用单分子荧光显微成像测量方法来量化精确解析基因调控的动力学机制中的重要步骤是确定处理的信号范围即细胞核内的荧光信号与细胞核外的荧光信号，传统图像处理方法得到的效果不佳，基本需要较大的人工调整，需要耗费较多的时间精力。在此基础上，尝试使用人工神经网络深度学习的方法来自动化细胞核识别分割这一重要过程，并且希望能得到一个较好的分割效果，减少或者避免后续的人工调整。在本课题中，尝试使用 u-net 网络结构进行模型训练以及预测，并且对不同情况下得到的输出标签图进行分析，基本上分割效果都在后续信号分析要求的可接受范围内。

Abstract: In this study, single-molecule fluorescence microscopy was used to quantitatively and accurately analyze the kinetic mechanism of gene regulation. One of the important steps is to determine the signal range of processing namely to distinguish the fluorescence signal inside the nucleus and the fluorescence signal outside the nucleus. The traditional image processing method is not good enough, which still needs a large manual adjustment. On this basis, we hope to use the deep learning method of artificial neural network to automate this important process of nuclear recognition and segmentation, and to get a better segmentation effect to reduce or even avoid subsequent manual adjustment. In this project, u-net network structure is used for model training and prediction, and then analyze the output label graph. Basically, the segmentation effect is within the acceptable range required by subsequent signal analysis.

关键词：单分子荧光显微成像 图像分割 人工神经网络 深度学习 u-net 网络模型

前言

基因是细胞内遗传信息的基本功能单元。细胞根据基因上的遗传信息合成不同生物活性分子的过程称为基因表达。生物体内不同基因的表达在时间和空间上都受到体系内外各种因素的严格调控[1]，构成所谓的基因调控网络（gene regulatory network）[2]。这种相互调控的关系是生物体发育、生长、衰老和疾病等众多现象的基础和驱动力[3-6]。因此，深入理解基因调控网络的运行原理一直是复杂系统物理学、生命科学及医学研究共同关注的核心课题，具有深远的科学意义和广阔的应用前景。

与传统的生物学方法相比，近年来兴起的多种单细胞、单分子荧光显微成像测量方法为精确解析基因调控的动力学机制提供了新的思路和技术手段。上海交通大学物理与天文学院徐恒老师实验室主要从事果蝇胚胎相关的基因调控网络动力学研究工作，在近年来发展了一套基于免疫荧光、单分子荧光原位杂交（sm-FISH）和高分辨荧光共聚焦显微技术的光学测量、图像分析和理论研究方法，能够在单细胞、单分子尺度实现对胚胎发育早期单个基因调控过程的定量精确动力学表征[7,8]。由于做图像处理以及后续理论建模更关注的是细胞核内的荧光信号，因此该工作中的一个重要步骤是识别胚胎内细胞核的形状和大小，以帮助后续信号提取分析。

理论模型分析

该课题目的是希望使用人工神经网络方法来自动化细胞核图像分割[9-16]识别问题。由于原始图像为生物细胞核图像，查阅文献后在卷积神经网络[17-19]来处理图像信息中，u-net[20]是一种有效的医学图像分割网络模型。

其网络拓扑结构为一组对称的收缩扩张路径，如图 1 所示。它包括左边的收缩路径以及右边的扩展路径。收缩路径中遵循卷积神经网络的基本架构，即卷积层 conv+非线性激活函数 Relu+下采样池化层 max-pooling。经过 5 层，特征图数目由 32，64，128，

256, 最后到 512。扩展路径中使用反卷积 conv2DTranspose 来进行上采样, 之后进行卷积操作, 特征图数目由 512, 256, 128, 64 到 32, 最后一次卷积过滤器为 1, 激活函数选取 sigmoid 来进行最后的像素分类输出, 该拓扑结构可以大致完成点到点, 像素到像素的图像分割。并且由于该结构的高度对称性, 它很好的充分利用了输入图像数据, 有利于处理生物图像。值得注意的是, 在网络结构中加入了镜像 concatenate 来补足丢失的边界像素信息, 并且利用网络结构的对称性正好可以一一对称镜像。

选择的激励函数基本遵循普通卷积神经网络架构, 在卷积层后选择 Relu 作为激活函数, 对于最后一层需要将特征分量映射到类数, 选择了 sigmoid 函数作为激活函数。

