

DOI: 10.13382/j.jemi.B2105028

相差细胞图像的光照均衡与分割计数方法研究*

张杰¹ 施露露² 史振志¹ 闻路红¹ 庞吉宏¹

(1. 宁波大学高等技术研究院 宁波 315211; 2. 中国科学院上海技术物理研究所 上海 200083)

摘要:为了解决相差显微细胞图像的光照不均匀,实现准确、快速的细胞图像分割与计数,本文提出了一种图像光照均衡,并结合双阈值分割计数的方法。该方法对图像进行分块,依据子块与整幅图像平均灰度的比值进行亮度调节,并采用高斯函数权重优化比值,消除因图像分块而产生的“方块效应”,并通过图像熵与高斯函数标准差关系曲线确定了最优的标准差;使用双阈值方法分割修复后的图像,结合空洞填充与面积约束优化分割后的细胞形态。利用 C2C12 相差显微细胞图像数据集测试该算法,其中高细胞密度图像的分割精确率、召回率和 F 值分别为 0.966 2、0.967 8 和 0.967 0,明显优于其他对比方法。实验结果表明,该方法在处理不同细胞密度的光照不均匀相差细胞图像时,均能实现光照均衡,且图像信息损失较小,分割计数结果准确。

关键词: 相差显微细胞图像;光照均衡;双阈值分割;图像分块

中图分类号: TN98;TP391.4 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 520.6

Study of light equalization and segmentation counting method for cell phase contrast images

Zhang Jie¹ Shi Lulu² Shi Zhenzhi¹ Wen Luhong¹ Pang Jihong¹

(1. The Research Institute of Advanced Technologies, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Shanghai Institute of Technical Physics Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200083, China)

Abstract: In order to solve the uneven illumination of phase contrast microscopic cell images, achieving the goals of accurate and fast cell image segmentation and automatic counting, this paper proposes a method of image illumination equalization combined with double threshold segmentation and counting. The method chunks the image, adjusts the brightness based on the ratio of sub-blocks to the average gray level of the whole image, and optimizes the ratio by using Gaussian function weights to eliminate the “square effect” caused by image chunks, and determines the optimal standard deviation by the relationship curve between image entropy and Gaussian function standard deviation. The images were segmented using a double-threshold method to optimize the morphology of the restored cells by combining cavity filling and area constraints. The algorithm was tested using the C2C12 phase-difference microscopic cell image dataset, in which the segmentation accuracy, recall and F -value of the high cell density images were 0.966 2, 0.967 8 and 0.967 0, respectively, which were significantly better than other comparative methods. The results showed that the method could achieve light equalization when processing the light inhomogeneous phase contrast cell images of different cell densities, with less image information loss, high-accuracy cell-segmentation and counting results.

Keywords: phase contrast microscopic cell images; light balance; double threshold segmentation; image block

0 引言

细胞一直是生物学和医学等领域研究的核心内容,

研究方向众多,其中细胞数目的统计分析是研究细胞过程中必不可少的重要指标之一^[1]。细胞计数在临床医学领域和生物医学领域发挥着重要作用,例如医生常通过血液中的红细胞、白细胞以及血小板的数目来判断病人

是否患有某种疾病;在药物的治疗过程中,可通过某种特定细胞的数量变化,判断用药种类、用药剂量的准确性^[2-3]。然而,传统的人工细胞计数已经无法处理越来越多的生物细胞图像,且结果受研究人员专业水平的限制,无法保证图像数据分析的客观性;而基于细胞计数仪等设备的细胞计数则存在着侵入性的缺点,影响细胞生长,增加污染的风险。因此,随着计算机技术的飞速发展,运用数字图像处理技术来处理细胞图像已经成为大趋势^[4]。

基于相差显微镜的活细胞成像,可以允许观察细胞生理过程,同时避免了荧光剂对细胞活性的损害^[5-6]。然而在相差显微细胞图像的采集过程中,由于拍摄时间长、背景环境的不确定性以及拍摄相机本身等原因,常常会导致采集到的图像光照不均匀,同时存在着低对比度、光晕伪影等特性,因此传统的图像分割方法无法对其进行准确分割。为了解决这些问题,许多学者提出了多种优化的细胞分割方法。Jaccard 等^[7]提出了计算局部对比度来检测细胞区域的方法,并结合局部对比度阈值分割和光晕伪影的校正实现了细胞图像的快速分割,但该方法在处理高密度细胞图像时存在着严重的欠分割;Flight 等^[8]使用不同尺寸的均值滤波器过滤同一副图像,将两者相减后得到的图像消除了光照不均、对比度低等影响,可直接用简单的阈值分割得到结果;Vicar 等^[9]提出了一种先对细胞图像进行顶帽变换以消除光照不均再阈值分割的方法,以上这些方法虽能平衡图像的不均匀光照,但处理后图像细节损失较多。也有学者从图像复原的角度出发,Yin 等^[10]根据相差显微镜的成像原理建立了线性成像模型,利用稀疏约束正则化函数来对图像进行复原,获得了光照均匀、无光晕的高质量图像,然后再对复原后的图像使用阈值分割,但是该方法计算复杂。近年来,深度学习也逐步运用于细胞图像分割,Ronneberger 等^[11]提出了 U-NET 模型,将反卷积层和特征层进行拼接以弥补信息损失,但由于梯度消失的原因,因此构建的网络深度有限;张文秀等^[12]在此基础上又通过引入残差块模型强化特征传播能力和注意力机制来加强细胞区域的权重。这些深度学习的方法都需要手工制作大量的训练集,且由于类似的相差显微细胞图像样本较少,易导致模型训练不充分,因此并不适用于对细胞图像进行大规模的快速分析。

综上所述,阈值分割方法仍是细胞分割计数最简单快速和有效的方法^[13-14],但是相差显微细胞图像的光照不均匀特性会改变图像的部分属性,从而会使分割阈值发生偏移,无法实现准确有效地图像分割与细胞计数^[15]。针对光照不均匀相差显微细胞图像的快速、准确分割与计数问题,本文提出了一种基于分块调整实现图像光照均衡结合双阈值分割^[16]的方法,并利用高斯函数

