

基于微流控芯片和机器视觉的秀丽隐杆线虫表型分析

摘 要

目前，环境中化学品的数量日益增多且对人们的身体健康造成严重威胁，如何科学的进行风险评估是公共健康领域的热点与难点。使用细胞或者类器官可进行较高通量的毒性评价与筛选，但研究结果无法代替动物体内实验。传统的动物实验虽然研究结果意义较大，但具有周期长、成本高和涉及动物保护等局限性，难以进行高通量的毒性研究。代表性模式生物秀丽隐杆线虫具有体积小、生命周期短、结构简单和高基因保守性等特点，是环境暴露和毒理学研究领域中重要的体内研究工具。微流控体系与线虫大小尺度相匹配，与在琼脂板上进行的线虫实验相比，其具有反应体系小、通量高、自动化且操作灵活等优势。在线虫的毒理实验中，体长和摆动频率往往作为评价毒性的重要生理指标，通过人工的观察不仅通量低而且还会引入误差。

针对上述问题，本文首先搭建了一个基于微流控芯片的硬件平台，可以实现线虫的简单培养以及为线虫在给定环境毒素下的暴露创造一个精确的微环境，由于线虫通体透明且由 PDMS 制作的微流控芯片也是透明的，线虫的分割是整个系统中的难点，本文首先采用了背景减除的方法进行线虫前景轮廓的提取。实验发现，该方法在较低背景噪声的情况下可以较好的分割线虫。但面对复杂的背景时，该方法的鲁棒性出现显著的下降，导致后续线虫跟踪的丢失率显著增加。针对背景减除方法的不足，本文提出了一种基于深度卷积网络的分割模型。通过实验对比，在我们标注的数据集上分割误差下降了 xx。另外，线虫的跟踪也是一个难点，由于线虫是非刚体其形态变化多种多样。为此，本文提出了一种简单有效的跟踪策略，能过最近邻搜索匹配的方式实现线虫的跟踪。实验发现，在线虫轮廓分割较为完整的情况下，该跟踪方法能够对线虫轮廓实现鲁棒的跟踪。利用跟踪的线虫轮廓，可以计算出线虫的体长、摆动频率和运动速度等生理特征。最后，通过线虫和双氧水的相互作用展示了本文提出的基于微流控平台和自动化图像分析系统在毒理学研究中的应用前景。

关键词：秀丽隐杆线虫; 微流控; 毒性评价; 生理监测

PHENOTYPIC ANALYSIS OF C. ELEGANS BASED ON MICROFLUIDIC CHIP AND MACHINE VISION

ABSTRACT

Todo

KEY WORDS: C. elegans, Microfluidics, Toxicity evaluation, Physiological monitoring

目 录

第一章 绪论	1
1.1 论文研究的背景及意义	1
1.2 秀丽隐杆线虫概述	1
1.3 国内外研究现状	3
1.3.1 微流控芯片线虫操控方法	4
1.3.2 药物筛选与毒理实验	6
1.3.3 机器视觉在线虫研究中的应用	6
1.4 存在的问题	8
1.5 研究内容	8
1.6 论文章节安排	9
第二章 微流控线虫芯片的设计及硬件平台的搭建	10
第三章 线虫轮廓的分割、跟踪及特征提取	11
3.1 线虫图像处理总体方案介绍	11
3.2 基于背景减除方法的线虫轮廓分割	12
3.3 线虫轮廓的跟踪	12
3.4 线虫的特征提取	16
3.4.1 线虫轮廓中间脊线提取	16
3.4.2 身体弯曲角度的计算以及摆动频率的估计	16
3.5 本章小结	17
第四章 基于深度卷积网络的线虫轮廓解析	18
4.1 线虫轮廓解析方法介绍	18
4.2 Singleout 网络设计及模型评估	18
4.3 论文研究的背景及意义	18
4.4 论文研究的背景及意义	18
参考文献	19

第一章 绪论

1.1 论文研究的背景及意义

20 世纪以来,人类生存环境中化学品日益增多,对数量巨大且种类复杂的化学物进行健康风险的评估是公共健康领域当前重要的研究课题。此外,人类与环境化合物的接触方式多为低剂量下的复合暴露,如何实现高通量的毒性评价和科学的风险评估成为研究的热点与难点。

自 2005 年起,美国启动了 21 世纪毒理学研究计划 (TOX21),主要借助体外测试和计算生物信息学等方法进行高通量化学品毒性评估。然而,使用细胞或类器官的体外方法虽然可以进行较高通量的毒性测试,但无法代替动物体内实验,因为其结果无法反映化合物进入生物体内吸收、分布、代谢与排泄环节对毒性的影响。传统的动物体内毒性研究结果具有很大的参考意义,但是实验周期长、成本高,并且涉及动物保护与伦理。如果进行待测化合物低剂量复合暴露毒性研究,需要不同化合物的多剂量进行配伍,基于上述动物实验的局限性,难以进行高通量的毒性测试。秀丽隐杆线虫作为一种模式生物,对环境变化非常敏感;其生命周期和寿命较短,身体尺寸较小易操作,以大肠杆菌为食易培养,身体透明易观察,染色体和基因组较小易分析,生物学信号通路保守,因此近年来线虫被广泛应用于重金属、PM2.5、农药、纳米颗粒和有机污染物等环境毒理学研究领域。国际上目前已进展到第三阶段的 TOX21 计划也在使用包括线虫在内的模式生物对前期结果进行验证,并计划对更多环境化合物进行毒性筛选。

传统的线虫培养方法在液体或琼脂板上进行,需要的线虫数量多,待测化合物所需量较大,此外难以对单个线虫实现精确刺激、操控和追踪。微流控体系与线虫大小尺度相匹配,有望实现线虫芯片内培养、成像和数据分析等。自从 2011 年美国启动“类器官芯片”计划之后,以微流控芯片为平台的毒理测试技术发展迅速,相比器官芯片平台,线虫芯片是在动物个体水平上进行毒理学研究,具有不可替代的优势。

1.2 秀丽隐杆线虫概述

秀丽隐杆线虫 (简称 *C. elegans*) 是一种微米尺度的无脊椎模式生物,主要生活在土壤中或水中,以大肠杆菌 OP50 为食,成虫体长约为 1mm 宽度 50um,并且从幼虫长到成虫只需要 3 天。秀丽隐杆线虫是线虫动物门中的一种,包含雌雄同

