

黄连类中药组织显微定量图像模式识别[△]

第二军医大学药学院(上海 200433)
四川省中药研究所

肖小河* 乔传卓 苏中武
舒光明 夏文娟 李隆云

摘 要 运用计算机图像定量分析系统测定了不同品种、不同产地、不同部位的黄连类中药组织细胞 10 余个体视学参数,并结合数值分类方法,建立了其显微鉴定模式识别系统,为中药混乱品种与多源地药材鉴定提供了新的三维定量研究技术和资料。

关键词 黄连 组织形态 体视学 图像分析 模式识别 鉴定

随着计算机技术的发展及其在生物医学中的应用,中药组织形态学研究开始向三维和定量方向发展,同时使中药鉴定更加客观、全面和准确^[1]。近年来笔者将基于体视学和计算机图像测试技术的图像定量分析以及基于图形生成理论和计算机图形学的三维重建与显示技术用于中药混乱品种鉴定和多源道

地药材形性识别及其与质量的相关性研究,取得较满意的结果。现将黄连类中药显微图像定量分析与分类鉴定研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料:22 份供试材料为笔者历年来于黄连类各道地药材生产区采集的对口药材样品,名称和来源见表 1。

表 1 用于图像定量分析的黄连类中药

编号	名 称	采集时间、产地	切片材料部位
1	味连(南岸连) <i>Coptis chinensis</i>	重庆石柱县,1963	鸡爪头部
2	味连(南岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆石柱县,1963	鸡爪中部
3	味连(南岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆石柱县,1963	鸡爪尾部
4	味连(南岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆石柱县,1963	过桥
5	味连(南岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆石柱县,1972	鸡爪中部
6	味连(南岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆石柱县,1995	鸡爪中部
7	味连(北岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆巫山,1963	鸡爪中部
8	味连(北岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆巫山,1972	鸡爪中部
9	味连(北岸连) <i>C. chinensis</i>	重庆巫山,1995	鸡爪中部
10	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1963	主根茎中部
11	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1972	主根茎中部
12	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1963	单枝(幼小)中部
13	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1963	主根茎头部
14	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1995	主根茎中部
15	峨眉野连 <i>C. omeiensis</i>	四川峨眉山,1963	主根茎尾部
16	云 连 <i>C. teetoides</i>	云南贡山,1996	根茎中部
17	云 连 <i>C. teetoides</i>	云南贡山,1996	根茎中部
18	云 连 <i>C. teetoides</i>	云南中甸,1995	根茎中部
19	雅 连 <i>C. deltoidea</i>	四川洪雅,1963	根茎中部
20	雅 连 <i>C. deltoidea</i>	四川洪雅,1995	根茎中部
21	雅 连 <i>C. deltoidea</i>	四川洪雅,1963	根茎头部
22	雅 连 <i>C. teetoides</i>	四川洪雅,1963	根茎尾部

* Address: Xiao Xiaohe, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai
[△] 国家自然科学基金项目

根据常规方法,将上述 22 份材料分别制成石蜡切片。其中每份材料选取 3 支~5 支典型药材,每支药材选取 3 张~5 张有效切片,每张切片对各观测组织选取 5 个~10 个视野。木质部由内到外 3 等份分别观测。

以上凭证标本和切片存于四川省中药研究所标本馆。

1.2 仪器和方法:体视学参数测量采用 Mas—Ⅱ 图像定量分析系统(重庆大学研制,1996 年 version 2.0。原作金相分析用,根据中药组织形态学特点和要求,我们进行了部分改动)。基本步骤是:1)图像采集,将切片置于配有 CCD 摄像机的显微镜下观察采样,部分材料切片效果欠佳时,则显微描绘作图后

直接以 CCD 摄像机采样;2)图像预处理,包括编辑、轮廓修饰、灰度变换、逻辑运算和二值化操作等,以便获得清晰完整的目标灰度图像;3)参数测定,包括统计和形态两大模块,前者设置体密度、面数密度、数密度、面密度、间距、直径、面积等参数;后者设置截面积、周长、最大直径、等效直径、长宽比、圆形度、球化度等参数,各参数的定义和算法详见文献^[2];4)数据倍数转换,求出目标实际大小和密度值。结果见表 2(下页)。表 2 中,各组织的体视学参数值均为所观测切片和视野的平均值。