权值对比值矩阵进行优化,解决了因图像分块而导致的“方块效应”,实现了图像的光照均衡修复与准确的细胞分割、细胞计数。

1 相差显微细胞图像分割

1.1 相差显微细胞图像光照不均匀验证

相差显微镜在拍摄细胞时由于外界因素的干扰或自身原因,会导致所拍摄的细胞图像呈现光照分布不均匀的情况。为了更少受到细胞的干扰,本文选取了培养前期细胞较少的图像作为展示,具体图像如图 1 所示。其中原图为相差显微镜拍摄下的小鼠成肌干细胞图像,如图 1(a)所示;从颜色映射图可以清晰地看出,细胞图像呈现“左边小部分颜色深,右边大部分颜色浅”的不均匀光照,如图 1(b)所示;原图中水平实线对应的灰度分布曲线也反映出图像从左到右的灰度值总体上呈现上升趋势,如图 1(c)所示。通过分析可知,C2C12 相差显微细胞数据集中的图像均存在光照不均匀问题,呈现“左暗右亮”的显示特点。

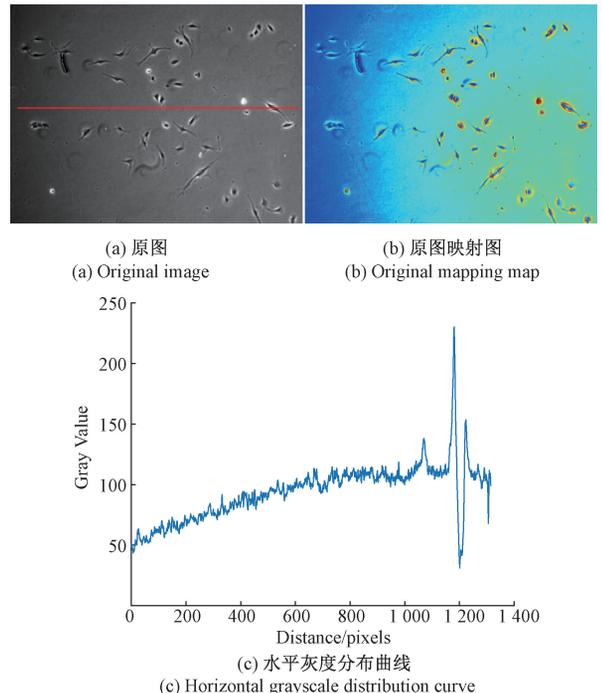


图 1 图像光照不均匀验证

Fig. 1 Image light unevenness verification

1.2 图像光照均衡修复

光照不均匀会使图像分割时阈值偏移,从而导致误分割,因此在进行阈值分割前,应先对图像进行光照均衡修复。

本文方法先对图像进行分块,再基于子块平均灰度与整幅图像平均灰度的差异来调整每个像素的灰度值,

从而实现对整幅图像的光照均衡。一幅 $M \times N$ 的图像均匀地分为一定数量的子块, 每个子块的尺寸为 $m \times n$, 其中 $p(i, j)$ 是图像中坐标为 (i, j) 处像素点的灰度值, 则整幅图像的平均灰度 L_1 为:

$$L_1 = \frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N p(i, j)}{M \times N} \quad (1)$$

其中, 每个子块的平均灰度 L_2 为:

$$L_2 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n p(i, j)}{m \times n} \quad (2)$$

因此调整参数可用整幅图像的平均灰度与子块的平均灰度的比值 r 来表示, 即:

$$r = \frac{L_1}{L_2} \quad (3)$$

此时, r 会有 3 种结果: 当 $r < 1$ 时, 表示对应子块的平均灰度高于整幅图像的平均灰度, 应对该子块进行光照削弱处理; 当 $r = 1$ 时, 表示对应子块的平均灰度等于整幅图像的平均灰度, 无需处理; 当 $r > 1$ 时, 表示对应子块的平均灰度高于整幅图像的平均灰度, 应对该子块进行光照增强处理。整幅图像的平均灰度与每个子块的平均灰度的比值 r 构成了图像灰度调整的比值矩阵 \mathbf{R} 。若将每个子块中所有像素的灰度值直接乘以其对应的比值, 虽能平衡图像的不均匀光照, 如图 2(c) 所示, 但会因图像分块而导致出现“方块效应”, 如图 2(e) 所示, 即部分背景像素调整后灰度减小, 亮度降低, 更贴近于周围细胞像素的灰度值, 导致像素在分块边界上产生不连续现象, 进而会导致分割时将其识别为细胞像素, 导致分割错误。

为了解决这个问题, 本文提出了利用高斯函数权值来优化比值矩阵的方法。

1.3 “方块效应”消除

二维高斯函数在数字图像处理领域应用十分广泛。在图形上, 高斯函数的正态分布是一种钟形曲线, 越接近中心, 取值越大, 越远离中心, 取值越小。而在数字图像上, 所有的像素都是连续的, 越靠近的点关系越密切, 越远离的点关系越疏远。这与高斯函数的性质十分相似, 因此可以用高斯函数来优化图像分块后的调整参数矩阵, 每一个调整参数由周围所有的调整参数加权平均得到, 其中距离越近的点权重越大, 距离越远的点权重越小。具体步骤如下所示:

对于一个大小为 $(2n+1) \times (2n+1)$ 的邻域范围, 假设其中心点为 $P(i, j)$, 则该邻域内每个点对应于中心点的权重为 $w(i, j)$, 其离中心点越近, 则权重越大, 离中心点越远, 则权重越小, 权重 $w(i, j)$ 的计算公式如下:

$$w(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(i-n)^2 + (j-n)^2}{2\sigma^2}} \quad (4)$$