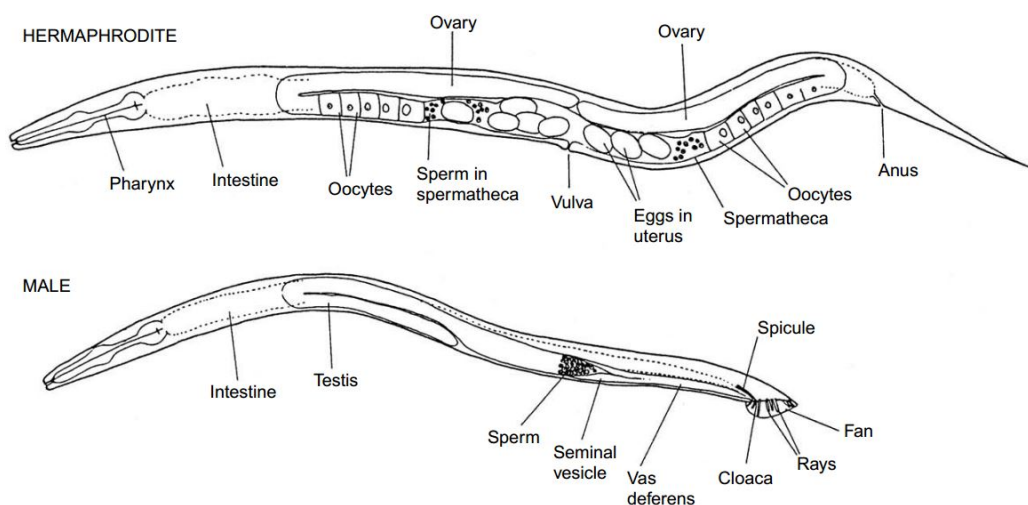


图 1-1 秀丽隐杆线虫解剖图

Figure 1-1 Anatomy of adult *C.elegans*.

体和雄性两种性别如图1-1。两种性别都是二倍体，都有五对常染色体，但雌雄通体的线虫有两个 X 常染色体 (XX) 而雄性线虫只有一个 X 常染色体 (XO)。在自然条件下，线虫几乎都为雌雄同体，雄性个体只占约五百分之一。线虫的生命周期较为简单如图1-2所示，成年雌雄同体线虫同时含有精子和卵母细胞，因此能够自体受精。每一个自体受精的雌雄同体线虫大约可以产生 330 多个蛋。如果雄性体线虫交配产蛋量将会提高，并且有利于基因的重新组合。在 25°C 下孵化 12 个小时即可得到 L1 期的线虫幼虫，长度约为 0.15mm。L1 期幼虫基本上具备了和成虫一样的器官结构，除了还没有形成生殖器结构，从 L1 期线虫长到 L4 期只需要 3 天。线虫作为一种现代动物模型被广泛地用于细胞生物学、神经科学、衰老与发育和毒理学等研究中。在 2002 年，研究秀丽线虫的研究团体就已经扩展到 300 多个实验室，分布在 20 多个国家和地区。1998 年，构成整个基因组的 9700 万个碱基对 DNA 的测序基本完成，这是第一个经过完整基因组测序的多细胞生物。与其他模式生物相比线虫具有如下技术优势：

- 由于线虫通体透明，可以通过荧光蛋白标记的表达观察细胞的分裂等许多重要的生理过程，还可以用于对神经元成像，研究外部刺激与神经元活动之间的关联。
- 线虫的生命周期短、培养简单以及繁殖能力强，这些特性都有助于加快实验周期，提高实验的并行性。
- 线虫身体构造简单，遗传模式保守，有利于减小实验中由于个体差异而引起实验结果的扰动。

- 对线虫基因的测序已经完成，使得线虫可以在基因筛查分析和其他遗传学实验中发挥重要作用。
- 线虫基因与人类的基因有约 40% 的同源性，许多的研究者将线虫作为疾病模型研究疾病机制。

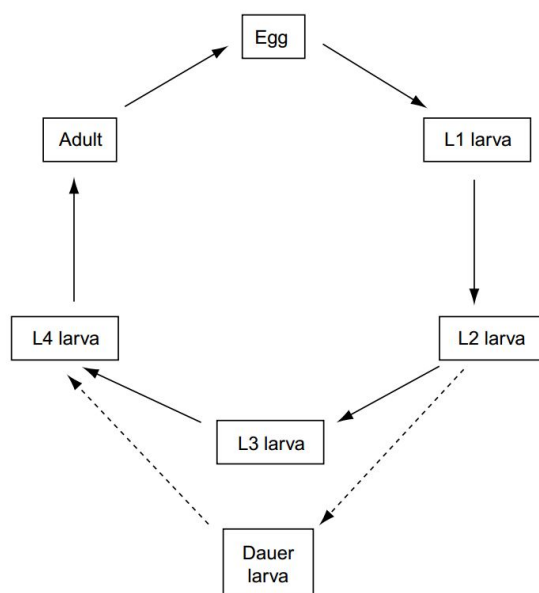


图 1-2 秀丽隐杆线虫生命周期

Figure 1-2 The life cycle of *C.elegans*.

1.3 国内外研究现状

微流控是一种在微米尺度操纵流体的技术，具有反应体系小、通量高、自动化且操作灵活等优势，被越来越多的应用于细胞和微米尺度生物的研究中。微流控技术在线虫研究中的应用为研究者们提供了一个全新的研究平台，极大的促进了相关领域的研究进展。利用微流控技术研究线虫具有的优势有：*a)* 利用微流控芯片可以实现在细胞尺度上对线虫的操纵。*b)* 利用微流控芯片可以实现对线虫的快速固定与成像，与使用药物麻醉的方法相比，这种固定方式不会对线虫产生任何损害，线虫可以在后续步骤中恢复。*c)* 利用微流芯片可以快速的从上千只线虫中的筛选出需要的表型，实现线虫的分选。*d)* 微流控芯片可以为线虫的培养提供精确的微环境，为线虫的感知实验提供精确的刺激传达。本文将从以下几个方面对近年来国内外相关领域的发展状况进行回顾，包括线虫的分选、线虫固定与成像以及介绍微流控在毒理学实验中的研究进展。最后介绍近年来线虫图像处理的研究进展。

1.3.1 微流控芯片线虫操控方法

在线虫的实验中，经常涉及一些对线虫的日常操纵。如线虫的片上培养、线虫分选、线虫的固定与成像等。为了避免复杂的人工操作，研究者们提出了许多不同用途的芯片，这些芯片能够将不同的操作集成在一起，极大的提高了实验的并行性和自动化程度。

1.3.1.1 线虫的培养

线虫的长期培养是研究线虫的衰老和发育的基础，在许多需要对线虫进行长期观察的实验中也需解决线虫的长期培养问题。线虫的长期培养需要与外部环境进行物质交换，包括氧气和食物的供应以及将废物排出。微流控芯片的制作材料一般为聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS)，这种材料具有很好的透气性，因此微流控芯片可以为线虫提供氧气。其中一个早期的工作是由 Kim 等人^[1]完成的，他们设计了一款类似于 CD 形状的微流控芯片可以实现线虫的片上培养长达数天。食物会在离心力的作用下进入到线虫的培养腔室。线虫腔室中的废物会在离心力的作用下被甩出，从而实现了物质的交换。这款芯片可以将线虫培养到三代并且不会影响到线虫的生长和行为。然而，由于其芯片结构设计较为简单，所以无法区分不同代之间的线虫且不能实现对单个线虫的跟踪和成像。

