

基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法

吴京城¹, 施露露², 杜亚南¹, 闻路红¹, 史振志^{1*}

¹宁波大学高等技术研究院, 浙江 宁波 315211;

²宁波华仪宁创智能科技有限公司, 浙江 宁波 315100

摘要 针对相差显微镜采集的细胞图像具有亮度不均且细胞与背景对比度较低的问题, 根据图像中细胞区域灰度变化急剧和背景区域灰度变化缓慢的特征, 提出一种基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法。从频率域的角度出发, 构建双重高斯滤波过滤低频信息、保留高频信息, 有利于增强细胞与背景的差异性, 降低亮度不均因素的干扰; 借助自适应阈值分割出细胞, 并使用形态学闭运算改善其形态, 同时利用面积约束在一定程度上消除杂质对分割准确性的影响。在 C2C12 数据集上测试所提方法, 精确率、召回率和 F 值分别为 0.9770、0.9457 和 0.9609, 优于对比算法。研究表明: 所提方法具有较好的准确性和鲁棒性, 能实现细胞图像快速、准确分割。

关键词 图像处理; 细胞分割; 双重高斯滤波; 自适应阈值; 面积约束; 相差显微镜

中图分类号 TP391.41

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0210002

Fast Segmentation Method of Cell Image Based on Dual-Gaussian Filtering

Wu Jingcheng¹, Shi Lulu², Du Yanan¹, Wen Luhong¹, Shi Zhenzhi^{1*}

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

²China Innovation Instrument Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang 315100, China

Abstract Considering the uneven brightness of the cell images collected by the phase contrast microscope and the low contrast between the cells and background, a fast cell image segmentation method based on dual-Gaussian filtering is proposed according to the characteristics of the sharp changes in the gray level of the cell area and the slow gray changes in the background area. The proposed method constructs a dual-Gaussian filter from the perspective of frequency domain to filter low-frequency information while retaining high-frequency information, which is beneficial to enhance the difference between cells and background and reduce the interference of uneven brightness factors. The cells are segmented using an adaptive threshold, and the morphological closing operation is used to improve their shape. The area constraint is used to remove the influence of impurities on the accuracy of segmentation to a certain extent. The proposed method was tested on a C2C12 dataset, and the accuracy, recall, and F values are 0.9770, 0.9457, and 0.9609, respectively, which were better than the comparison algorithms. The results show that the proposed method has good accuracy and robustness and can achieve fast and accurate cell image segmentation.

Key words image processing; cell segmentation; dual-Gaussian filtering; adaptive threshold; area constraint; phase contrast microscope

收稿日期: 2021-01-26; 修回日期: 2021-02-26; 录用日期: 2021-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(81401452)、国家重点研发项目(2018YFC1603504)、宁波市自然科学基金(2017A610164)

通信作者: *shizhenzhi@nbu.edu.cn

1 引言

细胞增殖是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础,与疾病的产生与发展有着密切的联系^[1-3]。细胞在增殖过程中的行为特性是生物医学领域研究的热点,对其进行研究必须在活细胞水平上进行^[4-5]。荧光显微镜是细胞生物学中的主要成像工具,能提供具有分子特异性的高对比度图像,但通常是定性分析细胞制品,光毒性和光漂白限制了活细胞的荧光成像^[6]。此外,外源性标记剂的使用也会给细胞带来不可逆转的损害,影响细胞的正常生理活性。相差显微镜采用相位对比技术将光穿过细胞时微弱的相位变化转变为振幅变化,可以在细胞自然状态下观察其行为特性,由于不会破坏细胞正常生理活性,对采集的图像进行自动化分析在解决各种生物学问题方面具有重要意义^[7-9]。

在细胞图像自动化分析中,细胞分割是最为基础和重要的领域。然而由于成像机制,相差显微镜采集到的细胞图像存在亮度不均衡和细胞与背景对比度较低的问题,极大地增加了分割难度。近年来,深度学习逐步应用于生物医学图像分割领域^[10-12]。Ronneberger等^[14]在FCN^[13]的基础上提出了U-NET模型,对反卷积层和特征层进行拼接,弥补了信息损失,但由于梯度消失的原因,构建的网络深度有限。张文秀等^[15]以U-NET网络为基础,引入残差块模型强化特征传播能力,并利用注意力机制加强细胞区域的权重,减缓亮度不一致。这些方法需要人工手动制作大量的训练集以及进行耗时的模型训练,可能不适合对细胞图像进行大规模快速分析。Yin等^[16]根据相差显微镜的成像原理,建立线性成像模型,利用稀疏约束正则化函数来对图像进行复原,降低亮度不均衡和低对比度的干扰,后续仅使用阈值处理即可实现高质量的分割,