式中: σ 为高斯函数的标准差, σ 越大, 权重分布越均匀, 反之 σ 越小, 权重分布越偏向于邻域中心点。

然后将该邻域内的每一点进行加权平均, 即将每一个调整参数的值乘以其对应的高斯权重, 得到的加权和 $P(i, j)'$ 来代替原来的中心点 $P(i, j)$, 即:

$$P(i, j)' = \sum_{i=1}^{2n+1} \sum_{j=1}^{2n+1} w(i, j) \times P(i, j) \quad (5)$$

最后将原比值矩阵中的每一个值进行上述的加权求和后, 即可得到经过高斯函数权值优化后新的比值矩阵。用每个子块中的所有像素值乘以其对应的比值, 即可实现图像的光照均衡。

实验结果如图 2 所示, 与原图的颜色映射图(图 2(b))相比, 原比值矩阵处理结果虽能平衡图像的不均匀光照, 但会因分块调整而导致边界上的图像灰度不连续, 有明显的“方块效应”(图 2(c))。而经过高斯函数权值优化后新的比值矩阵处理结果, 不仅能平衡图像的不均匀光照, 且无明显“方块效应”现象(图 2(d))。

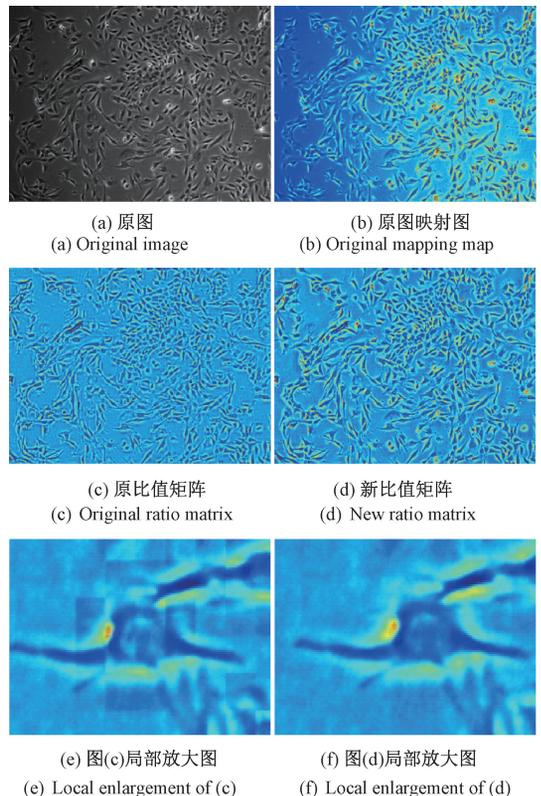


图 2 光照均衡处理结果

Fig. 2 Light equalization treatment results

1.4 确定最优标准差 σ

不同的 σ 值对光照均衡结果有影响, 在多干扰的复杂环境下, 若需要判断图像受影响程度, 可用图像熵来判断图像发生的变化。图像熵是一种特征的统计形式, 反映了图像包含的信息量的大小, 图像熵越大图像所蕴

含的信息越多,图像熵越小图像所蕴含的信息越少^[17]。为了确定最优的 σ 值,本方法通过不同的 σ 值对图像熵的影响曲线来确定。图像的一维熵表示图像中灰度分布的聚集特征所包含的信息量,用 P_i 表示图像中灰度值为 i 的像素所占的比例,则灰度图像一维熵 H 的定义如下:

$$H = - \sum_{i=0}^{255} P_i \log P_i \quad (6)$$

本文在 $\sigma = 1$ 和 $\sigma = 10$ 之间均匀地取了 20 个值,并求得在不同的 σ 值下其对应的熵值 H ,将其绘制在坐标轴上,并通过曲线拟合,得到了如图 3 所示的关系曲线。

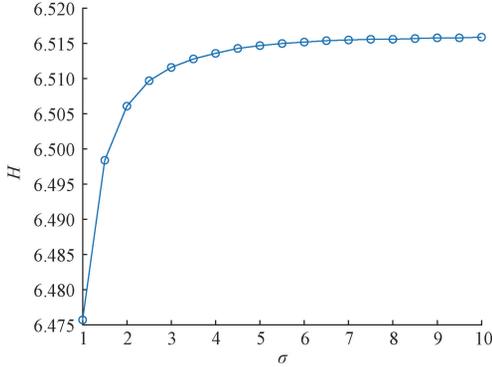


图 3 图像熵值 H 与高斯函数标准差 σ 关系曲线
Fig. 3 Image entropy value H versus Gaussian function standard deviation σ curve

从图 3 中可以看出,随着高斯函数分布标准差 σ 值的增大,图像的熵值 H 也随之逐渐增大,当 σ 值为 6 后,图像熵值 H 基本不再变化,即趋于稳定。综合考虑,本方法最终的 σ 值取为 6。

1.5 图像曝光优化与对比度提升

为了使图像的光照更准确,利用 Mertens 等^[18]提出像素的归一化像素与 0.5 的接近程度,来获得各像素对应的权重分量,实现对分块调整后图像的微调。但因相差显微细胞图像整体偏暗,0.5 并不适用,因此改用式(7)来求取每个像素对应的曝光适度评价指标,构成权重矩阵 $\mathbf{W}(i,j)$:

$$\mathbf{W}(i,j)' = \exp \left\{ \frac{[P(i,j) - A]^2}{2\sigma^2} \right\} \quad (7)$$

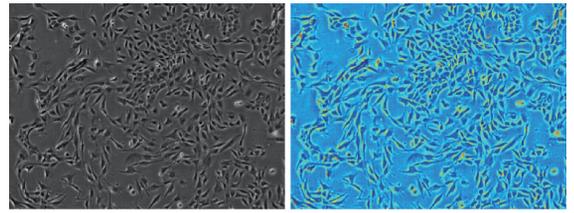
$$P(i,j)' = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N P(i,j) \times \mathbf{W}(i,j)' \quad (8)$$

