

两种颜色分解方法及其在免疫荧光图像分析中的应用*

杨大刚¹ 窦万春¹ 张习文² 蔡士杰¹

(南京大学计算机软件新技术国家重点实验室 南京210093)¹

(中科院软件所人机交互技术与智能信息处理实验室 北京100080)²

摘 要 给出颜色分解的抽象定义,提出两种颜色分解方法:色度图中的颜色分解方法、基于预计算和离散化的颜色分解方法,并将其应用于免疫荧光图像的颜色分析。实验表明颜色分解方法数据符合图像视觉颜色,在所得实验数据基础上对比分析了两种分解方法。

关键词 颜色分解,色度图,预计算,离散化

Two Color Decomposition Methods and their Application in Immunofluorescence Image

YANG Da-Gang¹ DOU Wan-Chun¹ ZHANG Xi-Wen² Cai Shi-Jie¹

(State Key Lab. of Novel Software Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)¹

(Intelligence Engineering Lab. of ISCAS, Beijing 100080)²

Abstract One abstract definition of color decomposition is given and two kinds of color decomposition methods are proposed: one method is processed in the chromaticity diagram, and the other one is based on the pre-computation and discretization. These two methods are implemented and applied in the color analysis of immunofluorescence image. The experiment shows that data produced by color decomposition methods are consistent with image's vision color, and based on the acquired data, one comparison of two methods is given.

Keywords Color decomposition, Chromaticity diagram, Pre-computation, Discretization

1 引言

物理意义上的颜色分解是指将一种颜色分解为几种已知颜色:如将颜色分解为红绿蓝三基色,或者通过三棱镜根据不同波长光折射系数的不同将一束太阳光分解为七色光。本文对颜色分解问题抽象定义如下:已知若干种组成色色度坐标和某个混合色色度坐标,求每种组成色在混合色中所占比例,此处的组成色是指参与混合的组成颜色。将一种颜色分解为多种已知颜色可由色度学上的颜色匹配实验间接实现^[1],或者从原子物理方面探讨^[2,3],但这两种方法在实际环境中并不可行,本文提出了两种可编程实现的实用颜色分解方法,并将其应用于彩色免疫荧光图像的颜色分析。彩色免疫荧光图像中的细胞颜色由若干种荧光素所发荧光颜色混合形成,视觉上通过人眼对细胞的整体颜色感受并结合每种荧光素受激发后所发荧光颜色的知识定性判断细胞颜色由哪几种荧光颜色混合形成;机器分析颜色表现为分解细胞的整体颜色,定量得到每种荧光颜色在细胞颜色中所占比例。

本文第2节详细阐述两种颜色分解方法:色度图中的颜色分解方法、基于预计算和离散化的颜色分解方法;第3节介绍两种颜色分解方法在免疫荧光图像颜色分析中的应用;第4节是实验,验证颜色分解方法的正确性,对比分析两种方法的实验数据;最后总结全文。

2 两种颜色分解方法

2.1 色度图中的颜色分解方法

CIE x - y 色度图上,两种组成色相加产生的混合色色度

坐标位于组成色色度坐标的连线上,其在连线上的位置取决于组成色三刺激值的比例,按重心原理位于比例大的组成色一侧。如图1所示:组成色 P , 色度坐标 (x_1, y_1) , 三刺激值和 C_1 ; 组成色 Q , 色度坐标 (x_2, y_2) , 三刺激值和 C_2 ; 过 P 作垂直于 PQ 的线段 RP , 长度与 C_2 成比例; 过 Q 作垂直于 PQ 的线段 SQ , 长度与 C_1 成比例。连接 RS 与 PQ 相交于 M , M 即为混合色, 色度坐标 (x, y) 。

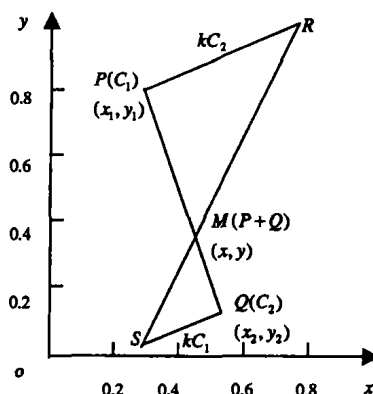


图1 色度图中的颜色分解

$$\begin{aligned} \therefore \frac{QM}{MP} &= \frac{QS}{PR} = \frac{C_1}{C_2} \\ \therefore \frac{QM}{MP} &= \frac{C_1}{C_2}, \frac{QM}{QM+MP} = \frac{QM}{QP} = \frac{C_1}{C_1+C_2} \end{aligned} \quad (1)$$