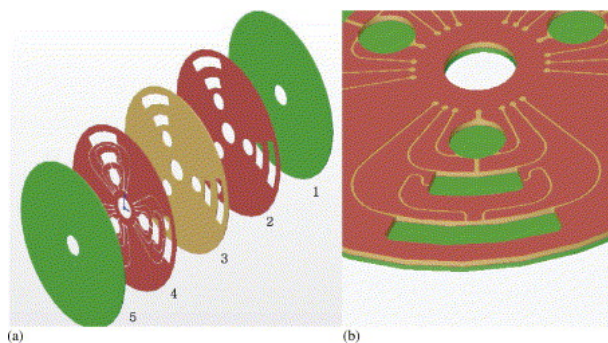


图 1-3 CD 状线虫培养芯片

Figure 1-3 The life cycle of *C.elegans*.

由于以上的局限，Hulme 等^[2]设计了一款新的芯片。由一排平行的腔室组成，可以实现线虫的长期培养及研究其运动行为。利用侧边的楔形通道来固定线虫可以实现线虫的固定与成像以及监测其体长的变化。可以同时培养 16 条成虫，极大的加快了衰老相关的研究，并发现线虫的摆动频率会随着线虫发育日渐成熟而出现下降。另一方面，研究者们将液滴和可逆凝胶运用在线虫的长期培养中^[3-6]。Krajniak 和 Lu^[4]开发了一款集成微流控芯片，该芯片由 8 个微腔室构成，通过周

围的微管道和阀门控制。成功地展示了在一块芯片上进行线虫地培养、固定与成像等操作。线虫由一个入口通道进入到 8 个线虫培养腔室，并将 PF127 可逆凝胶经入口通道注入到线虫培养腔室。这种聚合物在低温 (大约 15°C) 下呈现较高地粘性，在高温下 (大约 21°C) 呈现胶状。运用这款芯片，成功实现了从 L1 期线虫到成虫过程的生理监测。

1.3.1.2 线虫的固定

线虫的固定对于线虫神经元成像与显微手术^[7] 等需要固定线虫的实验是至关重要的。传统的线虫固定方法经常使用胶水或者麻醉剂来固定线虫，使用胶水固定线虫往往很难在短时间内恢复，而使用麻醉剂对线虫神经元可能产生潜在的影响。因此，为了实现可逆的无损伤的固定线虫，研究者提出很多基于微流控固定线虫的方法。Chokshi 等人^[8] 开发了一款简单的微流控芯片可以有效的固定线虫，并运用这款芯片研究了线虫的运动行为。作者比较了两种不同的固定方法，第一种方法是在上层 PDMS 通道中通入二氧化碳，利用 PDMS 材料的透气性，上层二氧化碳会向下层扩散从而达到固定线虫的目的；第二种方法是在上层通道中施加一个大的气压，从而使中间的 PDMS 模形变，从而可以将线虫固定。作者还通过评估线虫的运动速度来量化两种不同的固定方式对线虫产生的影响，他们发现通过二氧化碳方法固定线虫比用机械的方法固定对线虫的影响较小。

以上的方法虽然能够对成虫进行固定，但由于幼虫的尺寸比成虫小且 L1 期的幼虫很容易将微通道阻塞，因此幼虫的固定是个难点。Aubry 等人^[3] 运用 FP127 凝胶液滴将 L1 的幼虫包裹，当液滴进入到存储单元时可以调整温度从而固定线虫，成功实现对 L1 期幼虫的操纵及成像。为了研究线虫胚胎发育及其分子机制，Cornaglia 等人^[9] 设计了一款可以固定线虫胚胎并对其成像的微流控芯片。其由一个线虫培养腔室和许多个微小的胚胎腔室阵列组成，研究者可以在胚胎腔室中固定线虫胚胎并且实时观察胚胎发育的整个过程，这种阵列式的腔室结构支持同时对多个线虫胚胎进行观察，具有高通量的优势。还有一些研究者利用狭窄的微通道来固定线虫^[10, 11]，通过对线虫的存活率和子代的数目进行统计发现这种固定方式对线虫没有产生明显影响。

1.3.1.3 线虫的分选

目前，使用正向和反向基因筛选的方式筛选新的基因是理解分子通路和蛋白功能的一种非常有效的方法。而在成百上千的线虫中筛选出特定表型的线虫是一件耗时且工作量很大的事情，运用微流控器件可以极大的缩短筛选的时间并可以很快对观察到的基因变种进行分选。线虫分选芯片的操作往往是基于线虫某种表

型的特性如趋电性、行为表型、尺寸、运动能力以及电生理学特性的不同等。**Rezai**^[12]等人利用线虫的趋电性设计了一种单层微流控芯片，可以有效的分选出不同发育阶段的线虫以及具有神经缺陷的变种。**Casadevall**^[13]等人设计了一款芯片可以对不同尺寸的线虫同步化，并且可以实现每分钟 200-1200 条线虫的分选速率。**Dong**^[14]等人设计了一种双层的基于 PDMS 膜形变的线虫分选芯片。通过控制上层气压使下层流道层的尺寸发生改变从而只允许特定尺寸的线虫通过这些通道进入另一个腔室。这种方法需要对特定尺寸的线虫精确控制施加气压的大小，这款芯片可以以每秒 3.5 个线虫的速率进行分选。

1.3.2 药物筛选与毒理实验

线虫作为一种重要的模式生物与人类的疾病基因具有约 65% 的相似性^[15, 16]，因此线虫在药物筛选和毒理学研究领域经常作为一种重要的研究对象。近年来，研究者们设计了很多用于实时药物识别、筛选和毒性测试的微流控芯片。**Chung** 等人^[17]开发了一款包含 48 个平行阵列腔室的微流控芯片，每一个腔室单元的直径为 1.5mm，并且还设计了一条宽 500um 的管道用于将线虫和化合物送到每个腔室。所有的腔室在视野中都是可见的，因此便于观察每个腔室中单个线虫暴露在某种化合物下的反应。**Yang** 等人^[18]开发了一款双层的可以评估体内抗菌活性的微流控芯片，芯片呈现放射状四周分布着 32 个腔室，中心有一个存储的腔室，有四个“圣诞树”结构的片上浓度梯度生成器^[19, 20]。利用这款芯片可以同时研究 4 种药物 32 种浓度梯度对线虫的影响。中科院大连化学物理研究所设计制作了一种三夹层的芯片，该芯片由上层液路层、中间气路控制层和底层玻璃组成。液路层有 30 个长 2mm×宽 1mm×厚 70um 的线虫培养腔室用于线虫培养何成像，中间有一个废液池用于收集线虫培养腔室中的废液。并应用该芯片探究了高糖对线虫寿命的影响^[21]。