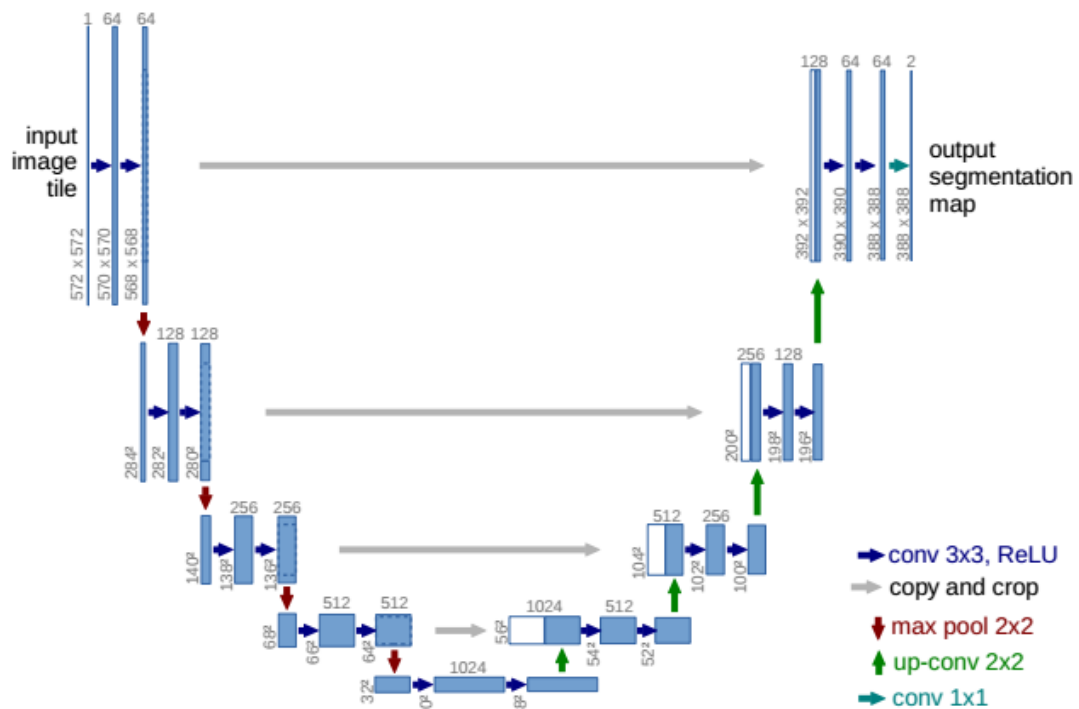


图 1 u-net 网络模型结构

程序设计

根据上述模型设计, 在该课题中, 胚胎成像图像像素较大, 因此进行切割来帮助训练同时增加样本量, 因此训练集输入图片为 256*256, 即: `img_rows = 256, img_cols = 256`

具体网络中卷积核数目以及尺寸, 池化层的尺寸以步长等参数, 由于对称性, 保证了收缩与扩张路径中卷积层参数一一对应, 尺寸都为 3*3; 池化层下采样与反卷积上采样相对应, 尺寸为 2*2. 最后一层输出卷积核数目为 1, 尺寸为 1*1, 来做到单像素分类, 并且激活函数为 sigmoid. 最后一层卷积层的输出即为最后的像素分类后的输出 256*256 图像: `model = Model(input = inputs, output = c10)`

由于该问题实际上是二分类问题, 是细胞核信号或不是, 因此损失函数选取 'binary_crossentropy'. 学习率 learning rate 的取值经过训练尝试后发现取为 1e-5 时收敛速度较快. 基本可以在迭代 10 次就收敛到 train-accuracy=99% ; val-accuracy=98%.