根据文[1]中的知识,混合色三刺激值可由组成色三刺激值线性叠加得到,所以 C_1+C_2 即为混合色 M 的三刺激值和;

*)基金项目:国家自然科学基金资助项目(60303025)。

从式(1)可以看出,组成色 P 在混合色 M 中的比例 $(\frac{C_1}{C_1+C_2})$ 即为 QM 和 QP 的线段长度比例;而线段长度在色度图中可通过计算色度坐标之间的距离得到: $QM=$

$$\sqrt{(x_2-x)^2+(y_2-y)^2}, QP=$$

$\sqrt{(x_2-x_1)^2+(y_2-y_1)^2}$ 。同理经由线段长度比例可得到组成色 Q 在混合色 M 中的比例。混合色 M 仅由一种组成色构成不在公式计算范围之内。

2.2 基于预计算和离散化的颜色分解方法

方法的主要思路如下:预先按照人为指定的比例混合组成色,计算混合色色度坐标并存储,同时存储组成色的混合比例;颜色分解时计算待分解颜色和已存储混合色色度坐标之间的距离,寻找与待分解颜色距离最近的已存储混合色,在误差允许的范围内认为这两种颜色相同;由已存储混合色的组成信息,得到待分解颜色的组成信息,从而达到颜色分解的目的。离散化是指将连续的颜色空间转化为离散的颜色点集合,离散化程度决定了颜色分解的精度和速度。预计算混合色是指预先按照人为指定的比例依据颜色混合公式计算混合色色度坐标,文[1]中仅给出基于三刺激值线性叠加的混合色计算公式,因此需要推导能够人为控制混合比例的混合色色度坐标计算公式才能满足预计算的前提。

设组成色 C_1, C_2 的三刺激值表示和色度坐标表示为:

$$C_1 = X_1[X] + Y_1[Y] + Z_1[Z] = m_1 \{x_1[X] + y_1[Y] + z_1[Z]\},$$

$$C_2 = X_2[X] + Y_2[Y] + Z_2[Z] = m_2 \{x_2[X] + y_2[Y] + z_2[Z]\},$$

根据文[1]中的知识,混合色三刺激值可由组成色三刺激值线性叠加得到,即:

$$C_{1+2} = (X_1 + X_2)[X] + (Y_1 + Y_2)[Y] + (Z_1 + Z_2)[Z] = (m_1x_1 + m_2x_2)[X] + (m_1y_1 + m_2y_2)[Y] + (m_1z_1 + m_2z_2)[Z]$$

$$\text{令 } M = (m_1x_1 + m_2x_2) + (m_1y_1 + m_2y_2) + (m_1z_1 + m_2z_2) = m_1(x_1 + y_1 + z_1) + m_2(x_2 + y_2 + z_2)$$

因为 $x_1 + y_1 + z_1$ 和 $x_2 + y_2 + z_2$ 是色度坐标之和,值为1,所以 $M = m_1 + m_2$ (2)

$$\text{又因为 } \frac{X_1 + Y_1 + Z_1}{X_2 + Y_2 + Z_2} = \frac{m_1(x_1 + y_1 + z_1)}{m_2(x_2 + y_2 + z_2)} = \frac{k_1}{k_2}, \text{ 得}$$

$$m_1 = \frac{k_1}{k_2} m_2 \quad (3)$$

(3)式代入(2)式得 $M = \frac{k_1}{k_2} m_2 + m_2$, 则混合色的色度坐标为:

$$x = \frac{m_1x_1 + m_2x_2}{M} = \frac{\frac{k_1}{k_2} m_2x_1 + m_2x_2}{\frac{k_1}{k_2} m_2 + m_2} = \frac{\frac{k_1}{k_2} x_1 + x_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1},$$

$$y = \frac{\frac{k_1}{k_2} y_1 + y_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1}, z = \frac{\frac{k_1}{k_2} z_1 + z_2}{\frac{k_1}{k_2} + 1}.$$

容易求得 C_1, C_2 在混合色 C_{1+2} 中所占的比例分别为:

$$\frac{k_1}{k_1 + k_2} \text{ 和 } \frac{k_2}{k_1 + k_2}. \text{ 人为控制 } k_1, k_2 \text{ 的取值以改变组成色所占比例,}$$