但在图像复原过程中会消耗大量计算资源。Jaccard等^[17]采用局部对比度阈值和光晕伪影校正结合的方法快速实现细胞分割,但该方法处理高密度细胞图像时存在严重的欠分割。Dehlinger等^[18]通过改变显微镜焦平面来生成分别具有较暗和较亮细胞中心的两幅图像,再将它们相减,以生成高对比度的新图像。Flight等^[19]在文献[18]的基础上,通过对显微镜聚焦时的图像进行均值滤波处理,来模拟散焦时发生的对比度变化,将它们相减,生成高对比度的图像,无需改变焦平面。Vicar等^[20]对相差显微图像分割方法进行了全面的分析和比较,并对图像进行形态学重建,降低亮度不均衡和对比度低的干扰因素影响。阈值分割作为一种稳定、高效的分割技术,分割结果的准确性会受到亮度不均衡和对比度低因素的影响。

针对上述问题,本文提出一种基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法。由于相差显微图像中细胞区域灰度变化大、背景区域灰度变化小,据此在高斯滤波的基础上构建双重高斯滤波,使具有大内核的高斯滤波器提取低频信息、具有小内核的高斯滤波器滤除噪声;并对滤波后的图像进行差分运算,保留高频信息;随后采用自适应阈值分割提取细胞区域,并对其优化处理,从而快速、准确地分割出细胞。

2 细胞图像分割理论分析

图1分别给出了细胞原始图像和对应横纵线处灰度值曲线图。通过观察分析图1(a)可以得出:细胞图像存在亮度不均衡的现象,左侧边缘区域整体亮度较暗,右侧区域整体亮度较亮;细胞图像中细胞与背景的差异性很小,在边缘暗区,细胞与背景灰度级有较强的重叠。从上述细胞图像特征可以看出,一般的阈值类方法难以从背景中分割出细

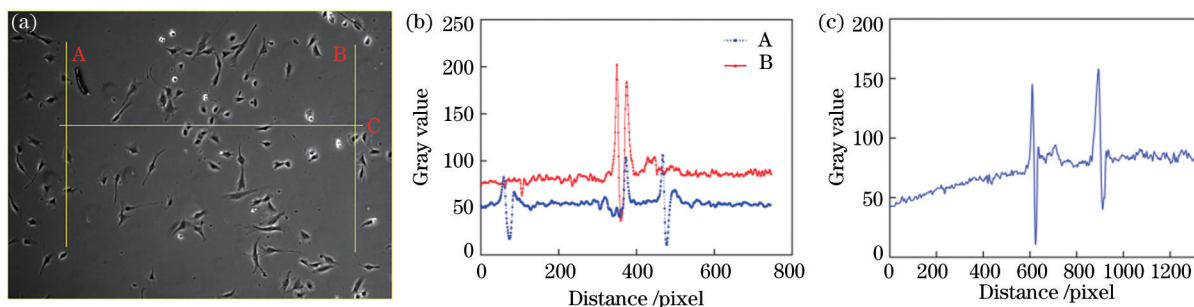


图1 相差显微图像特征分析。(a)细胞图像;(b)纵线灰度值分布;(c)横线灰度值分布

Fig. 1 Feature analysis of phase contrast microscopy image. (a) Cell image; (b) gray value distribution at longitudinal lines; (c) gray value distribution at transverse line

胞。分析图 1(b)和图 1(c)可知:当暗区纵线 A、亮区纵线 B 以及横线 C 未穿过细胞时,灰度变化较为缓慢;穿过细胞时,灰度变化变得急剧,从频率域的角度来看,细胞区域属于高频信息,背景区域属于低频信息。另外,从图 1(c)可以看出,不考虑灰度变化急剧的部分,沿着从左至右的方向,横线灰

度值曲线整体上有上升的趋势,这也间接反映出细胞图像具有亮度不均衡问题。相差显微图像存在上述问题,会导致在后续图像处理过程中丢失大量局部信息,影响处理效果。因此提出了基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法,流程如图 2 所示。

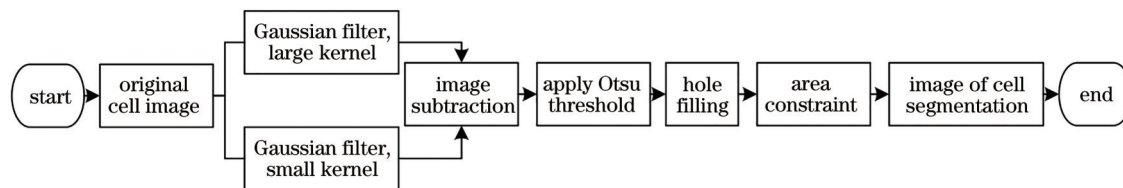


图 2 所提方法流程图

Fig. 2 Flow chart of the proposed method

2.1 双重高斯滤波

在 Gaussian 滤波的基础上构建双重高斯滤波来进行处理的原因有:高斯核系数随着到核中心距离的增大而减小,对图像低通滤波模糊程度低,在边缘过渡周围产生更平滑的结果;高斯核具有可分离性,相较于不可分离核,执行卷积运算时具有计算效率高的优势。定义大、小两个高斯滤波器 G_2 、 G_1 :

$$G_i(x, y) = e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_i^2}}, \quad (1)$$