u-net 网络模型代码如下:

```
def get_unet(self):
    inputs = Input ((self.Img_rows, self.img_cols,1))
    # 网络结构定义
    c1 = Conv2D (32, (3, 3), activation='relu', padding='same') (inputs)
    c1 = Conv2D (32, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c1)
```

```

p1 = MaxPooling2D ((2, 2)) (c1)
p1 = BatchNormalization() (p1)#正则化

c2 = Conv2D (64, (3, 3), activation='relu', padding='same') (p1)
c2 = Conv2D (64, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c2)
p2 = MaxPooling2D ((2, 2)) (c2)
p2 = BatchNormalization () (p2)

c3 = Conv2D (128, (3, 3), activation='relu', padding='same') (p2)
c3 = Conv2D (128, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c3)
p3 = MaxPooling2D ((2, 2)) (c3)
p3 = BatchNormalization () (p3)

c4 = Conv2D (256, (3, 3), activation='relu', padding='same') (p3)
c4 = Conv2D (256, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c4)
p4 = MaxPooling2D (pool_size= (2, 2)) (c4)
p4 = BatchNormalization () (p4)

c5 = Conv2D (512, (3, 3), activation='relu', padding='same') (p4)
c5 = Conv2D (512, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c5)
c5 = BatchNormalization () (c5)

u6 = Conv2DTranspose (256, (2, 2), strides= (2, 2), padding='same') (c5)
u6 = concatenate ([u6, c4])
c6 = Conv2D (256, (3, 3), activation='relu', padding='same') (u6)
c6 = Conv2D (256, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c6)
c6 = BatchNormalization () (c6)

u7 = Conv2DTranspose (128, (2, 2), strides= (2, 2), padding='same') (c6)
u7 = concatenate ([u7, c3])
c7 = Conv2D (128, (3, 3), activation='relu', padding='same') (u7)
c7 = Conv2D (128, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c7)
c7 = BatchNormalization () (c7)

u8 = Conv2DTranspose (64, (2, 2), strides= (2, 2), padding='same') (c7)
u8 = concatenate ([u8, c2])
c8 = Conv2D (64, (3, 3), activation='relu', padding='same') (u8)
c8 = Conv2D (64, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c8)
c8 = BatchNormalization () (c8)

u9 = Conv2DTranspose (32, (2, 2), strides= (2, 2), padding='same') (c8)
u9 = concatenate ([u9, c1])
c9 = Conv2D (32, (3, 3), activation='relu', padding='same') (u9)
c9 = Conv2D (32, (3, 3), activation='relu', padding='same') (c9)

```

```

c9 = BatchNormalization () (c9)

c10 = Conv2D (1, (1, 1), activation='sigmoid') (c9)

model = Model (input = inputs, output = c10)
model.compile (optimizer = Adam (lr = 1e-5), loss = 'binary_crossentropy',
metrics = ['accuracy'])
return model

```

实验分析与讨论

该实验中数据集为 50 个胚胎，每个胚胎有 23 层 z 平面共 23 张二维图像。切割为 256*256 的小图后大致有 50*23*5000=5750000 张小图。调整初始参数如上后，由于 Gpu 性能限制，先使用 4 个胚胎的数据量进行初始训练，迭代 Epoch=10 时，已收敛到较好水平。使用该训练好的模型预测新的胚胎图像来分割细胞核，发现在细胞核相邻较近时其相邻边界像素难以正确分开。因此在处理训练集时将 mask 标签集内的图像使用 matlab 进行预处理将其中的细胞核形状向内缩小 10 像素 (disk=10)。之后又将训练数据集分几批进行多次训练，每一次大概有 23000 张图片，最后得到的准确率已经高达 99% 左右。

Epoch 10/10

39744/39744 [=====] - 8443s 212ms/step - loss: 0.0132 - acc: 0.9944 - val_loss: 0.0709 - val_acc: 0.9779

在使用该训练模型处理本实验室需要处理的很多荧光图像时，首先由于大图像素约为 6000*3000，必须先切割成小图再以 256*256 的小图的形式进行预测图像分割后再拼合回大图，因此中间必然会产生拼痕（如图 2a,b 所示），因此采取增加一组平移 128 后再进行切割加预测拼合，最后每一张原图得到两张输出图像，再经过叠合以解决拼痕问题。