达到预计算混合色的目的。实际计算中, k_1 或 k_2 为0表示混合色由一种组成色形成。

3 两种颜色分解方法在免疫荧光图像分析中的应用

典型的免疫荧光图像如图2所示,在其颜色分析中,组成

色是指荧光素在特定激发光源激发下所发荧光的颜色。同一细胞区域存在许多由不同荧光颜色混合形成的相近颜色,为获得整体颜色信息而不局限于细节,用代表颜色表示这种颜色相近而不相同的特点,代表颜色也即是待分解的混合色。为应用两种颜色分解方法,需知荧光颜色色度坐标和代表颜色色度坐标。因为颜色分解在 CIE XYZ 色度系统中进行,而通常的彩色图像用 RGB 颜色空间表达颜色信息,因此需要 RGB 到 CIE XYZ 颜色空间的转换。

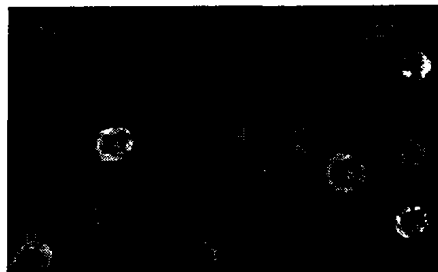


图2 彩色免疫荧光图像

3.1 颜色空间的转换公式

有多种公式可以实现 RGB 颜色空间到 XYZ 颜色空间的转换,本文采用文[4]中的公式:

$$R' = \left(\frac{R}{255}\right)^{1.4}, G' = \left(\frac{G}{255}\right)^{1.4}, B' = \left(\frac{B}{255}\right)^{1.4},$$

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = 100 * \begin{bmatrix} 0.404 * R' + 0.325 * G' + 0.265 * B' \\ 0.234 * R' + 0.656 * G' + 0.110 * B' \\ 0.048 * R' + 0.128 * G' + 1.279 * B' \end{bmatrix}$$

3.2 荧光颜色色度坐标的获取

荧光颜色色度坐标可以通过物理实验取得,但需要专用的测量仪器和比较复杂的计算。本文使用一种简便的方法:用某种荧光素对细胞涂片免疫荧光染色,采集染色后形成的彩色图像;该荧光素在激发光源激发下所发荧光的颜色以图像前景区域颜色形式记录下来,因此只需计算前景荧光区域颜色的色度坐标就可以得到荧光颜色色度坐标。此方法避免了物理实验和复杂的计算。

3.3 细胞代表颜色色度坐标的计算

免疫荧光图像中细胞和荧光区域并不一一对应,因此先计算区域的代表颜色,然后取区域代表颜色或同一细胞不同区域的代表颜色算术平均值作为细胞代表颜色。计算荧光区域的代表颜色首先需从图像背景中提取区域,保存区域中每个像素点的颜色值,然后按一定的方法计算代表颜色。用一种颜色代表整个区域所有像素点的颜色会丢失部分颜色信息,需要找出恰当的计算方法把丢失的信息控制在可以接受的范围之内。评判计算代表颜色方法的好坏,在本文中主要看用代表颜色处理后的图像和原始图像视觉上颜色是否近似相同。代表颜色可以用区域中出现次数最多的颜色表示,也可以把区域中所有像素点颜色值相加除以像素点个数得到的平均值作为代表颜色。实验表明用平均颜色处理后的图像(图3)和原始图像(图2)人眼颜色感觉相近,故本文采用平均颜色方法计算荧光区域代表颜色。

4 实验

使用 VC6.0 实现了本文提出的两种颜色分解方法,编写的程序以三种组成色混合为基础,但实验图像(图2)颜色仅由两种荧光颜色混合形成,因此表1的组成色3在混合色中所占比例为0。组成色1为绿色,是异硫氰酸荧光素受激发后形成的