式中: σ_i 为高斯函数分布的标准差,高斯核半径服从 3σ 准则。定义双重高斯滤波处理后的图像 f_{dg} 为

$$f_{dg} = f * (G_2 - G_1), \quad (2)$$

式中: f 为相差显微镜采集到的灰度图像; $*$ 表示卷积运算。大高斯滤波器 G_2 的 σ_2 值设置足够大,原始图像被 G_2 滤波后仅保留低频信息,如图 3(b)所示。根据现有文献[16]知,半径小于 3 像素的小区域不可能代表细胞,小高斯滤波器 G_1 中的 σ_1 取值为 1,原始图像被 G_1 滤波后可滤除部分噪声,并保留了原始图像中的大部分信息,如图 3(c)所示。通过差分运算过滤低频信息并保留高频信息,得到 f_{dg} ,如图 3(d)所示。

图 4 为不同 σ_2 值对分割结果的影响,可知:不同

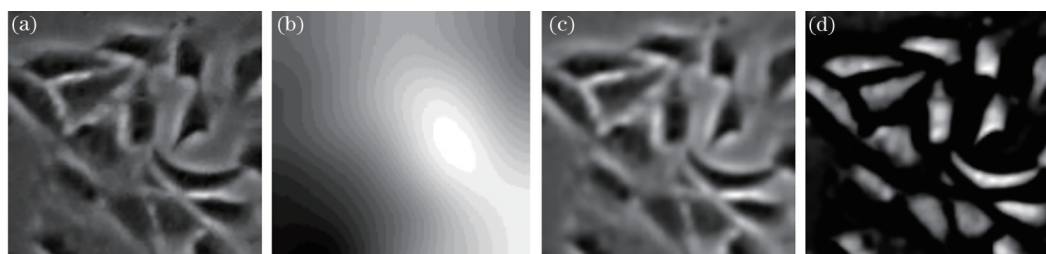


图 3 双重高斯滤波处理过程。(a)输入图像;(b)高斯滤波(大内核);(c)高斯滤波(小内核);(d)差分运算
Fig. 3 Dual-Gaussian filtering process. (a) Input image; (b) Gaussian filtering (large kernel); (c) Gaussian filtering (small kernel); (d) difference calculation

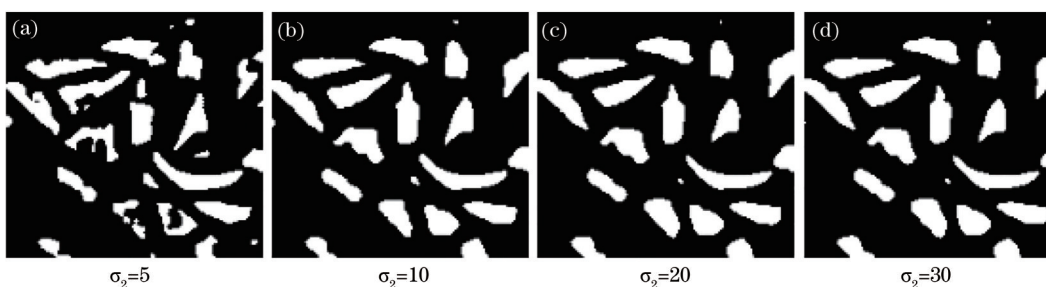


图 4 不同 σ_2 值对分割结果的影响
Fig. 4 Effect of different σ_2 values on the segmentation results

σ_2 值影响分割结果的好坏,当 σ_2 取值较小时,低频信息提取不充分,间接影响高频信息的准确提取,导致分割出的细胞不完整,丢失对比度较低区域的细胞,且存在过分割;随着 σ_2 值的增大,分割结果有所改善,但 σ_2 值增大到一定程度时,分割结果改善非常小。因此,需要取合适 σ_2 的值。

图像灰度对比度高可以用标准差来度量,对比度越高,标准差越大。为了获得高对比度的图像,必须要求处理后图像 f_{dg} 的标准差达到最大,联合考虑(1)、(2)式可知,由于 σ_1 值已经确定,唯一影响 f_{dg} 的标准差只有 σ_2 的取值。成长中的细胞面积和半径逐渐增大,使用成长中的细胞图像来确定 σ_2 的取值时,可能会导致求取的 σ_2 值偏小,低频信息提取不充分,间接影响高频信息的提取,在处理成长后期的细胞图像时,分割效果不佳,如图 4(a) 所示;成长后期的细胞发育逐渐完全,使用此时的图像确定 σ_2 的取值,能适应不同成长时期的细胞图像高频信息的间接提取。对成长后期的相差显微细胞图像进行双重高斯滤波处理,定量分析 σ_2 与 f_{dg} 标准差的关系,所得对应关系如图 5 所示,当 σ_2 取值为 20 时, f_{dg} 标准差达到最大,即图