1.3.3 机器视觉在线虫研究中的应用

研究线虫的运动行为并对其量化在许多线虫研究中(如：神经学、遗传学和毒理学等研究中)起着十分重要的作用，通过人工观察不仅效率低下而且还会引入人为误差，如在基因筛查中需要在成百上千的线虫发现行为异常的线虫往往需要分析几百个小时的视频，因此应用机器视觉的方法量化运动相关的表型具有重要的意义。近年来，研究者们提出很多自动化线虫图像处理的方法。**Dhawan** 等人^[22]设计一个可以在较低的倍率同时跟踪多个线虫的系统，但是该系统只能得到线虫运动方向等信息，无法得到线虫形态和姿势等相关特征(如体长、运动速度等)。**Baek** 等人^[23]开发了一个可以在较高倍率下跟踪单个线虫的系统，通过控制载物台的移

动可以保证线虫始终出现在视野中,通过提取 94 种不同的特征并利用决策树对特征向量进行分类可以区分出行为异常的线虫变种。在 2011 年,剑桥大学分子生物学实验室研究人员设计了一款名为 **Wormtracker** 的系统,该软件可以包含一套定制的软硬件系统^[24]。与之前的单线虫跟踪系统相比,可以将成本下降四分之一,该系统另一个优点是能够实现对所有发育阶段的幼虫的跟踪以及游动状态下单线虫的跟踪。**Swierczek** 等人^[25]设计了一款名为 **Multi-Worm Tracker(MWT)** 的软件,最多可以实现对 120 条线虫的跟踪,但只能以离线的方式对采集到的视频数据进行特征提取无法实现特征的实时提取。另外,当多个线虫的相遇并相互遮挡时,系统只会识别到一个轮廓,这样会导致跟踪的失败。

为了解决线虫跟踪过程中线虫轮廓的重叠与遮挡的问题,研究者们提出了一些基于模型的跟踪算法。**Restif** 等人^[26]提出一种针对游动线虫的跟踪算法。其将线虫的跟踪分成两个阶段:第一个阶段是通过线虫轮廓运动的历史状态预测下个状态线虫轮廓运动的速度,结合当前状态下线虫轮廓的位置可以计算出下个时刻线虫轮廓出现的位置;第二个阶段主要是调整上个阶段得到的线虫轮廓使其与图片上线虫的轮廓重合。**Fontaine** 和 **Roussel** 等人^[27, 28]提出了一种可以对线虫和斑马鱼进行跟踪的算法,其主要思想是通过对线虫轮廓进行参数化建模得到状态空间并通过迭代卡尔曼滤波器来预测模型参数从而实现线虫的跟踪。针对单个线虫发生自身卷曲时其轮廓识别的困难,**Nagy** 等人^[29]提出一种基于统计生成式方法可以识别复杂的姿态。

线虫的图像处理一般分为两个模块,分别是线虫的跟踪(包括线虫轮廓的分割)和线虫的特征提取。线虫的跟踪模块主要是得到线虫的轮廓,线虫的特征提取模块是利用跟踪到的线虫轮廓进行特征计算。**Yemini** 等人^[30]对线虫相关的行为表型进行了综述并将其分为四大类:分别为形态特征(如:体长、体宽和面积等)、姿势特征(如:线虫脊线的水平投影长度、波长以及弯曲的数量等)、运动特征(如:运动速度和运动状态等)、轨迹特征(如:线虫重心移动轨迹的范围和轨迹图等)。线虫姿态的描述一般是通过在线虫的中间脊线上等距的采样固定数量的点来定义的。这样得到线虫姿势的状态空间通常是很大的,**Stephens** 等人^[31]提出一种降维的方法从而可以在较低的维度空间描述线虫的姿势状态。其主要的思想是计算线虫中间脊线的曲率从而得到一个曲率向量,并对其归一化然后计算这个向量的协方差矩阵,发现其大部分的特征值为零。作者取了四个最大的特征值对应的特征向量作为四个本征向量,这四个本征向量将构成一个状态空间,任何线虫脊线曲率向量都可以投影到这个空间。由此得到四个投影长度即可描述线虫的姿势。即可以在一个四维空间中描述线虫的姿势。**Restif** 等人^[32]提出了一种新的计算特征的方法。通过将计算同一个线虫的脊线曲率向量并将其按照时间顺序排列,由此即可

得到一个矩阵。通过对这个矩阵做二维离散傅里叶变换。最后基于傅里叶变换的结果计算线虫相关的特征。为了实现线虫行为数据的共享, Javer 等人^[33] 提出统一的数据格式支持对视频数据以及对应的特征数据的读取以存储。并定义了一种中间数据格式表示 Worm tracker Commons Object Notation (WCON) 这样可以方便研究者组合使用不同线虫跟踪模块和特征提取模块。

1.4 存在的问题

尽管目前基于微流控技术的药物筛选和毒理测试取得了一定的进展, 但大规模的片上浓度梯度的形成依然面临问题。目前很多的微流控芯片的片上浓度形成依赖“圣诞树”结构的浓度生成器, 这种结构存在样品消耗大以及需要精确的流阻设计和流速调节等问题。截止到目前, 大多数关于线虫图像处理报道并没有考虑线虫轮廓分割的问题, 因为这些算法的应用场景通常是线虫和背景形成了一个很强的对比度, 因此通过阈值处理即可得到线虫的前景轮廓。但线虫在微流控芯片中的成像很难形成前景与背景对比度很强的图像, 因为由 PDMS 制作的微流控芯片和线虫都是透明的, 如何鲁棒地提取线虫轮廓的前景是一个难点。另一方面, 考虑到线虫在运动的时候会出现相互遮挡并纠缠在一起以及自身卷曲等问题, 线虫的跟踪是个难点。尽管目前有一些基于模型的跟踪算法可以解决一部分的线虫轮廓相互遮挡的问题, 但这些方法都较为复杂且通常只能解决两个线虫相互纠缠在一起的情形, 因为需要对每个线虫的轮廓运动模型建模, 大大限制了其能跟踪线虫的数量。在国内除本课题外还没有见到关于线虫图像处理相关研究的报道。

1.5 研究内容

本文主要研究了微流控芯片和机器视觉在基于线虫的药物筛选和毒理测试研究方面的应用, 本文的主要工作如下:

1. 本文首先搭建了一个微流控芯片的硬件平台, 可以实现线虫的简单培养并可以快速的形成多个浓度梯度, 为线虫在给定化合物下的暴露创造一个精确的微环境。
2. 为了实现对线虫生理指标的实时监测, 本文提出一种集线虫轮廓分割、轮廓解析、轮廓跟踪以及特征提取的框架并以 python 作为主要的开发语言加以实现。
3. 针对微流控背景下线虫轮廓分割很容易收到噪声干扰以及鲁棒性等问题, 由于卷积网络在特征提取方面具有很强的鲁棒性并且基于卷积网络的架构在很多领域的分割任务中取得很大的成功, 本文尝试将卷积网络运用在线

虫轮廓分割的任务，结构显示与基于背景减除的轮廓提取算法相比，像素误差下降了 **XX**。

4. 针对多线虫跟踪情况下会出现线虫轮廓相互纠缠导致跟踪丢失的问题，本文提出了一种基于深度卷积网络和条件生成对抗网络的网络架构。结果显示，这种方法可以有效的解析出线虫相互纠缠时每个线虫的轮廓。

1.6 论文章节安排

第二章 微流控线虫芯片的设计及硬件平台的搭建

第三章 线虫轮廓的分割、跟踪及特征提取

本章将介绍线虫图像处理的流程，包括线虫轮廓的分割、跟踪和特征提取等多个步骤。本章介绍一种基于背景减除的线虫轮廓分割方法，但这种前景提取的方法存在一定的局限性(如：如鲁棒性不足且只能针对静止背景的图像等)。本文将在第三章提出一种基于神经网络的前景分割方法，线虫轮廓的解析将在第四章进行介绍。基于轮廓解析的结果，本章提出一种基于二分图匹配的跟踪方法。最后，本章将介绍一些在药物筛选和毒理学研究中用于量化线虫行为的特征(如：体长、摆动频率和运动速度等)。

3.1 线虫图像处理总体方案介绍

线虫图像处理的总体流程如图3-1所示，共分成4个阶段。第一个阶段是从采集到的视频中读取一帧图像，并将线虫轮廓覆盖的区域定义为前景，剩下的区域视为背景。这一阶段的输出为一幅二值化的图像，其中1表示前景0表示背景。如果是单线虫的跟踪，则第一个阶段的输出则为线虫的轮廓。但考虑到多线虫跟踪过程中多个线虫的轮廓会出现相交甚至纠缠在一起，导致因无法区分单个线虫从而跟踪丢失。第二个阶段的任务主要是对多个线虫相交的轮廓进行解析，从而得到单个线虫的轮廓。第三个阶段的线虫跟踪是利用线虫轮廓的重心面积等信息找出相邻两帧图像之间线虫轮廓的对应关系。第四个阶段主要是利用跟踪到的线虫轮廓计算出线虫体长、运动速度等信息。

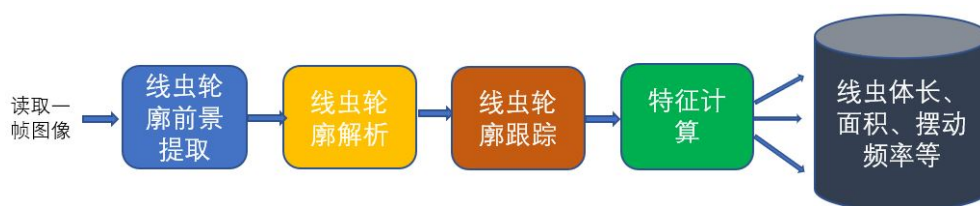


图 3-1 线虫图像处理总体流程图

Figure 3-1 The flow chart of C.elegans image processing

3.2 基于背景减除方法的线虫轮廓分割

通过背景减除方法实现前景轮廓提取需要对背景进行建模, 假设在一幅图像中每个像素的取值具有空间独立性, 只与最近的 T 个历史像素取值相关。在时间 t 历史像素可以表示为 $h_T = \{x^{(t)}, \dots, x^{(t-T)}\}$, 则每个像素的取值用一个包含 M 个高斯的混合高斯概率函数来建模, 公式3-1中 FG 表示像素属于前景, BG 表示该像素属于背景。 $\hat{u}_1, \dots, \hat{u}_M$ 和 $\hat{\sigma}_1^2, \dots, \hat{\sigma}_M^2$ 分别表示混合高斯模型中的待估参数均值和方差。 $\hat{\pi}_m$ 表示高斯权重且所有权重相加等于 1。

$$p(\vec{x}|h_T, BG + FG) = \sum_{m=1}^M \hat{\pi}_m N(\vec{x}; \hat{u}_m, \hat{\sigma}_m^2 I) \quad (3-1)$$

当在时刻 t 得到一个新像素值 $\vec{x}^{(t)}$ 时, 模型参数将如下方式更新, 其中 $\vec{\delta}_m = \vec{x}^{(t)} - \hat{u}_m$, $a = 1/T$ 。并将与新像素值 $\vec{x}^{(t)}$ 最近的高斯分量对应的 $o_m^{(t)}$ 设置为 1 其他设置为 0。

$$\hat{\pi}_m \leftarrow \hat{\pi}_m + a(o_m^{(t)} - \hat{\pi}_m) \quad (3-2)$$

$$\hat{u}_m \leftarrow \hat{u}_m + o_m^{(t)}(a/\hat{\pi}_m)\vec{\delta}_m \quad (3-3)$$

$$\hat{\sigma}_m^2 \leftarrow \hat{\sigma}_m^2 + o_m^{(t)}(a/\hat{\pi}_m)(\vec{\delta}_m^T \vec{\delta}_m - \hat{\sigma}_m^2) \quad (3-4)$$

将 M 个高斯分量按照权重从大到小排序, 则背景模型可以通过前 B 个最大的高斯分量来近似。

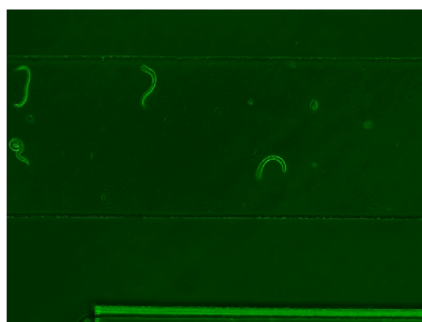
$$p(\vec{x}|h_T, BG) \sim \sum_{m=1}^B \hat{\pi}_m N(\vec{x}; \hat{u}_m, \hat{\sigma}_m^2 I) \quad (3-5)$$

如图3-2所示基于混合高斯模型的背景减除方法与简单的帧间差分法相比, 背景减除的方法能够显著的减少前景轮廓提取的不连续且分割的性能更好。用一个 5×5 的核对提取到的前景轮廓进行形态学闭运算得到的结果如图3-2c所示, 形态学闭运算用于连接线虫轮廓的断裂。最后, 运用 OTSU 二值化算法就可以得到最终的线虫前景轮廓如图3-2f所示。