数据处理采用系统聚类分析和主成分分析作数值分类。结果见图 1、2、3 及表 3、4。

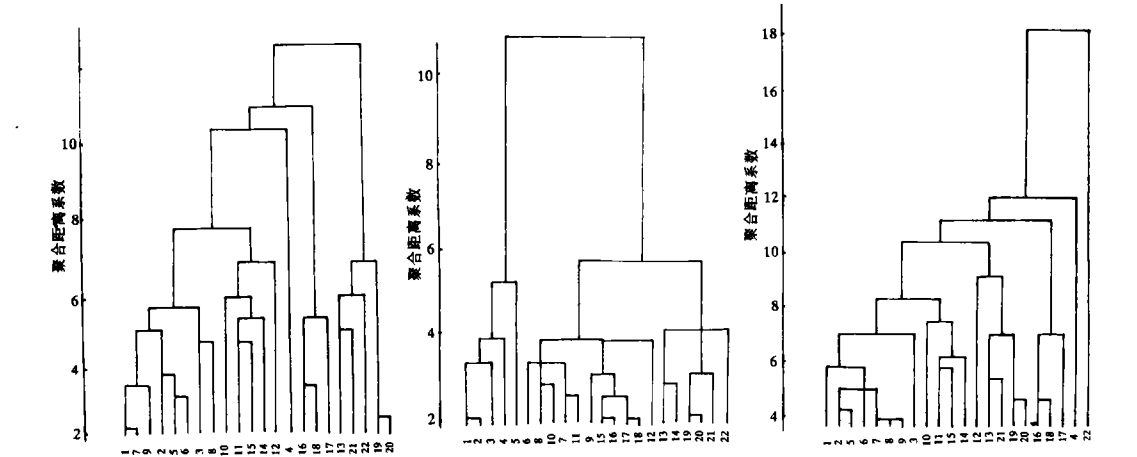


图 1 基于全部参数的聚合树状图 图 2 基于统计块参数的聚合树状图 图 3 基于形态块参数的聚合树状图

表 3 统计块参数 PCA 的特征根与信息负荷量

No.	特征根	贡献率(%)	累计贡献率(%)
1	20.8667	67.3120	67.3120
2	4.2298	13.6446	80.9565
3	1.2255	3.9531	84.9096
4	1.0715	3.4563	88.3660
5	0.8450	2.7259	91.0919
6	0.6236	2.0117	93.1035
7	0.4536	1.4632	94.5667
8	0.4004	1.2915	95.8583
9	0.2677	0.8635	96.7218

2 结果分析

黄连类中药来源比较复杂,其外观形状、组织形态和化学成分均十分相似,本文的基

于黄连类中药显微图像定量分析的模式识别可为其提供客观而全面的准确可重现的分类鉴定手段。

表 4 形态块参数 PCA 的特征根与信息负荷量

No.	特征根	贡献率(%)	累计贡献率(%)
1	18.8077	32.4271	32.4271
2	9.2281	15.9105	48.3376
3	8.8304	15.2249	63.5625
4	5.9095	10.1888	73.7514
5	4.3845	7.5596	81.3109
6	2.8970	4.9948	86.3057
7	1.6295	2.8094	89.1152
8	1.3710	2.3638	91.4790
9	1.0890	1.8776	93.3566

表 2 黄连类中药组织细胞体视形态学参数测定值[△]