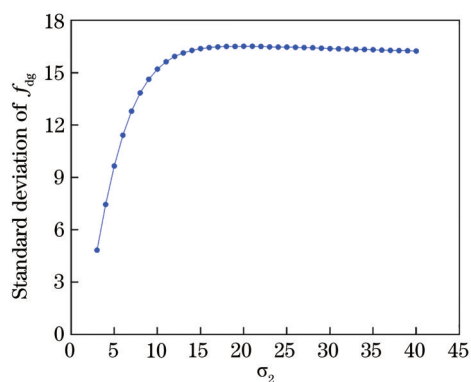


图 5 σ_2 值与图像 f_{dg} 标准差的关系

Fig. 5 Relationship between σ_2 value and standard deviation

像 f_{dg} 的对比度最高,随后将其应用到数据集中的所有图像。

双重高斯滤波处理前后的对比如图 6 所示,图 6(a) 中细胞与背景的对比如很低,两者灰度级有重叠且亮度不均衡,不易区分。相较而言,所得图像 f_{dg} 减弱了亮度不均衡因素带来的影响,细胞区域亮度被增强,背景区域亮度被减弱,增强了细胞与背景的对比如,两者容易区分,如图 6(c) 所示。

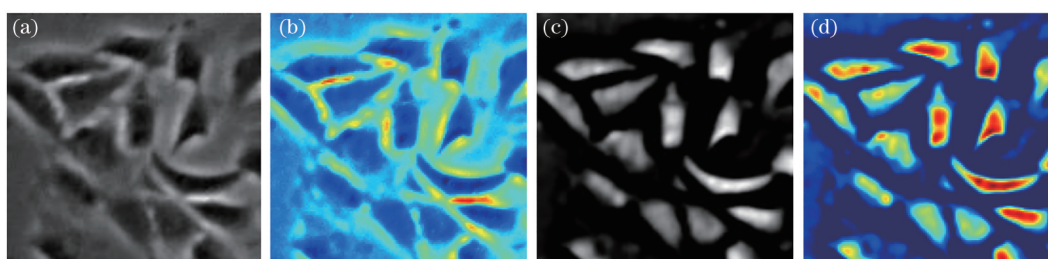


图 6 双重高斯滤波处理前后的对比图。(a)处理前;(b)处理前灰度映射;(c)处理后;(d)处理后灰度映射

Fig. 6 Comparison diagrams before and after dual-Gaussian filtering. (a) Before processing; (b) grayscale mapping before processing; (c) after processing; (d) grayscale mapping after processing

2.2 自适应阈值分割

为了得到快速、稳定的分割结果,使用 Otsu 阈值分割算法^[21]进行细胞区域的提取,寻找使得类间方差最大的阈值,表达式为

$$\sigma^2(k^*) = \max_{0 < k < L-1} \sigma^2(k), \quad (3)$$

式中: k 为图像灰度值; L 为图像灰度取值范围; σ^2 为类间方差; 对应最大类间方差值的 k 值为最优阈值 k^* 。阈值处理后的二值图像为

$$g(x, y) = \begin{cases} 1, & f_{dg}(x, y) \geq k^* \\ 0, & f_{dg}(x, y) < k^* \end{cases} \quad (4)$$

将小于该阈值的区域划分为非细胞区域,大于

等于该阈值的区域划分为细胞,如图 7(a) 所示。

2.3 孔洞填充和面积约束

为了消除孔洞,得到完整的细胞区域,使用二值形态学闭运算对其形态进行改善,如图 7(b) 所示。在细胞培养过程中,会产生组织碎屑,同时溶液中的杂质也会影响细胞计数的准确性。因杂质通常较小,可设置杂质面积阈值,移除小于该阈值的区域,如图 7(c) 所示。具体步骤为:统计阈值分割图中所有连通区域;计算每个连通区域的面积;测量数据集中典型杂质的大小,对面积小于 50 的连通区域进行取反,实现杂质移除。

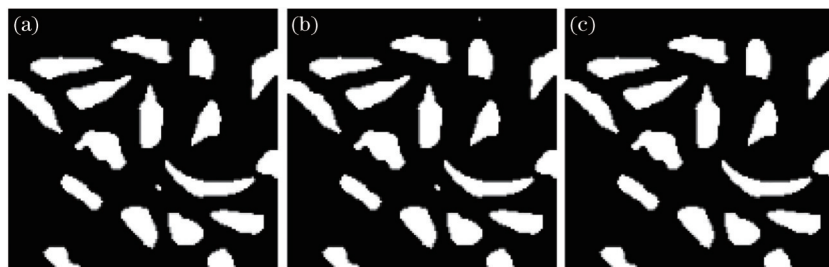


图 7 二值分割图像。(a)阈值分割;(b)空洞填充;(c)面积约束

Fig. 7 Binary segmentation image. (a) Threshold segmentation; (b) hole filling; (c) area constraint