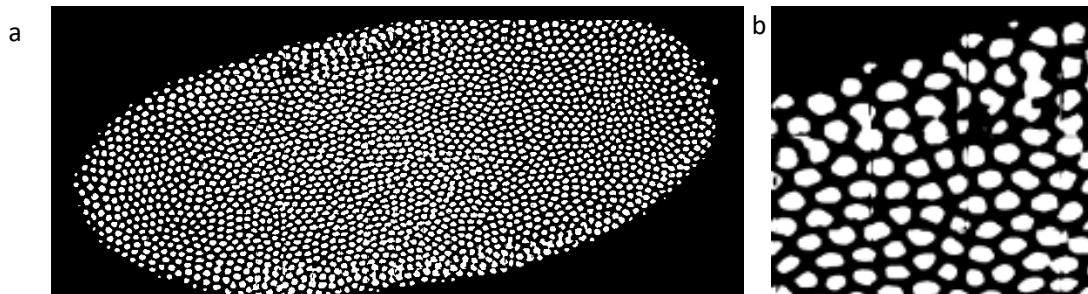


图 1 未进行后处理的深度学习模型预测结果

(a) 输出标签分类图 (b) 输出大图中的一块小图放大显示

除了在 matlab 中叠加以解决拼痕问题外，还会以已知的一些常识（如细胞核应该具有一定的大小并且是一个凸函数不应有凹陷）做一定的后处理来使细胞核分割更为合理。由于细胞核信号起码有几千像素，因此过小的像素点可以认为是噪声，使用 bwareaopen 将其略去。之后使用开运算 imopen 以及闭运算 imclose 以及最后做一个凸操作以保证与实际细胞核形状必然为凸函数相吻合，在调试参数基础上确定相对较好的一组后处理参数。并且对于一些已有人工分割标签的胚胎，进行叠加显示，观察使用 u-net 深度学习方法（未进行手工切割）的处理效果。

不同焦平面上的分割结果会不同，取其中一个胚胎的中心焦平面分割结果为例(图 3a,b)。其中蓝色像素代表了原图，红色表示已经过人工分割的标签，绿色表示此次使用 u-net 网络深度学习得到的分割预测结果，为了方便显示，两种标签结果都分别用 matlab 取轮廓后进行叠加显示。

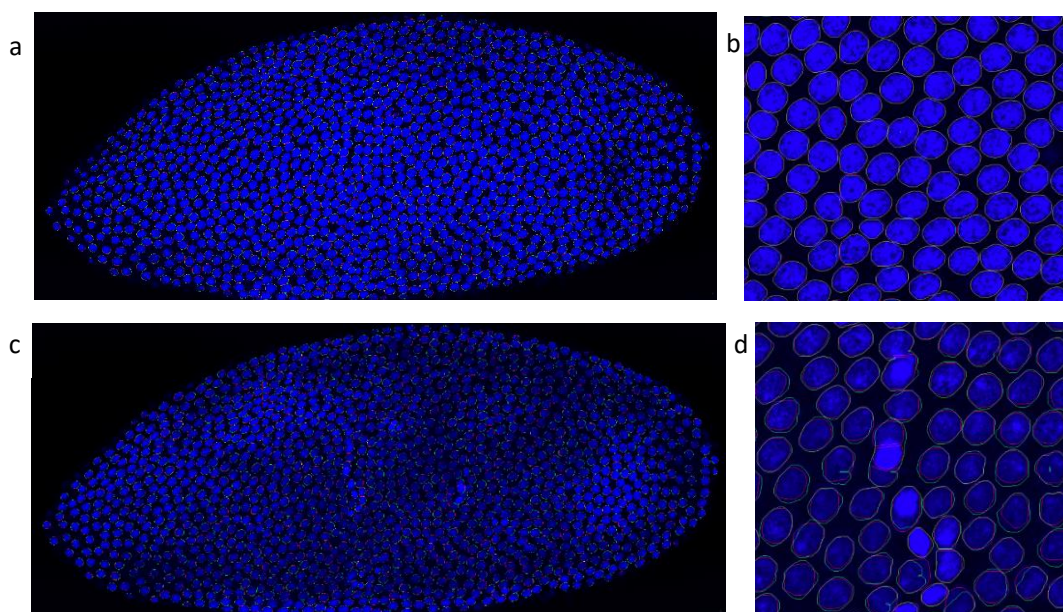


图 3 后处理后的标签图与人工调整后标签图以及原图对比显示结果

(a, b) 14 周期胚胎焦平面层图像识别结果 (c, d) 14 周期胚胎偏离焦平面层图像识别结果

由上图 3b,d 的比较可以看出, 当识别焦平面图像时, 深度学习方法的自动化识别结果基本没有出现相邻细胞核难以识别分割的情况, 基本完全正确; 而当识别偏离焦平面图像信号不如时, 深度学习分割会出现虽然基本位置正确但大小形状识别错误以及多个核较近时未分割开的情况但出现这种情况的细胞核数目很少。但因为后续信号处理分析会先将多个焦平面结合为三维进行分析, 因此更重要的是中心焦平面图像的细胞核识别分割情况, 偏离焦平面处的识别有少量问题对于后续课题要求无太大影响。