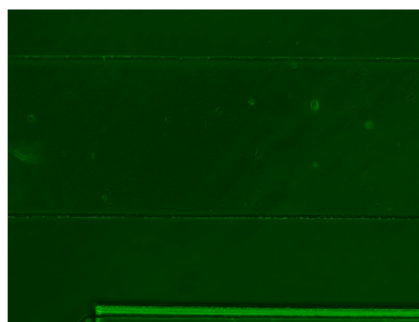
3.3 线虫轮廓的跟踪

由于线虫通体透明, 跟踪起来比较困难, 本文采用了一种简单有效的跟踪策略。首先经过线虫前景轮廓提取和线虫轮廓解析等步骤后, 可以得到每一帧图像里所有线虫的轮廓。由公式3-6和公式3-7可以计算出轮廓的重心坐标。

$$m_{ji} = \sum_{x,y} I_{x,y} x^i y^j \quad (3-6)$$



(a) 待处理线虫图像



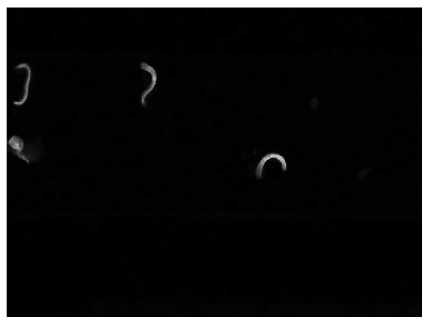
(d) 基于混合高斯模型建模的背景图



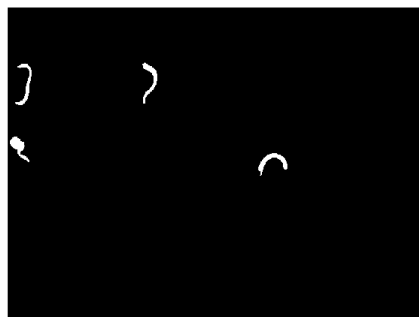
(b) 基于混合高斯模型背景减除图片



(e) 帧间差分法结果图



(c) 对背景减除得到的图像闭运算



(f) OTSU 阈值处理后的二值图

图 3-2 前景提取过程中的图片

Figure 3-2 The images in the foreground object extraction

$$\vec{x} = \frac{m_{10}}{m_{00}}, \quad \vec{y} = \frac{m_{01}}{m_{00}} \quad (3-7)$$

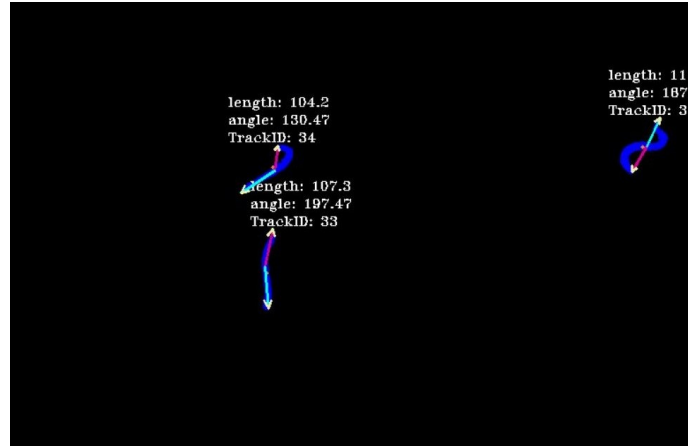


图 3-3 跟踪的结果

Figure 3-3 The tracking result

假设当前帧有 n 个轮廓，上一帧图像有 m 个轮廓，由每个轮廓的重心坐标可以得到一个 $n \times m$ 的距离矩阵用公式3-8 表示。

$$D = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & \cdots & d_{1m} \\ d_{21} & d_{22} & \cdots & d_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ d_{n1} & d_{n2} & \cdots & d_{nm} \end{bmatrix} \quad (3-8)$$

矩阵中 d_{ij} 表示当前帧中的第 i 个轮廓的重心到上一帧中第 j 个轮廓的重心之间的距离。通过公式3-9可以得到相邻两帧图像中线虫轮廓之间的对应关系。即如果相邻两帧图像中两个轮廓重心之间的距离最短，则可以认为是同一个线虫。

$$index(i) = \arg \min_j d_{ij} \quad (3-9)$$

但事实上由于轮廓分割的不完美以及图像噪声的影响，这一策略往往会失效。因此，通过最近邻搜索的方式来实现线虫的跟踪要满足以下的约束条件，当这两个条件之一不满足时，则认为跟踪丢失，此时应该分配一个新的 **trackID** 给当前的轮廓。算法3-2 是描述了线虫跟踪算法的实现思路。图3-3表示跟踪的结果。

- 相邻两帧图像中同一只线虫的轮廓面积的相对变化应该小于一个阈值。
- 根据线虫运动的最大速度，同一只线虫在相邻两帧图像中轮廓的重心之间的距离应该小于一个阈值。

算法 3-1 跟踪初始化程序

输入: *Worm_data* 双重列表, *Worm_data[i][j]* 表示第 *i* 帧图像中第 *j* 只线虫。

输出: 输出 *trackID*

```

1: function INITIATE_TRACKING(Worm_data)
2:   FirstFrame_WormData  $\leftarrow$  Worm_data[0]
3:   for  $i = 0 \rightarrow \text{FirstFrame\_WormData.length} - 1$  do
4:     cur_worm  $\leftarrow$  FirstFrame_WormData[i]
5:     cur_worm.trackID  $\leftarrow$  GetNewTrackID()
6:   end for
7: end function

```

算法 3-2 线虫跟踪程序

输入: *Worm_data* 双重列表, *Worm_data[i][j]* 表示第 *i* 帧图像中第 *j* 只线虫。

输出: 输出 *trackID*

```

1: function WORM_TRACKING(Worm_data)
2:   Initiate_tracking(Worm_data)
3:   for  $\text{frame\_index} = 1 \rightarrow \text{Worm\_Data.length} - 1$  do
4:     PreFrame_WormData  $\leftarrow$  Worm_Data[frame_index - 1]
5:     for  $\text{worm\_index} = 0 \rightarrow \text{Worm\_Data}[\text{frame\_index}].\text{length} - 1$  do
6:       cur_worm  $\leftarrow$  Worm_Data[frame_index][worm_index]
7:       dist_array  $\leftarrow$  Compute_distance(cur_worm, PreFrame_WormData)
8:       min_index  $\leftarrow$  Get_min_index(dist_array)
9:       Nearest_worm  $\leftarrow$  PreFrame_WormData[min_index]
10:      if  $\frac{|\text{Nearest\_worm.Area} - \text{cur\_worm.Area}|}{\text{Nearest\_worm.Area}} < \delta$  and dist_array[min_index] <  $\sigma$ 
11:        then
12:          cur_worm.trackID  $\leftarrow$  Nearest_worm.trackID
13:        else
14:          cur_worm.trackID  $\leftarrow$  GetNewTrackID()
15:        end if
16:      end for
17:    end for
18:  end function