项 目		样 品 序 号																					
体视参数	组织细胞	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
体密度 (%)	皮层薄壁细胞	90	90	90	87	86	88	92	88	91	85	89	90	88	87	90	90	88	94	96	95	92	90
	木质部中层	71	61	66	59	58	60	71	72	68	71	65	69	72	67	64	72	69	61	77	76	74	73
	木质部内侧	65	63	68	66	61	60	63	67	66	70	66	70	76	76	68	63	68	64	62	71	70	72
	木栓细胞	87	87	80	83	86	87	87	83	85	88	86	83	90	84	84	85	84	81	89	88	86	86
面数密度 (个/mm ²)	木质部内侧	4253	5397	6091	5531	6321	5666	3543	5389	4662	5434	6739	4702	3958	4622	5428	5630	5971	5400	2384	2541	2562	3562
	木质部中层	3396	4071	3598	5917	4870	4405	3292	3317	5408	4015	4905	2701	2162	2849	3806	4409	4501	5269	1978	1733	1776	2710
	木质部外侧	4202	4492	3443	4046	4806	5126	4490	5092	4716	4775	4803	3399	1894	2896	4106	4922	4615	4969	2804	2720	2505	2241
	木栓细胞	797	846	1248	1131	911	940	725	1063	397	678	903	1270	635	943	1126	890	910	1086	665	880	670	643
数密度 (个/mm ²)	皮层薄壁细胞	588	515	653	826	812	647	666	873	585	826	567	605	595	625	464	461	484	360	495	494	425	514
	皮层薄壁细胞	13977	12219	14835	21105	12789	16250	18103	24182	12342	21382	13677	14406	15092	19037	10762	9647	10317	9074	11291	10850	7889	10091
	髓部石细胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	74	82	75	78	87	78	0	0	0	80	77	113	116
	皮层石细胞	108	113	75	68	99	85	89	84	96	86	95	82	92	104	108	112	95	110	84	83	99	89
平均直径(μm)	木栓细胞	86	73	63	45	66	73	77	64	76	61	72	58	78	61	72	73	72	72	70	68	86	80
	髓部石细胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	66	61	62	72	64	0	0	0	69	63	82	88
	中柱鞘纤维	75	82	105	53	90	81	83	88	76	87	80	101	87	83	81	0	0	0	83	82	105	103
	髓部石细胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61	0.62	0.65	0.60	0.61	0.64	0	0	0	0.66	0.63	0.75	0.61
平均圆球度	中柱鞘纤维	0.63	0.61	0.57	0.66	0.60	0.60	0.57	0.54	0.60	0.49	0.54	0.55	0.51	0.55	0.53	0	0	0	0.59	0.57	0.61	0.60
	皮层石细胞	1.40	1.41	1.34	0	1.42	1.30	1.38	1.36	1.33	1.43	1.54	1.21	1.49	1.68	1.81	0	0	0	1.35	1.41	1.53	1.38
	髓部石细胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27	0.20	0.10	0.14	0.28	0.23	0	0	0	0.30	0.29	0.33	0.35

△限于篇幅,表中仅列20个对分类和鉴定影响最大的组织细胞体视形态学参数值

2.1 系统聚类分析

图1为基于全部89个细胞形态体视学参数的22个黄连材料的聚合树状图。可见,组织显微定量图像模式识别能很好地区分不同种类的黄连。不同产地和不同采收年份的同种黄连组织细胞体视学形态具有很大的相似性和重现性,不同种类黄连之间差异较大,具有明显的间断性。味连为四川(今重庆)著名道地药材,曾有北岸连(长江以北之巫山县等)和南岸连(长江以南之石柱县)之分,并云二者药材外观和质量有明显差异^[3],但据我们产地调查和组织显微定量图像分析,二者难有区别。

图1还提示,不同部位和不同生长发育阶段黄连的组织显微定量图像分析结果差异明确,有时甚至超过种类所致差异,如南岸连之桥杆、野连之幼小根茎和雅连之根茎尾部等,不同部位之间定量图像参数值常呈一定的递变规律。调查还发现,野连幼小根茎常单枝,但老根茎有分枝,并多少鸡爪状,这与文献报道不尽一致^[4]。因此,中药显微鉴定时,取样部位十分重要,应具有代表性和可比性。

图2和图3分别是基于前31个“统计块”参数和后58个“形态块”参数的聚合树状图。可见,图3与图1的聚类结果具有很大的相似性,即大小和形态因子两大类体视学参数在显微定量图像模式识别中起主导作用;图2与图1的聚类结果差异较大,说明密度类体视学参数在其模式识别中比重较小。

2.2 主成分分析(PCA):“统计块”和“形态块”参数PCA的特征根和信息负荷量分别见表3、4。“统计块”参数前2个主成分和“形态块”参数前4个主成分都占其总信息量的70%以上,说明二者分类排序因子选取比较合理,并可有效地将其从31维和58维排序空间降低到低维空间。而其信息损失量很小。根据信息损失最小性、相关回归最优性和变异公差最优性原则^[5],综合考察前2个主成分对31个“统计块”参数和前4个主成分对58个“形态块”参数的影响,分别筛选出10

个对分类与排序最有影响的组织体视学参数,它们是:1)统计块参数:木质部内层细胞面数密度,木质部中层细胞体密度和面数密度,木质部外层细胞体密度和面数密度,木栓细胞体密度和面数密度,皮层薄壁细胞体密度、面数密度和数密度。说明体密度和面数密度在其统计块定量图像模式识别中起决定性作用。2)形态块参数:髓部石细胞平均最大直径、平均直径、平均截面圆形度和腔壁面积比,皮层石细胞平均最大直径、平均截面长宽比和平均截面圆形度,中柱鞘纤维平均周长和平均截面圆球度,木栓细胞平均最大直径。可见,石细胞和中柱鞘纤维的大小、形态、增厚及分布情况等对其定量图像模式识别起主导作用,并与黄连类中药显微图像定性鉴别之特征组织细胞选取十分吻合。