3 实验结果分析与讨论

3.1 实验平台及数据

使用卡内基梅隆大学公开的小鼠成肌干细胞群落 C2C12 数据集,该数据集共有 48 个序列,每个序列采集 1013 帧图像(1392×1040 分辨率),从中选择 1 个序列用于实验,并使用图像工具 ImageJ 中 CellCounter 插件单击每帧图像中的细胞来实现细胞手动计数。

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 实现所提算法。

3.2 评价指标

为了评估所提算法的分割效果,引入精确率 (precision)、召回率 (recall)、F 值 (F-score) 三个指标来定量比较分析,表达式分别为

$$P_{\text{precision}} = \frac{N_{\text{TP}}}{N_{\text{TP}} + N_{\text{FP}}}, \quad (5)$$

$$P_{\text{recall}} = \frac{N_{\text{TP}}}{N_{\text{TP}} + N_{\text{FN}}}, \quad (6)$$

$$P_{\text{F-score}} = 2 \times \left(\frac{P_{\text{precision}} \times P_{\text{recall}}}{P_{\text{precision}} + P_{\text{recall}}} \right), \quad (7)$$

式中: N_{TP} 代表算法正确识别的细胞个数; N_{FP} 代表算法错误识别的细胞个数; N_{FN} 代表算法正确未被识别的细胞个数。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,衡量算法的整体性能,F 值越高,算法检测效果越好。另外,还使用平均运行时间 Time 对算法进行评价。

3.3 不同分割算法的结果分析

为验证算法的性能,将现有较为准确、快速的算法 (Jaccard 算法^[17]、2D-Otsu 算法^[22]、Flight 算法^[19] 和 Vicar 算法^[20]) 与所提算法进行对比分析,各算法对生长周期内低、中和高密度细胞图像整体的处理结果分别如图 8、图 9 和图 10 所示。

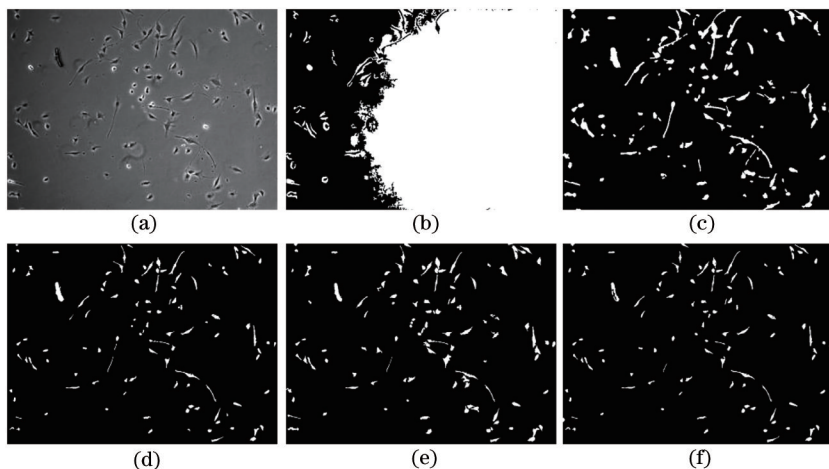


图 8 不同算法对低密度细胞图像的分割结果。(a)细胞图像;(b)2D-Otsu 算法;(c)Jaccard 算法;(d)Flight 算法;(e) Vicar 算法;(f)所提算法

Fig. 8 Segmentation results of low-density cell images processed by different algorithms. (a) Cell image; (b) 2D-Otsu algorithm; (c) Jaccard algorithm; (d) Flight algorithm; (e) Vicar algorithm; (f) proposed algorithm

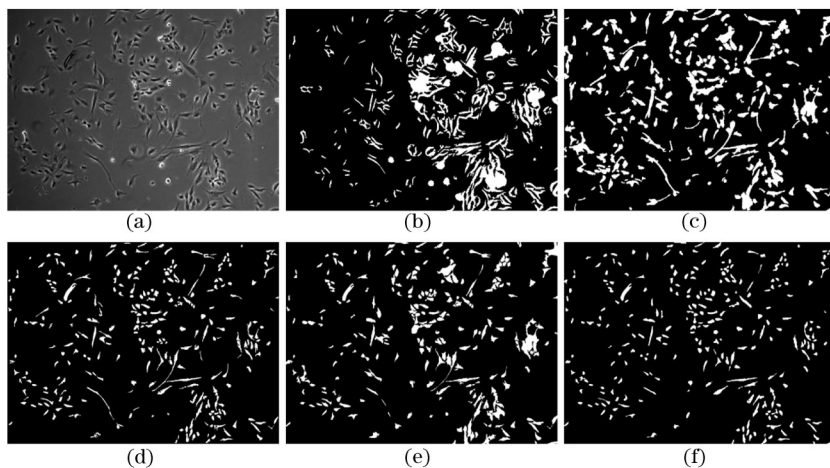


图 9 不同算法对中密度细胞图像的分割结果。(a)细胞图像;(b)2D-Otsu算法;(c)Jaccard算法;(d)Flight算法;(e)Vicar算法;(f)所提算法