```

3.4 线虫的特征提取

线虫从头部到尾部两边近似等距的分布着 23-24 块肌肉，其头部和尾部各占其总长度的 1/6。因此线虫身体的自由度为 24。当用轮廓来描述线虫的形态时，在其轮廓上采样 49 个点足以描述线虫所有形态。当对线虫进行特征计算时（如：计算线虫摆动频率和运动速度等），通常是利用线虫轮廓中间的脊线进行计算。因此需要提取线虫轮廓的中线然后采样 24 个点用于特征计算。下面将首先对线虫轮廓中间脊线提取算法进行介绍，然后介绍线虫摆动频率的估计以及运动速度的计算。

3.4.1 线虫轮廓中间脊线提取

在得到线虫的轮廓后，将轮廓上的坐标按顺时针排列即可得到一个坐标点的循环列表。将轮廓周长的 1/48 作为一个单位边，在轮廓上的任意一点其两边都可以找到一个单位边长度的相邻点，这三点所成角的补角的倒数与该点的曲率成正比，因此可以用于近似曲率的计算。由于其头部和尾部的变换往往比身体的其他部分要尖锐，所以如果将像素索引作为横坐标曲率作为纵坐标，则这条曲线上将会出现两个波峰如图3-4所示，分别对应线虫的头部和尾部。由此便可定位到线虫的头部和尾部，另外线虫的头部曲率一般小于尾部的曲率，两个波峰中比较低的波峰对应的横坐标为线虫头部的坐标，另一个波峰对应线虫尾部的坐标。线虫头部和尾部将线虫轮廓分为两边。在其中一条边上找到所有距离另一条边最近的对应点。两条边上两对应点的中点构成线虫的中间脊线，线虫轮廓中间脊线的长度定义为线虫的体长。

3.4.2 身体弯曲角度的计算以及摆动频率的估计

在很多毒理实验中，线虫的摆动频率经常作为一个重要的生理指标用于表征线虫的活跃程度^[34]。为了计算线虫的摆动频率，我们定义一个衡量身体弯曲程度的夹角，由线虫头部、尾部和轮廓脊线的中点三点所成角定义为身体弯曲角。线虫在爬行和游动的过程中，身体弯曲角会在 180°C 左右振荡如图??，振荡的频率定义为线虫摆动的频率。在时刻 t_0 ，对区间 $(t_0 - \Delta t, t_0 + \Delta t)$ 中弯曲角信号做 FFT 变换，假设其幅度最大值对应的横坐标为 n ，则线虫在 t 时刻的瞬时摆动频率由公式3-10得出，图??表示线虫摆动频率随时间的变换。

$$f = \frac{frame_rate * n}{2 * \Delta t} \quad (3-10)$$

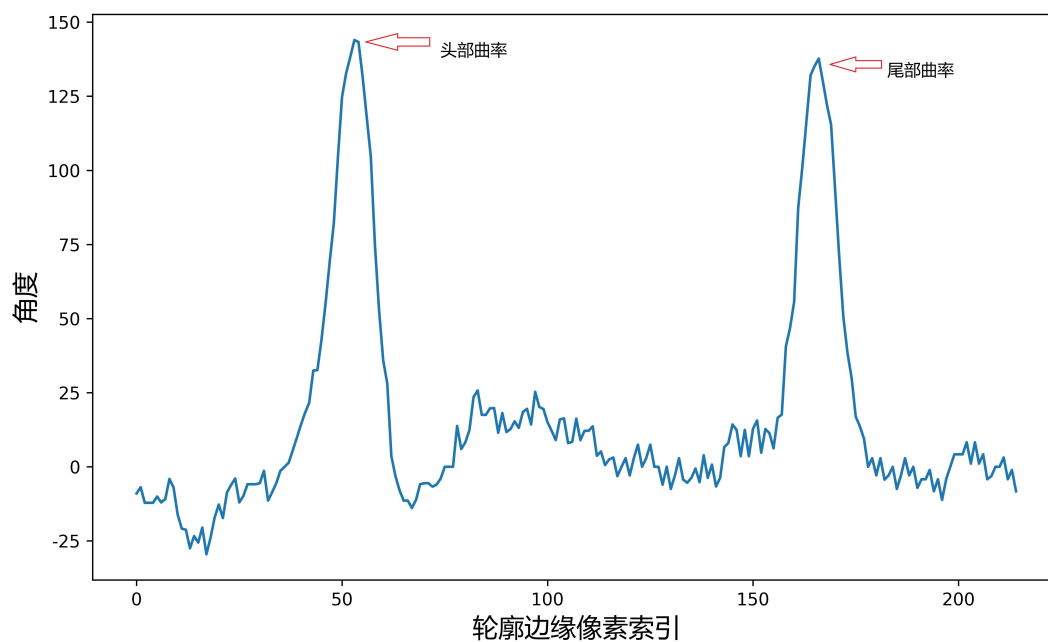
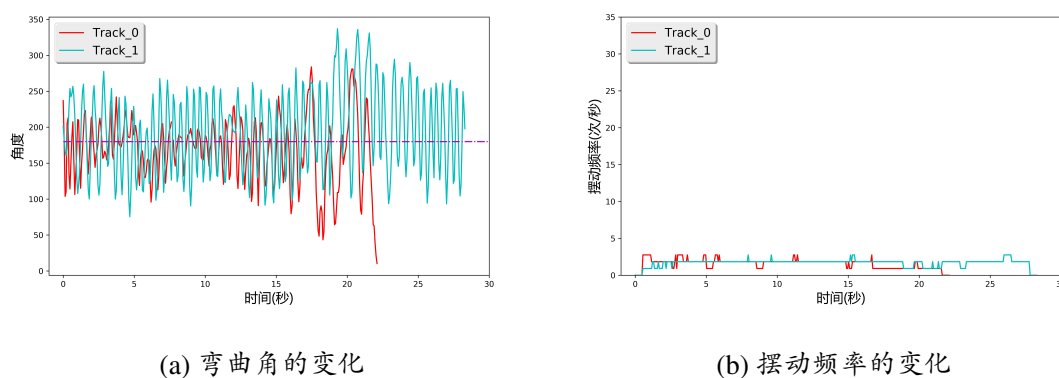


图 3-4 轮廓曲率的变化

Figure 3-4 Change in contour curvature



(a) 弯曲角的变化

(b) 摆动频率的变化

图 3-5 线虫弯曲角度和摆动频率的变换

Figure 3-5 An EPS and PDF demo with subcaptionbox

3.5 本章小结

本章详细介绍了线虫图像处理的流程，并介绍了基于高斯混合模型的背景建模方法在线虫前景轮廓提取任务中的应用。提出了一种基于最近邻搜索的线虫轮廓跟踪算法，最后，介绍了线虫轮廓中间脊线的计算方法，并定义了线虫身体弯曲角以及基于弯曲角的摆动频率估计。