式中: A 为图像平均灰度的归一化像素。

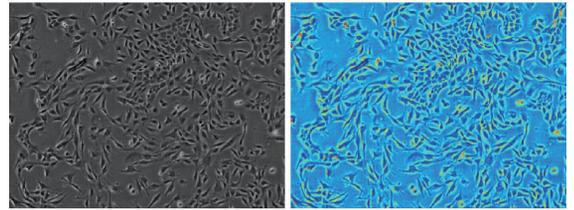
通过权值矩阵,使用式(8)更新图像的像素值,得到微调后图像,与处理前图像(图 4(a))相比,图 4(b)对应的曝光适度评价矩阵标准差由 0.008 4 降至 0.007 0,图像的光照更均匀、准确。

为了提升对比度,本文对光照均衡结果图求取梯度图,并从结果图中减去梯度图,有效地提升了细胞像素与

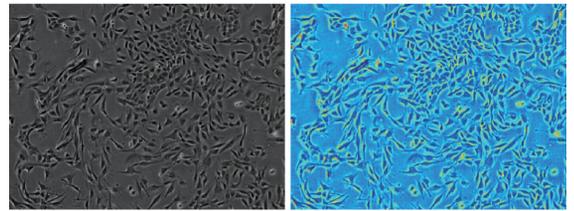
背景像素之间的对比度(图 4(c))。



(a) 微调前图像及其映射图
(a) Image before fine-tuning and its mapping map



(b) 微调后图像及其映射图
(b) Image after fine-tuning and its mapping map



(c) 对比度提升后图像及其映射图
(c) Contrast-enhanced image and its mapping

图 4 曝光优化与对比度提升结果

Fig. 4 Exposure optimization and contrast enhancement results

1.6 双阈值分割

采用双阈值方法分割光照均衡修复后的图像。整幅图像可以分为 3 类,即细胞类、背景类和光晕类。其中细胞类的灰度值最小,在视觉上呈现最黑,而光晕类的灰度值最大,在视觉上呈现最亮,背景类则处于两者之间。用式(9)求取出两个最佳阈值,使细胞、背景和光晕这 3 类之间的类间方差达到最大。

$$\sigma_B^2(k_1^*, k_2^*) = \max_{0 < k_1 < k_2 < L-1} \sigma_B^2(k_1, k_2) \quad (9)$$

其中, k_1 与 k_2 为图像灰度值, L 为图像灰度值的取值范围, σ_B^2 为类间方差,对应最大类间方差的 k_1 与 k_2 即为最佳双阈值 K_1^* 与 K_2^* 。

经过双阈值分割处理后图像分为 3 类,即:

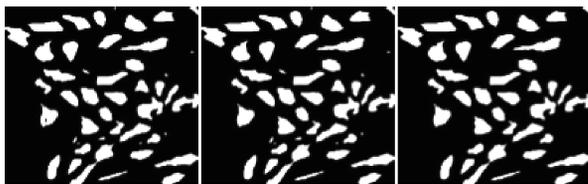
$$g(x,y) = \begin{cases} a, f(x,y) \leq k_1^* \\ b, k_1^* < f(x,y) \leq k_2^* \\ c, f(x,y) > k_2^* \end{cases} \quad (10)$$

其中, a 类的灰度值最小,为细胞类像素; b 类的灰度值居中,为背景类像素; c 类的灰度值最大,为光晕类像素。为了实现粘连细胞的准确分割,本文将分割后的光晕类和背景类的灰度值设为 0,细胞类的灰度值设为

255,实现分割后图像的二值化。

1.7 孔洞填充与面积约束

为了消除孔洞,得到完整的细胞区域,使用二值形态学闭操作对其形态进行改善,如图 5(b)所示。在细胞培养的过程中,会产生细胞碎片,且细胞的培养液、培养皿中可能会存在杂质,对细胞数目统计造成一定的影响。由于杂质一般较小,故可设置一个面积约束的阈值,将小于该阈值的杂质进行滤除。具体步骤为:1)统计阈值分割结果中所有连通区域;2)计算所有连通域的面积;3)测量数据集中典型杂质的面积大小,本文中取面积约束阈值为 70 pixel 大小;4)将小于该阈值的连通域的所有灰度值进行取反操作,实现杂质去除,如图 5(c)所示。



(a) 二值图像 (a) Binary image (b) 孔洞填充 (b) Hole filling (c) 面积约束 (c) Area constraint

图 5 孔洞填充与面积约束

Fig. 5 Hole filling and area constraints

2 实验结果与分析

2.1 实验平台与数据集

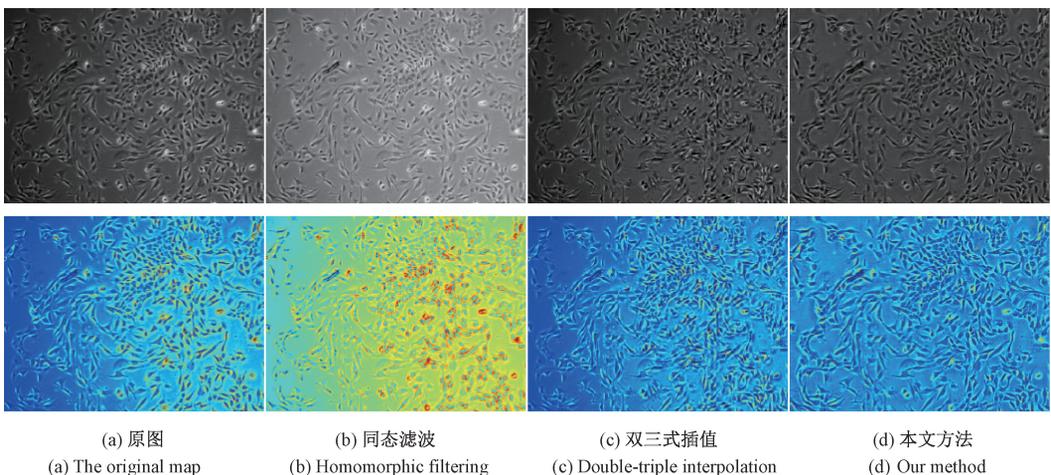
本文的实验硬件及软件环境为:Inter(R) Core(TM)

i3 6100 CPU @ 3.70 GHz,8.00 GB 内存,64 位 Win7 操作系统,采用 MATLAB R2014a 进行编程。

本文采用卡内基梅隆大学机器人实验室细胞分析组公开的 C2C12 相差显微细胞图像数据集,使用 Zeiss Axiovert T135V 显微镜进行拍摄,共 1 013 张图像,分辨率为 1 392×1 040 pixel,拍摄间隔为 5 min,总时长约 84 h,图像中每个像素对为 1.3 μm。