Fig. 9 Segmentation results of medium-density cell images processed by different algorithms. (a) Cell image; (b) 2D-Otsu algorithm; (c) Jaccard algorithm; (d) Flight algorithm; (e) Vicar algorithm; (f) proposed algorithm

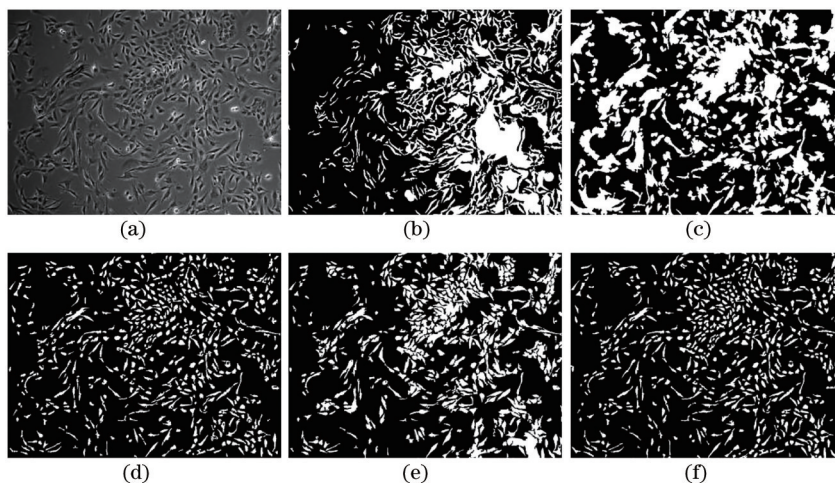


图 10 不同算法对高密度细胞图像的分割结果。(a)细胞图像;(b)2D-Otsu算法;(c)Jaccard算法;(d)Flight算法;(e)Vicar算法;(f)所提算法

Fig. 10 Segmentation results of high-density cell images processed by different algorithms. (a) Cell image; (b) 2D-Otsu algorithm; (c) Jaccard algorithm; (d) Flight algorithm; (e) Vicar algorithm; (f) proposed algorithm

2D-Otsu算法的分割结果中,将细胞和背景划分为一类,光晕划分为另一类,未能有效分割出细胞。Jaccard算法能克服细胞与背景对比度低和亮度不均衡的影响,准确分割出孤立的细胞,但处理中、低密度细胞图像时,对聚集和粘连的细胞存在欠分割;处理高密度细胞图像时,欠分割现象严重。Flight算法处理不同密度下细胞图像时分割结果较为准确,但边缘会出现断裂,有轻微的过分割,会丢失对比度较低区域的细胞。Vicar算法受细胞与背景对比度低和亮度不均衡的影响较小,能有效分割出细胞,但分割边缘粗糙,在处理高密度细胞图像时,存在欠分割。

相较而言,所提算法较好地处理亮度不均衡及对比度低的细胞图像,在处理不同密度细胞图像时发生的欠分割和过分割现象较少,能准确分割出细胞。

从视觉效果上来判断分割结果的好坏易受人主观因素的影响,仍需进行定量评价,各算法分割结果对比如表 1 所示。所提算法的精确率、召回率和 F 值三项指标分别达到了 0.9770、0.9457 和 0.9609,均优于对比算法,在算法运行时间相差不大的情况下,整体上表明所提算法能实现细胞图像快速、准确分割。

表 1 不同算法分割结果对比

Table 1 Comparison of segmentation results using different algorithms

Algorithm	Precision	Recall	F-score	Time /s
2D-Otsu	0.0883	0.0462	0.0607	0.98
Jaccard	0.9030	0.8470	0.8606	2.66
Flight	0.9166	0.9402	0.9281	2.47
Vicar	0.9756	0.8246	0.8919	0.78
Proposed algorithm	0.9770	0.9457	0.9609	1.68

3.4 鲁棒性分析

为进一步分析算法的鲁棒性,进行复杂情况下的对比实验,如图 11 所示。图 11(a1)中有孤立和聚集的细胞,图像整体较亮;图 11(a2)中的细胞存在粘连;图 11(a3)、(a4)中的细胞密集、形状不规则和

对比度较低,图像整体较暗。2D-Otsu 算法严重受到对比度低和亮度不一致的影响,未能有效分割出细胞,如图 11(b)所示;Jaccard 算法准确检测出孤立的细胞,但处理粘连、聚集和形状不规则的细胞时存在欠分割,如图 11(c)所示;Flight 算法处理细胞密集的图像时,会遗漏对比度较低区域的细胞,且分割出的细胞不完整,如图 11(d3)、(d4)所示;Vicar 算法在处理聚集、粘连的细胞时存在欠分割,并且在处理细胞密集的图像时,会丢失对比度较低区域的细胞,如图 11(e)所示;所提算法通过构建双重高斯滤波增强细胞与背景的对比度,减弱亮度不均衡的干扰,后续又进行优化处理,从图 11(f)的结果来看,在复杂情况下,所提算法也能实现分割结果一致。