第四章 基于深度卷积网络的线虫轮廓解析

- 4.1 线虫轮廓解析方法介绍
- 4.2 Singleout 网络设计及模型评估
- 4.3 论文研究的背景及意义
- 4.4 论文研究的背景及意义

参考文献

- [1] KIM N, DEMPSEY C M, ZOVAL J V, et al. Automated microfluidic compact disc (CD) cultivation system of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2007, 122(2): 511–518.
- [2] HULME S E, SHEVKOPLYAS S S, MCGUIGAN A P, et al. Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2010, 10(5): 589–597.
- [3] AUBRY G, MEI Z, LU H. Hydrogel-droplet microfluidic platform for high-resolution imaging and sorting of early larval *Caenorhabditis elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2015, 15(6): 1424–1431.
- [4] KRAJNIAK J, LU H. Long-term high-resolution imaging and culture of *C. elegans* in chip-gel hybrid microfluidic device for developmental studies[J]. *Lab on A Chip*, 2010, 10(14): 1862–1868.
- [5] WEN H, YU Y, ZHU G, et al. A droplet microchip with substance exchange capability for the developmental study of *C. elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2015, 15(8): 1905.
- [6] CORNAGLIA M, KRISHNAMANI G, MOUCHIROUD L, et al. Automated longitudinal monitoring of in vivo protein aggregation in neurodegenerative disease *C. elegans* models.[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2016, 11(1): 1–13.
- [7] GOKCE S K, GUO S X, GHORASHIAN N, et al. A fully automated microfluidic femtosecond laser axotomy platform for nerve regeneration studies in *C. elegans*. [J]. *Plos One*, 2014, 9(12): e113917.
- [8] CHOKSHI T V, BENYAKAR A, CHRONIS N. CO₂ and compressive immobilization of *C. elegans* on-chip.[J]. *Lab on A Chip*, 2009, 9(1): 151–157.
- [9] CORNAGLIA M, MOUCHIROUD L, MARETTE A, et al. An automated microfluidic platform for *C. elegans* embryo arraying, phenotyping, and long-term live imaging[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10192.

- [10] LEE H, KIM S A, COAKLEY S, et al. A multi-channel device for high-density target-selective stimulation and long-term monitoring of cells and subcellular features in *C. elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2014, 14(23): 4513–4522.
- [11] HULME S E, SHEVKOPLYAS S S, APFELD J, et al. A microfabricated array of clamps for immobilizing and imaging *C. elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2007, 7(11): 1515–1523.
- [12] REZAI P, SALAM S, SELVAGANAPATHY P R, et al. Electrical sorting of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Lab on A Chip*, 2012, 12(10): 1831.
- [13] CASADEVALL I S X, GEIER F M, LEROI A M, et al. High-throughput age synchronisation of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(35): 9801.
- [14] DONG L, CORNAGLIA M, LEHNERT T, et al. Versatile size-dependent sorting of *C. elegans* nematodes and embryos using a tunable microfluidic filter structure[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(3): 574–585.
- [15] BAUMEISTER R, GE L. The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(4): 147–148.
- [16] SONNHAMMER E L, DURBIN R. Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genomics*, 1997, 46(2): 200–216.
- [17] CHUNG K, ZHAN M, SRINIVASAN J, et al. Microfluidic chamber arrays for whole-organism behavior-based chemical screening[J]. *Lab on A Chip*, 2011, 11(21): 3689.
- [18] YANG J, CHEN Z, CHING P, et al. An integrated microfluidic platform for evaluating in vivo antimicrobial activity of natural compounds using a whole-animal infection model[J]. *Lab on A Chip*, 2013, 13(17): 3373.
- [19] DERTINGER S K W, CHIU D T, JEON N L, et al. Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(6): 1240–1246.
- [20] JEON N L, DERTINGER S K W, CHIU D T, et al. Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems[J]. *Langmuir*, 2000, 16(22): 8311–8316.
- [21] 朱国丽, 尹方超, 王丽, 等. 基于微流控芯片的高糖对模式生物线虫寿命影响及白藜芦醇保护性作用考察[J]. *色谱*, 2016, 34(2): 140–145.

- [22] DE B M, BARGMANN C I. Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. [J]. *Cell*, 1998, 94(5): 679–689.
- [23] BAEK J H, COSMAN P, FENG Z, et al. Using machine vision to analyze and classify *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes quantitatively [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, 118(1): 9–21.
- [24] YEMINI E. High-throughput, single-worm tracking and analysis in *Caenorhabditis elegans* [D]. University of Cambridge, 2013.
- [25] SWIERCZEK N A, GILES A C, RANKIN C H, et al. High-throughput behavioral analysis in *C. elegans* [J]. *Nature methods*, 2011, 8(7): 592.
- [26] RESTIF C, METAXAS D. Tracking the swimming motions of *C. elegans* worms with applications in aging studies [C] // *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Springer. [S.l.]: [s.n.], 2008: 35–42.
- [27] FONTAINE E, BARR A H, BURDICK J W. Model-based tracking of multiple worms and fish [C] // *ICCV Workshop on Dynamical Vision*. [S.l.]: [s.n.], 2007.
- [28] ROUSSEL N, SPRENGER J, TAPPAN S J, et al. Robust tracking and quantification of *C. elegans* body shape and locomotion through coiling, entanglement, and omega bends [C] // *Worm*. Vol. 3. 4. Taylor & Francis. [S.l.]: [s.n.], 2014: e982437.
- [29] NAGY S, GOESSLING M, AMIT Y, et al. A generative statistical algorithm for automatic detection of complex postures [J]. *PLoS computational biology*, 2015, 11(10): e1004517.
- [30] YEMINI E, JUCIKAS T, GRUNDY L J, et al. A database of *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes [J]. *Nature methods*, 2013, 10(9): 877.
- [31] STEPHENS G J, JOHNSON-KERNER B, BIALEK W, et al. Dimensionality and dynamics in the behavior of *C. elegans* [J]. *Plos Computational Biology*, 2008, 4(4): e1000028.
- [32] RESTIF C, IBÁÑEZVENTOSO C, VORA M M, et al. CeleST: computer vision software for quantitative analysis of *C. elegans* swim behavior reveals novel features of locomotion. [J]. *PLoS Computational Biology*, 10, 7(2014-7-17), 2014, 10(7): e1003702.

- [33] JAVIER A, CURRIE M, LEE C W, et al. An open-source platform for analyzing and sharing worm-behavior data[J]. *Nature methods*, 2018, 15(9): 645.
- [34] WANG D, XING X. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *环境科学学报 (英文版)*, 2008, 20(9): 1132–1137.