2.2 光照均衡结果

为了更直观地反映图像的光照情况,对图像进行了颜色映射。原始图像左边区域较暗,右边区域较亮,图像呈现出“左暗右亮”的不均匀光照,如图 6(a)所示。同态滤波^[19]是一种减少低频增加高频,从而减少光照变化并锐化边缘或细节的图像滤波方法,而在相差显微细胞图像中,细胞区域灰度变化急剧,为高频信息;背景区域灰度变化缓慢,为低频信息。因此同态滤波方法仅能对细胞区域进行提亮而不能平衡图像的不均匀光照,如图 6(b)所示。双三式插值法^[20]是通过将图像进行分块,求取局部平均灰度与全局平均灰度的差值构成亮度差值矩阵,后续通过双三式插值法将其扩充到原图大小再与原图相减,从而实现光照均衡。但因相差显微细胞图像整体偏暗,导致图像中的偏暗部分与平均灰度差值较小,经插值后无法有效地对图像的偏暗部分进行提亮,导致图像的光照均衡不彻底,如图 6(c)所示。而经过本文方法处理后的图像整体亮度相对均匀,消除了不均匀光照,如图 6(d)所示。



(a) 原图 (a) The original map (b) 同态滤波 (b) Homomorphic filtering (c) 双三式插值 (c) Double-triple interpolation (d) 本文方法 (d) Our method

图 6 光照均衡方法结果对比

Fig. 6 Comparison of results of light equalization methods

2.3 阈值分割结果

为了验证本文方法的有效性,对 C2C12 相差显微细胞数据集中共 1 013 张图像进行了分割实验,同时利用

经典双阈值方法、Jaccard 方法^[7]、Flight 方法^[8]及 Tomas 方法^[9]进行分割结果对比。从中选取 5 幅不同细胞密度的相差显微图像作为示例,如图 7 所示。

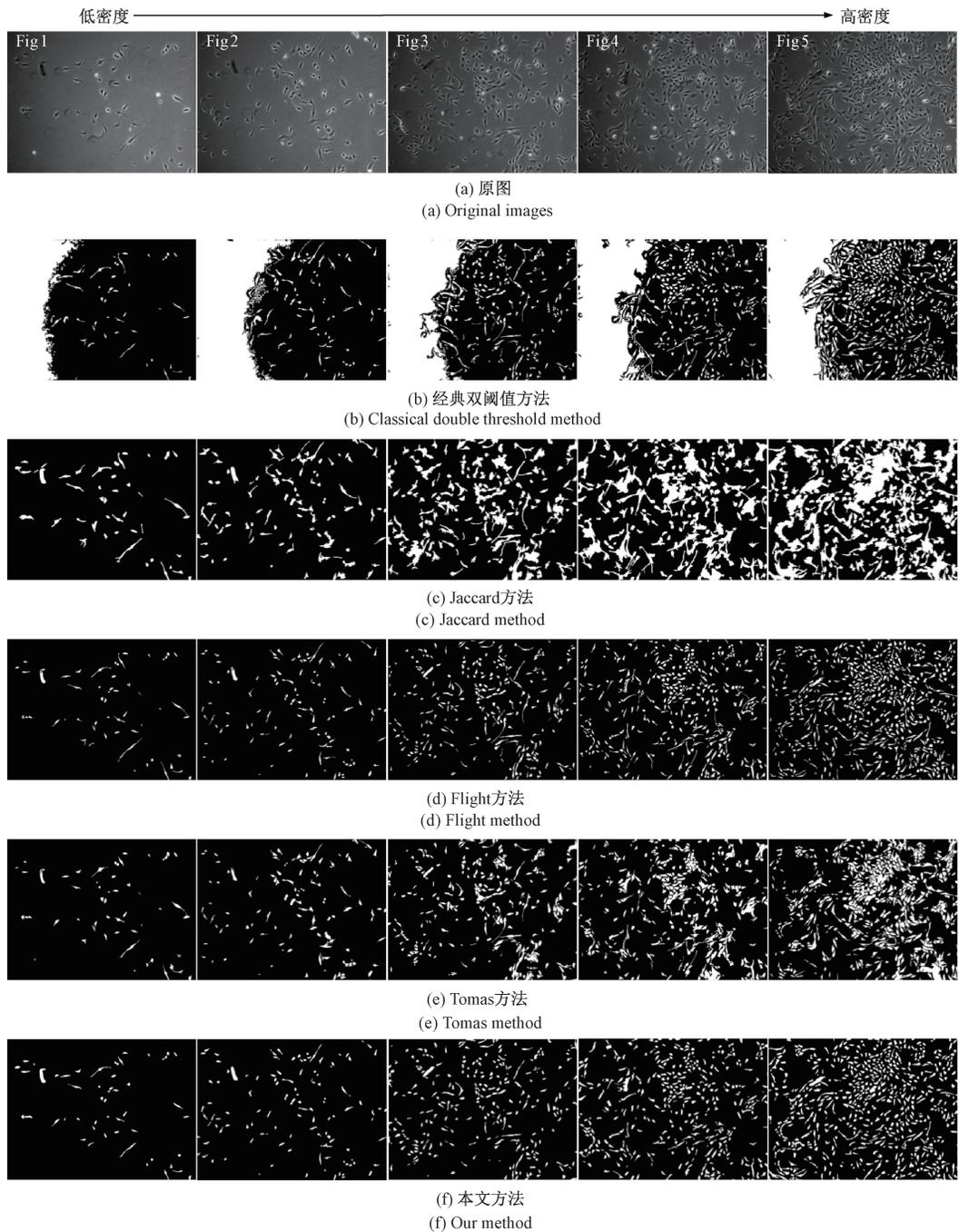


图 7 不同密度的相差显微图像的分割结果对比

Fig. 7 Comparison of segmentation results of phase contrast microscopic images with different densities