另一方面由于胚胎可能处于不同时期, 不同时期中细胞核的大小与间距都有较大的区别, 因此需要验证该训练模型对于不同周期的胚胎 (根据本课题, 一般是 11,12,13,14 四个周期内的胚胎) 是否具有有一定的普适性。

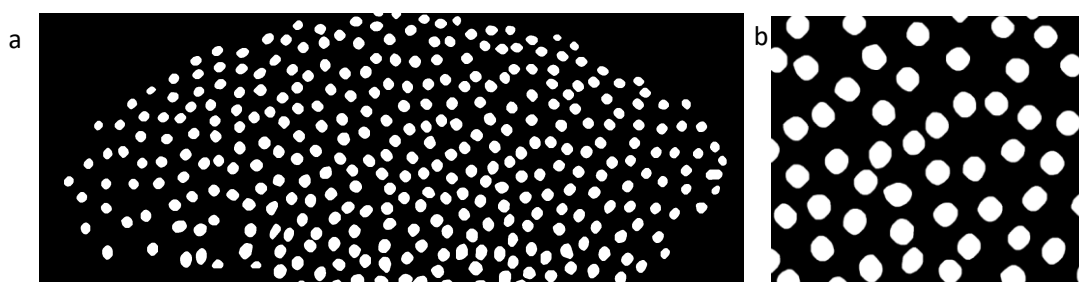


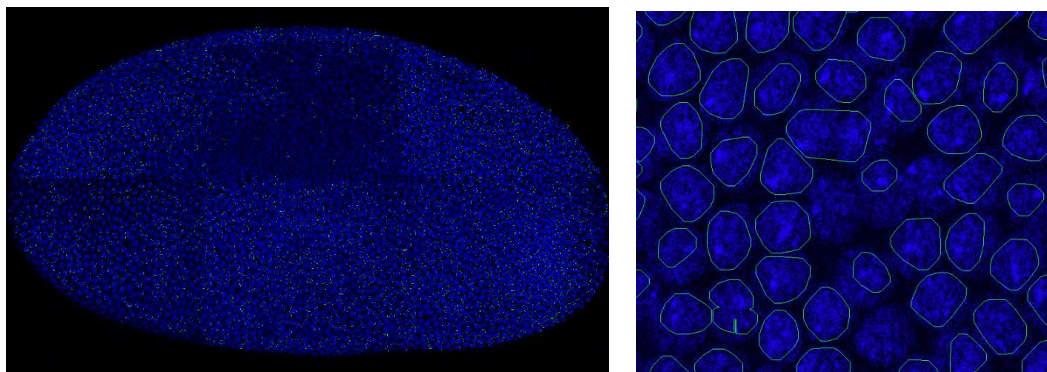
图 4 11 周期胚胎焦平面层标签

图 3 实际表示了处于 14 周期的胚胎图像细胞核识别情况。因此对处于比较早期如 11 周期的胚胎也进行了细胞核识别分割, 得到的输出标签图如图 4 所示。可以看出由于胚胎早期细胞核之间间距更大, 因此实际上分割情况比较好。深度学习训练得到的该模型对于胚胎周期具有一定的普适性。

后续使用该模型对使用另一台共聚焦显微镜莱卡 (上述训练以及预测数据都由蔡司显微镜拍摄) 得到的数据进行处理, 发现对于信号质量较好的图像成像结果依然良好, 不会受成像器件改变的影响。但这批数据中有几组胚胎信号质量较差 (强度以及对比度), 该模型得到的预测结果与之前的相比较为不理想。

如图 5a, b 所示, 出现了较多的相邻细胞核未识别分割开的情况, 并且还出现了在细胞核识别中出现缺口的情况。但根据图 5b, 可以明显看出这组胚胎成像信号质量与之前相比

较差，在一些部分即使人工调整也很难进行分辨。同时，本课题中的训练的得到的模型是以之前成像质量较高的数据集为训练验证样本的，因此使用该训练得到的模型对信号差的数据进行预测时得到的分类标签结果较差可以理解。如果想要提高模型对于信号较差的图像的预测能力，可能需要在训练数据集中加入一定的信号较差的样本进行训练。当然在本实验中，还是需要尽量在共聚焦显微镜成像中得到成像质量较高的图片方便信号提取以及后续的信号分析处理。