限于篇幅,22个材料的上述20个重要组织细胞形态体视学参值排序略去,详见表2。

3 讨论

近缘品种是造成中药品种混乱和质量不稳定的重要根源之一,它们彼此之间外观形状、组织形态和化学成分往往基本一致,很少有可资相互鉴别明显的特征组织或识别标识化学成分。本文运用体视学原理和计算机图像测试技术,从大小、密度和形态因子3大类参数全方位多目标地综合刻划中药显微图像的体视形态,在此基础上结合数值分类,从零散而浩繁的实测数据中归纳出其分类鉴定特征和规律,建立其显微定量图像模式识别系统,从而为近缘品种和混淆品种中药鉴别提供了比较得心应手的分析手段,同时有助于组织形态学研究向三维和定量化方向发展,有助于中药鉴定人工智能化。

组织显微定量图像模式识别对中药品质评价、植物生态解剖和发育解剖研究亦有重要的借鉴意义。如中药化学成分与组织细胞形态体视学参数的相关分析,植物组织细胞形态体视学参数与生态环境和生长发育的相关分析等,以后另将报道。

要获得满意的显微定量图像分析结果, 取样数目应具有代表性。笔者以双流产黄丝郁金作抽样误差与各级样本大小分析, 结果说明本实验取样方法和数目合理, 具有统计学意义, 与有关文献报道相吻合^[2]。此外, 显微切片的质量亦是十分重要的, 要求细胞轮廓不支离破碎、胞腔内无异质污染, 不同切片的色泽和背景应基本一致。今后可考虑计算机层析技术(即 C T)用于获取中药组织断层图像并放大, 则可免去切片制样的浩繁工作。

参 考 文 献

- 1 肖小河, 等. 药学学报, 1997; 32(6): 461
- 2 郑富盛. 细胞形态立体计量学. 北京: 北医大一协和医大出版社, 1991: 6
- 3 四川省中药研究所. 四川中药志. 二册. 成都: 四川人民出版社, 1960: 1718
- 4 徐国钧, 等. 常用中药材品种整理与质量研究. 一册. 福州: 福建科技出版社, 1994: 503
- 5 王松桂, 等. 科学通报, 1984; 29(8): 449

(1997-10-19 收稿)

A Pattern Recognition on the Histological Images of Rhizoma Coptidis

Xiao Xiaohu, Qiao Quanzhuo, Su Zhongwu (College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Shu Guangming, Xia Wenjuan, Li Longyun, *et al* (Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 630065)

Abstract By computer image analysis system, the related stereological parameters of tissues and cells of 22 samples of Rhizoma Coptidis in China were measured. And combining with numerical taxonomy, the pattern recognition system on their histological images was built. These results provided some new techniques and information in three — dimension and quantification for the authentication on the confused varieties of TCD and polytypic indigenous TCD.

Key words Rhizoma Coptidis Histological morphology Stereology Image analysis Pattern Recognition Identification.

甘草种子萌发初期的酯酶与蛋白质研究

中国医学科学院 药用植物研究所(北京 100094) 高文远* 李志亮 肖培根
中国协和医科大学

摘 要 用电泳和分光光度法对甘草种子萌发初期的酯酶和可溶性蛋白质进行了研究。结果表明, 萌发后 48 h 左右, 酯酶同工酶和可溶性蛋白质的电泳谱带数量较多, 颜色较深, 且可溶性蛋白质的含量较高。这说明 48 h 前后是甘草种子萌发的代谢关键时期。

关键词 甘草 种子 萌发 酯酶 蛋白质

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 为豆科多年生草本药用植物, 其根和根茎有补脾益气、清热解毒、止咳祛痰、缓急定痛、调和诸

药的功能, 是最常用中药之一。甘草在药品、食品工业及轻工业方面的需求量越来越大。本文对甘草种子萌发初期的酯酶与蛋白质进

* Address: Gao Wenyuan, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

高文远 男, 1989 年毕业于吉林农业大学药用植物专业, 同年考入中国协和医科大学, 1994 年取得生药学博士学位。1996 年晋升为副研究员, 现在韩国忠北大学做博士后。研究方向为药用植物的生理生化, 分子生物学, 空间环境对植物的影响以及植物的组织培养和生物技术, 获国家自然科学基金资助项目 1 项, 近年来在国内知名刊物上发表论文 30 余篇。