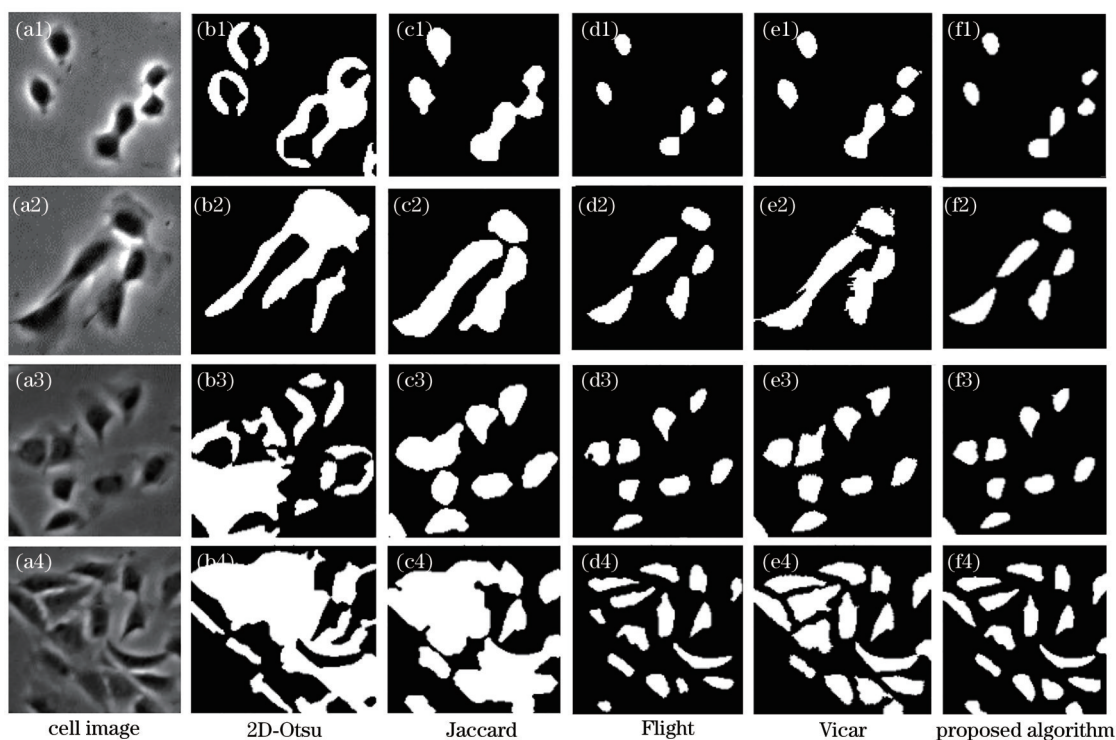


图 11 复杂情况下不同算法分割结果对比

Fig. 11 Comparison of segmentation results of different algorithms in complex situations

3.5 细胞计数

体外培养的单层细胞经常用于研究细胞的行为,通常在多个时间点进行细胞计数来评估它们对刺激的增殖和分化^[8,18-19]。过去常借助细胞计数器之类的工具对细胞制品进行计数,这涉及用胰酶消化细胞,破坏了细胞正常的生理活性,无法对同一细胞制品进行多次测量以生成完整的细胞生长曲线。人工检查和计数非常耗时,并且高度依赖于操作人员的专业技能。随着细胞分析需求的增加,耗时

耗力的手动分析逐渐被细胞自动计数方法所取代。在自动方法中,图像处理算法是用于细胞分析最强大和通用的方法之一。示例图 8、图 9 和图 10 的细胞计数结果对比如表 2 所示,最优结果用加粗数字标出,在处理不同密度的细胞图像时,所提算法整体计数结果优于对比算法。结合表 1 的统计结果来看,所提算法可以实现生长周期内细胞的快速、准确计数,这对细胞增殖行为的研究具有重要的意义。