荧光颜色;组成色2为橙红色,是藻红蛋白荧光素受激发后形成的荧光颜色。

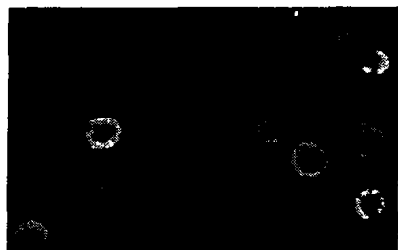


图3 图2的平均颜色图像

4.1 实验数据与数据分析

对比图2细胞区域颜色和表1右半部数据以检验基于预计

算和离散化的颜色分解方法正确与否。图2标号1、2、4、6、7、9、12处呈橙红色,表1中记录1、2、4、6、7、9、12的分色数据都为:绿色0.038462,橙红色0.961538;橙红色占绝对优势,分色数据和细胞区域颜色相符。图2标号3、5、10、11处绿中带黄,表1中记录3、5、10、11的分色数据分别为:0.781250,0.218750;0.833333,0.166667;0.714286,0.285714;0.806452,0.193548;绿色占主导地位,橙红色也占一定比例,正是这些橙红色使得细胞区域绿中带黄(绿色和红色混合产生黄色),分色数据和细胞区域颜色相符。图2标号8处的分色数据:绿色0.862069,橙红色0.137931;区域在视觉上为绿色,但放大后可以看到些许黄色,说明掺进少量橙红色。以上分析表明颜色分解数据与细胞区域视觉颜色一致。

表1 两种颜色分解方法得到的分色数据

编号	色度图中的颜色分解			基于预计算和离散化的颜色分解		
	组成色1(绿色)	组成色2(橙红色)	组成色3	组成色1(绿色)	组成色2(橙红色)	组成色3
1	0.076765	0.923235	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
2	0.028737	0.971263	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
3	0.749838	0.250162	0.000000	0.781250	0.218750	0.000000
4	0.047993	0.952007	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
5	0.820869	0.179131	0.000000	0.833333	0.166667	0.000000
6	0.010691	0.989309	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
7	0.036418	0.963582	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
8	0.648792	0.351208	0.000000	0.862069	0.137931	0.000000
9	0.116495	0.883505	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000
10	0.679077	0.320923	0.000000	0.714286	0.285714	0.000000
11	0.787002	0.212998	0.000000	0.806452	0.193548	0.000000
12	0.020802	0.979198	0.000000	0.038462	0.961538	0.000000

4.2 两种方法的数据对比及结论

对比两种方法的数据,除细胞8和9的数据外其他分色数据相近。细胞8的色度图中颜色分解方法数据:绿色0.648792,橙红色0.351208,基于预计算和离散化方法的数据:绿色0.862069,橙红色0.137931;原始图像中细胞8的视觉颜色为绿色,放大之后略带黄色;色度图中颜色分解方法数据与视觉颜色有较大差异,而基于预计算和离散化方法的数据与视觉颜色较为接近。细胞9的色度图中颜色分解方法数据:绿色0.116495,橙红色0.883505,基于预计算和离散化方法的数据:绿色0.038462,橙红色0.961538;原始图像中细胞9的视觉颜色为橙红色;色度图中颜色分解方法数据与视觉颜色有一定差异;基于预计算和离散化方法的数据绿色仅为0.038462,可认为是分解精度不足所致,数据与视觉颜色一致。总体上,两种颜色分解方法都可用,但基于预计算和离散化的方法更为准确,离散化的程度越高,分解数据会越精确。

结束语 本文提出了两种颜色分解方法并将其应用于免疫荧光图像的颜色分析。色度图中的颜色分解方法主要利用

色度坐标之间的线段距离求得组成色在混合色中所占比例;而基于预计算和离散化的颜色分解方法将连续的颜色空间转化为离散的颜色点集合,预先混合组成色并存储,然后匹配待分解颜色和已存储混合色达到分解颜色目的。在分解免疫荧光图像区域代表颜色的基础上,比较两种颜色分解方法,基于预计算和离散化的方法更为精确。目前提出的方法仅考虑到三种组成色,对于更多种颜色的混合需进一步研究。

参考文献

- 1 汤顺清主编.色度学.北京:北京理工大学出版社,1990
- 2 Duca V D, Dixon L, Maltoni F. New color decompositions for gauge amplitudes at tree and loop level. Nuclear Physics B, 2000, 571: 51~70
- 3 Duca V D, Frizzo A, Maltoni F. Factorization of tree QCD amplitudes in the high-energy limit and in the collinear limit. Nuclear Physics B, 2000, 568: 211~262
- 4 任智斌,隋永新,杨英慧,杨怀江.在均匀颜色空间中实现彩色图像的颜色量化.光学精密工程,2002,10(4):340~345