如图 7 所示,5 张相差显微细胞图像从左至右,其细胞密度依次从低到高。当使用经典双阈值方法对图像进行分割时,由于细胞图像呈现“左边暗、右边亮”的不均匀光照,因此双阈值方法会将左边偏暗的区域识别为一个整个细胞区域,导致分割错误,如图 7(b) 所示。Jaccard 方法只能大致分割出细胞区域和背景区域,但是细胞密集区域无法实现准确分割,如图 7(c) 所示。Flight 方法

对不同密度的细胞图像分割效果较好,但是分割结果的边缘会出现断裂,以及会丢失一些低对比度区域的细胞,如图 7(d) 所示。Tomas 方法存在着一定的欠分割现象,即一些细胞密集的区域无法实现完全分割,存在着部分细胞密集区域的粘连现象,如图 7(e) 所示。而利用本文的光照均衡与双阈值结合的方法对细胞粘连区域可实现准确分割,对不同密度的细胞图像分割效果最好,如图 7

(f) 所示。

2.4 细胞计数结果

通过细胞计数来对分割结果进行量化分析,并利用精确率(Precision)、召回率(Recall)和 F 值(F -score)来衡量图像分割的效果。其中精确率、召回率和 F 值的表达式为:

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (11)$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (12)$$

$$F - score = 2 \times \left(\frac{Precision \times Recall}{Precision + Recall} \right) \quad (13)$$

表 1 示例图像的细胞分割及计数结果对比

Table 1 Comparison of cell segmentation and counting results of sample images

图像	方法	GT	EN	TP	FP	FN	$Precision$	$Recall$	F -score
Fig. 1	Jaccard		45	40	5	9	0.888 9	0.816 3	0.851 1
	Flight	49	51	46	5	3	0.902 0	0.938 8	0.920 0
	Tomas		54	46	8	3	0.851 9	0.938 8	0.8932
	Ours		50	47	3	2	0.940 0	0.959 2	0.949 5
Fig. 2	Jaccard		87	81	6	31	0.931 0	0.723 2	0.814 1
	Flight	112	115	100	15	12	0.869 6	0.892 9	0.881 1
	Tomas		107	97	10	15	0.906 5	0.866 1	0.885 8
	Ours		112	101	11	11	0.901 8	0.901 8	0.901 8
Fig. 3	Jaccard		139	127	12	138	0.913 7	0.479 2	0.628 7
	Flight	265	266	243	23	22	0.913 5	0.917 0	0.915 3
	Tomas		225	204	21	61	0.906 7	0.769 8	0.832 7
	Ours		264	248	16	17	0.939 4	0.935 8	0.937 6
Fig. 4	Jaccard		135	132	3	242	0.977 8	0.352 9	0.518 7
	Flight	374	379	351	28	23	0.926 1	0.938 5	0.932 3
	Tomas		289	264	25	110	0.913 5	0.705 9	0.796 4
	Ours		373	354	19	20	0.949 1	0.946 5	0.947 8
Fig. 5	Jaccard		159	153	6	437	0.962 3	0.259 3	0.408 5
	Flight	590	599	559	40	31	0.933 2	0.947 5	0.940 3
	Tomas		414	388	26	202	0.937 2	0.657 6	0.772 9
	Ours		591	571	20	19	0.966 2	0.967 8	0.967 0

注: GT 为专家手动计数, EN 为算法自动计数。

从表 1 可知,与其他方法相比,本文方法在处理不同密度的非均匀光照相差显微细胞图像时,均有良好的分割效果。特别是,对高细胞密度图像的分割精确率、召回率和 F 值分别为 0.966 2、0.967 8 和 0.967 0,明显优于其他算法,同时从表 2 可知,本文方法运行所需的平均时间最少。因此,利用本文方法可快速对相差显微细胞图像进行精确分割与准确计数,对细胞增殖培养研究有着重要意义。

表 2 不同方法所需的平均时间对比

Table 2 Comparison of the average time required by different methods

方法	Jaccard	Flight	Tomas	Ours
时间/s	4.58	2.17	2.02	1.78

其中, TP 表示算法正确识别的细胞个数, FP 表示错误识别的细胞个数, FN 表示未被算法识别的细胞个数。精确率越高,表示细胞被误检的概率越低;召回率越高,表示细胞被漏检的概率越低; F 值是精确率和召回率的调和均值,可以衡量算法的整体性能, F 值越高,表示该算法的检测性能越好。

将图 7 中的 5 张密度不同的相差显微细胞图像按顺序依次标为 Fig1 ~ Fig5,并利用本文方法、Jaccard 方法^[7]、Flight 方法^[8]及 Tomas 方法^[9]进行分割,计算各方法分割结果对应的评价指标。双阈值分割方法因结果太差,不列入定量测量结果对比表。表 1 为剩余 4 种对比方法的测量结果,将每组中最优结果用粗体进行标出。

2.5 鲁棒性分析

本文对其他的相差显微细胞图像数据集进行了分割实验,进一步验证本文方法的鲁棒性。如图 8(a)所示,其中 a1、a2 分别为是 BAEC 细胞愈合数据集中愈合前和愈合后的图像;a3 为 C2C12P15 细胞跟踪谱系树中的一副图像;a4、a5 分别为间充质骨髓干细胞数据集中稀疏与密集的两幅图像。当使用经典双阈值方法进行分割时,其会将图像中灰度值较低的部分视为细胞从而导致分割错误,如图 8(b)所示;当使用 Jaccard 方法进行分割时,该方法会将图像中细胞密集的粘连区域视为整体,导致分割结果存在着严重的欠分割,如图 8(c)所示;当使用 Flight 方法进行分割时,虽能较好地分割出粘连细胞区域,但会遗漏较多图像中对比度较低的细胞区域,如图