图五 成像质量较差的胚胎焦平面层细胞核分割标签图

蓝色：成像原图 绿色：标签图轮廓提取

结论

本课题中，使用 **u-net** 神经网络结构深度学习训练得到模型并进行胚胎成像细胞核识别分割。分析讨论后发现该模型对于不同焦平面的胚胎图像以及不同周期下的胚胎图像都有较好的图像分割结果，基本可以实现自动化细胞核识别该步骤。但由于训练集数据的成像质量都较好，使用该模型对信号质量较差的胚胎图片进行细胞核识别得到的结果相对较差，如果需要进行后续的信号分析，还需要对细胞核分割结果进行一定的人工调整。或者也可以在后续尝试将一些信号质量较差的胚胎成像数据加入模型训练数据集中，可能可以提高该模型对于信号质量差异的普适性。

参考文献

- [1] B. Alberts. "Molecular biology of the cell"[M]. New York : Garland Science, 2002.
- [2] U. Alon. "An introduction to systems biology: design principles of biological circuits"[M]. CRC press, 2006.
- [3] B. Pulverer. "Getting specific"[J]. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005, 6(S12).
- [4] M. Levine and E. H. Davidson. "Gene regulatory networks for development"[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102(14):4936.
- [5] T. M. Filtz, W. K. Vogel, and M. Leid. "Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications"[J]. Trends Pharmacol. Sci. 2014, 35 (2) :76-85.
- [6] T. I. Lee and R. A. Young. "Transcriptional regulation and its misregulation in disease"[J]. Cell. 2013, 152 (6) :1237-1251.
- [7] H. Xu, L. A. Sepulveda, L. Figard, A. M. Sokac, and I. Golding. "Combining protein and mRNA quantification to decipher transcriptional regulation"[J]. Nat. Methods. 2015, 12 (8) :739.
- [8] H. Xu, S. O. Skinner, A. M. Sokac, and I. Golding. "Stochastic Kinetics of Nascent RNA"[J]. Phys Rev Lett. 2016, 117 (12).
- [9] F. Ning, D. Delhomme, Y. LeCun, F. Piano, L. Bottou, and P. E. Barbano. "Toward automatic phenotyping of developing embryos from videos"[J]. Image Processing, IEEE Transactions on,

14(9):1360–1371, 2005.

- [10] D. C. Ciresan, A. Giusti, L.M. Gambardella, and J. Schmidhuber. “Deep neural networks segment neuronal membranes in electron microscopy images”[J]. In NIPS, pages 2852–2860, 2012.
- [11] C. Farabet, C. Couprie, L. Najman, and Y. LeCun. “Learning hierarchical features for scene labeling”[J]. Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on, 2013
- [12] P. H. Pinheiro and R. Collobert. “Recurrent convolutional neural networks for scene labeling”[J]. In ICML, 2014.
- [13] B. Hariharan, P. Arbelaez, R. Girshick, and J. Malik. “Simultaneous detection and segmentation”[J]. In European Conference on Computer Vision (ECCV), 2014
- [14] S. Gupta, R. Girshick, P. Arbelaez, and J. Malik. “Learning rich features from RGB-D images for object detection and segmentation”[J]. In ECCV. Springer, 2014
- [15] Y. Ganin and V. Lempitsky. “N4-fields: Neural network nearest neighbor fields for image transforms”[J]. In ACCV, 2014.
- [16] Long J, Shelhamer E, Darrell T. “Fully convolutional networks for semantic segmentation”[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence, 2014, 39(4):640-651.
- [17] A. Krizhevsky, I. Sutskever, and G. E. Hinton. “Imagenet classification with deep convolutional neural networks”[J]. In NIPS, 2012
- [18] K. Simonyan, A. Zisserman. “Very deep convolutional networks for large-scale image recognition”[J]. CoRR, abs/1409.1556, 2014.
- [19] C. Szegedy, W. Liu, Y. Jia, P. Sermanet, S. Reed, D. Anguelov, D. Erhan, V. Vanhoucke, and A. Rabinovich. “Going deeper with convolutions”[J]. CoRR, abs/1409.4842, 2014.
- [20] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. “U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation” [C] International Conference on Medical Image Computing & Computer-assisted Intervention. 2015.