8(d)所示;当使用 Tomas 方法进行分割时,分割效果较好,但仍存在部分细胞密集区域的欠分割现象,如图 8(e)所示,且分割出的细胞轮廓有着明显的锯齿感;而使用本文方法对上述的图像进行分割,对不同数据集、不同密度的细胞图像均能准确分割出密集粘连区域和低对比度区域,细胞分割效果在对比方法中最优,如图 8(f)所示。

但因阈值分割方法的局限性,本文方法在处理一部分严重分化的细胞,即细胞与背景之间的对比度极低时,无法实现准确有效的分割。又因一部分细胞在进行有丝分裂时,细胞会变圆变小,导致其细胞面积低于本文设置的面积约束阈值,从而被滤除,造成了细胞检测的遗漏,后续可通过有丝分裂检测进行结果补充。

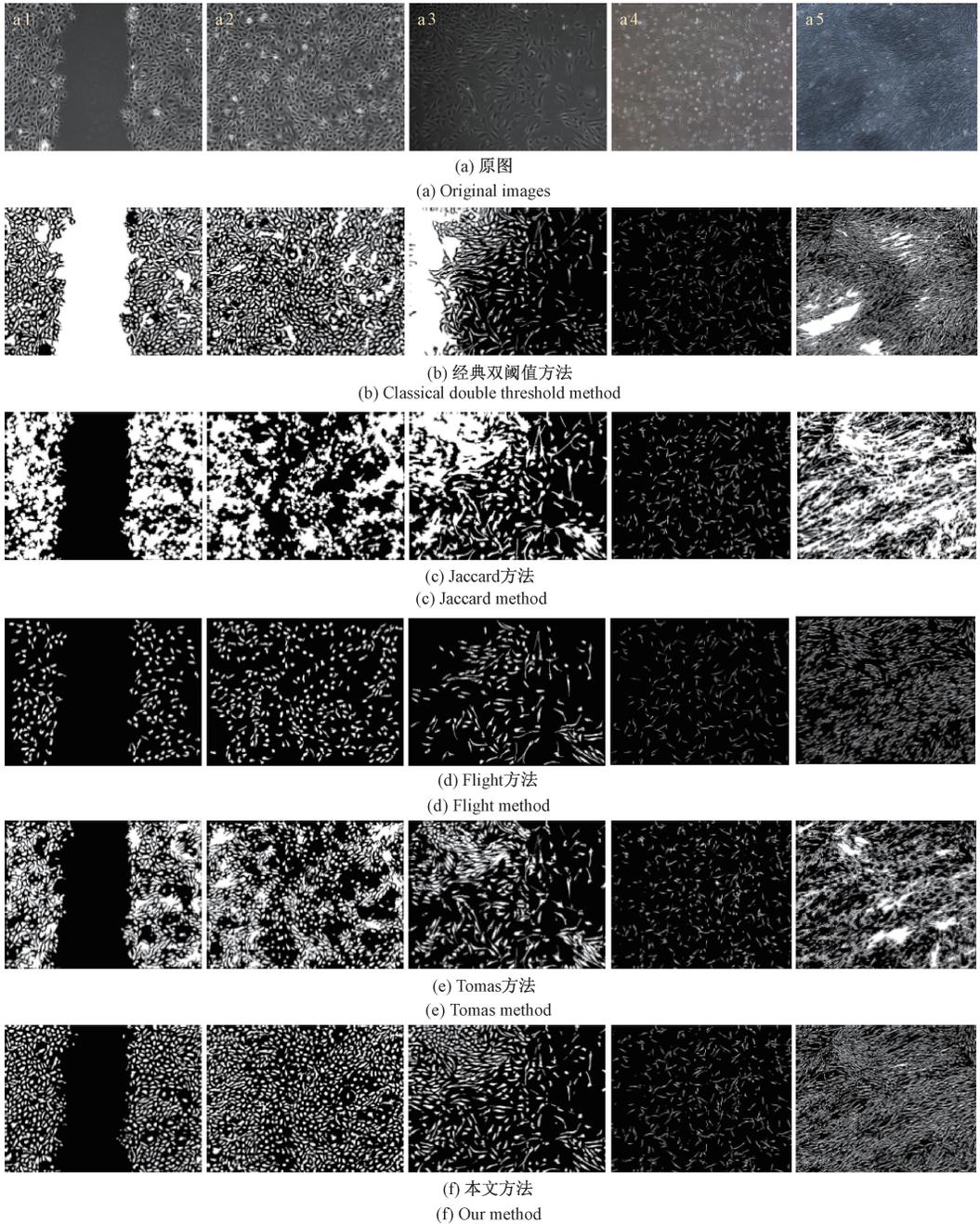


图 8 不同数据集图像分割结果对比

Fig. 8 Comparison of image segmentation results for different data sets

3 结 论

本文针对相差显微图像的亮度不均匀问题,提出了一种基于亮度均衡并结合阈值分割的方法。该方法首先采用了分块调整的方法修复了图像的不均匀光照,利用高斯函数权值优化比值矩阵的方法消除因分块而产生的“方块效应”,并通过图像熵与高斯函数标准差关系曲线确定了最优的标准差,然后通过曝光适度评价权重微调与减去梯度图方法得到了高对比度、光照均匀的相差显微图像,最后通过双阈值分割与后续的孔洞填充、面积约束获得了分割结果良好的二值图像。对多种相差显微细胞图像数据集进行分割验证,与其他对比方法相比,本文所提出的方法分割效果均更好,用于细胞分割与细胞计数的正确率也更高。

参考文献

- [1] 赵欣欣. 生物组织显微图像中的细胞计数方法[D]. 武汉:华中科技大学, 2012.
ZHAO X X. Cell counting methods in microscopic images of biological tissues[D]. Wuhan:Huazhong University of Science and Technology, 2012.
- [2] 陈岩. 血常规检验中血涂片分析的价值研究[J]. 中国医药指南, 2018, 16(1): 118-119.
CHEN Y. Study on the value of blood smear analysis in routine blood tests [J]. China Pharmaceutical Guide, 2018, 16(1): 118-119.
- [3] 曹晓红. 尿液有形成分的检测意义及常用的检验方法研究[J]. 人人健康, 2019(11): 267.
CAO X H. Study on the significance of detection of urine organic fraction and common testing methods[J]. Health for All, 2019(11): 267.
- [4] 刘志文, 安兴, 李衡, 等. 显微细胞图像分析方法的研究进展[J]. 北京理工大学学报, 2014, 34(5): 441-453.
LIU ZH W, AN X, LI H, et al. Research progress of microscopic cell image analysis methods[J]. Journal of Beijing University of Technology, 2014, 34(5): 441-453.
- [5] PARK Y K, DEPEURSINGE C, POPESCU G. Quantitative phase imaging in biomedicine[J]. Nature Photonics, 2018, 12(12): 578-589.
- [6] OJA S, KOMULAINEN P, PENTTIL A, et al. Automated image analysis detects aging in clinical-grade mesenchymal stromal cell cultures [J]. Stem Cell Research, Therapy, 2018, 9(1): 6-18.
- [7] JACCARD N, GRIFFIN L D, KESER A, et al. Automated method for the rapid and precise estimation of

adherent cell culture characteristics from phase contrast microscopy images [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(3): 504-517.

- [8] FLIGHT R, LANDINI G, STYLES I B, et al. Automated noninvasive epithelial cell counting in phase contrast microscopy images with automated parameter selection[J]. Journal of Microscopy, 2018, 271(3): 345-354.
- [9] VICAR T, BALVAN J, JAROS J, et al. Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: Review and comprehensive comparison [J]. BioMed Central, 2019, 20(1): 1-25.
- [10] YIN Z Z, KANADE T, CHEN M, et al. Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation [J]. Medical Image Analysis, 2012, 16(5): 1047-1062.
- [11] RONNEBERGER O, FISCHER P, BROX T. U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation [C]. International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention. Springer International Publishing, 2015: 234-241.
- [12] 张文秀, 朱振才, 张永合, 等. 基于残差块和注意力机制的细胞图像分割方法 [J]. 光学学报, 2020, 40(17): 76-83.
ZHANG W X, ZHU ZH C, ZHANG Y H, et al. A cellular image segmentation method based on residual blocks and attention mechanism [J]. Journal of Optics, 2020, 40(17): 76-83.
- [13] 吴京城, 洪欢欢, 施露露, 等. 反背景差分结合 Otsu 的细胞图像分割方法 [J]. 电子测量与仪器学报, 2021, 35(4): 82-89.
WU J CH, HONG H H, SHI L L, et al. Inverse background differencing combined with Otsu for cell image segmentation [J]. Journal of Electronic Measurement and Instrumentation, 2021, 35(4): 82-89.
- [14] 周莉莉, 姜枫. 图像分割方法综述研究 [J]. 计算机应用研究, 2017, 34(7): 1921-1928.
ZHOU L L, JIANG F. A review study of image segmentation methods [J]. Computer Application Research, 2017, 34(7): 1921-1928.
- [15] JYOTSNA, CHAUHAN S, SHARMA E, et al. Binarization techniques for degraded document images-A review [C]. 2016 5th International Conference on Reliability, Infocom Technologies and Optimization (Trends and Future Directions) (ICRITO). IEEE, 2016.
- [16] 钟雪君. 一种改进的 Otsu 双阈值二值化图像分割方

法[J]. 电子世界, 2013(4): 104.

ZHONG X J. An improved Otsu dual-threshold binarization image segmentation method [J]. Electronic World, 2013(4): 104.

- [17] 张丰收, 韩敬阳, 曹军杰. 基于图像熵的主动轮廓分割模型[J]. 智能计算机与应用, 2019, 9(3): 6-10.
ZHANG F SH, HAN J Y, CAO J J. Active contour segmentation model based on image entropy [J]. Intelligent Computers and Applications, 2019, 9(3): 6-10.
- [18] MERTENS T, KAUTZ J, REETH F V. Exposure fusion: A simple and practical alternative to high dynamic range photography [J]. Computer Graphics Forum, 2010, 28(1): 161-171.
- [19] 程新. 基于同态滤波的图像增强算法研究[D]. 西安: 西安邮电大学, 2016.
CHENG X. Research on image enhancement algorithm based on homomorphic filtering [D]. Xi'an: Xi'an University of Posts and Telecommunications, 2016.
- [20] GUO H, CHEN P, HUANG S, et al. A threshold segmentation method for non-uniform illumination image based on brightness equalization [C]. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 2019, 569(5): 052046.

作者简介



张杰, 2018年于宁波大学获得学士学位, 现为宁波大学硕士研究生, 主要研究方向为贴壁细胞图像分割、悬浮细胞图像分割与应用。

E-mail: 1083139544@qq.com

Zhang Jie received his B. Sc. degree from Ningbo University in 2018. Now he is a M. Sc. candidate at Ningbo University. His main research interests include walled cell image segmentation, suspended cell image segmentation and applications.



施露露 (通信作者), 分别在2009和2017年于华东理工大学获得学士学位和博士学位, 现为中国科学院上海技术物理研究所博士后, 主要研究方向为生物发酵、胞内代谢调控、细胞制备技术、细胞培养技术等。

E-mail: sll417@126.com

Shi Lulu (Corresponding author) received her B. Sc. and Ph. D. degrees from East China University of Science and Technology in 2009 and 2017, respectively. She is currently a postdoctoral fellow at the Shanghai Institute of Technology Physics, Chinese Academy of Sciences. Her main research interests include biofermentation, intracellular metabolism regulation, cell preparation technology, and cell culture technology.