表 2 示例图像细胞计数结果对比

Table 2 Comparison of cell segmentation results of sample images

Example	Algorithm	GT	EN	N_{TP}	N_{FP}	N_{FN}	Precision	Recall	F-score
Fig. 8	2D-Otsu		59	5	54	99	0.0847	0.0481	0.0614
	Jaccard		126	100	26	4	0.7937	0.9615	0.8696
	Flight	104	112	98	14	6	0.875	0.9423	0.9074
	Vicar		105	102	3	2	0.9714	0.9808	0.9761
	Proposed algorithm		105	99	6	5	0.9429	0.9519	0.9474
Fig. 9	2D-Otsu		227	12	215	259	0.0529	0.0443	0.0482
	Jaccard		208	193	15	78	0.9279	0.7122	0.8058
	Flight	271	279	259	20	12	0.9283	0.9557	0.9418
	Vicar		207	201	6	60	0.9710	0.7417	0.8410
	Proposed algorithm		265	260	5	11	0.9811	0.9594	0.9701
Fig. 10	2D-Otsu		291	12	279	565	0.0412	0.0208	0.0277
	Jaccard		228	225	3	349	0.9868	0.3899	0.5590
	Flight	577	599	560	39	14	0.9348	0.9705	0.9524
	Vicar		380	372	8	205	0.9789	0.6447	0.7774
	Proposed algorithm		574	564	10	13	0.9825	0.9775	0.9800

注:GT表示专家手动计数结果;EN表示图像处理方法计数结果。

4 结 论

针对相差显微细胞图像存在亮度不均衡以及细胞与背景对比度低的问题,从频率域的角度出发,研究了一种基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法。通过构建双重高斯滤波增强细胞与背景的对比度,减弱亮度不均衡的影响,借助自适应阈值分割出细胞,并使用闭运算改善细胞形态,随后采用面积约束降低杂质对分割准确性的影响。实验结果表明,与其他算法相比,所提算法具有较好的鲁棒性和准确性,可以降低甚至消除相差显微细胞图像中亮度不均衡和对比度低因素的影响,较好地处理细胞生长周期内的图像,还可以实现粘连、形状不规则细胞的有效分割,为后续体外细胞增殖行为的研究奠定良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Truong K, Vielh P, Malfroy B, et al. Fluorescence-based analysis of DNA ploidy and cell proliferation within fine-needle samplings of breast tumors[J]. *Cancer*, 1998, 84(5): 309-316.
- [2] Winter M, Mankowski W, Wait E, et al. LEVER: software tools for segmentation, tracking and lineaging of proliferating cells[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3530-3531.
- [3] Janicke B, Kårsnäs A, Egelberg P, et al. Label-free high temporal resolution assessment of cell proliferation using digital holographic microscopy[J]. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2017, 91(5): 460-469.
- [4] Lindauer K, Bartels T, Scherer P, et al. Development and validation of an image analysis system for the measurement of cell proliferation in mammary glands of rats[J]. *Toxicologic Pathology*, 2019, 47(5): 634-644.
- [5] Suga M, Kii H, Niikura K, et al. Development of a monitoring method for nonlabeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2015, 4(7): 720-730.
- [6] Park Y, Depeursinge C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(10): 578-589.
- [7] Oja S, Komulainen P, Penttilä 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.
- [8] Huh S, Ker D F E, Bise R, et al. Automated mitosis detection of stem cell populations in phase-contrast microscopy images[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2011, 30(3): 586-596.
- [9] Meijering E, Carpenter A E, Peng H, et al. Imagining the future of bioimage analysis[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(12): 1250-1255.
- [10] Zheng T Y, Tang C, Lei Z K. Multi-scale retinal

- vessel segmentation based on fully convolutional neural network[J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(2): 0211002.
- 郑婷月, 唐晨, 雷振坤. 基于全卷积神经网络的多尺度视网膜血管分割[J]. *光学学报*, 2019, 39(2): 0211002.
- [11] Chu J H, Li X C, Zhang J Q, et al. Fine-grained segmentation method for three-dimensional brain tumors using cascaded convolutional network[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(10): 101001.
- 褚晶辉, 李晓川, 张佳祺, 等. 一种基于级联卷积网络的三维脑肿瘤精细分割[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(10): 101001.
- [12] Liu R Y, Liu L B. Detection of pulmonary nodules based on improved full convolution network model [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(16): 161015.
- 刘若愚, 刘立波. 基于改进全卷积网络模型的肺结节检测[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(16): 161015.
- [13] Shelhamer E, Long J, Darrell T. Fully convolutional networks for semantic segmentation[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2015: 640-651.
- [14] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation[M]//Navab N, Hornegger J, Wells W M, et al. *Medical image computing and computer-assisted intervention-MICCAI 2015. Lecture notes in computer science*. Cham: Springer, 2015, 9351: 234-241.
- [15] Zhang W X, Zhu Z C, Zhang Y H, et al. Cell image segmentation method based on residual block and attention mechanism[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(17): 1710001.
- 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): 1710001.
- [16] Yin Z Z, Kanade T, Chen M. Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation[J]. *Medical Image Analysis*, 2012, 16(5): 1047-1062.
- [17] 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.
- [18] Dehlinger D, Suer L, Elsheikh M, et al. Dye free automated cell counting and analysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(3): 838-847.
- [19] 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.
- [20] Vicar T, Balvan J, Jaros J, et al. Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: review and comprehensive comparison[J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 360-384.
- [21] Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms[J]. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, 9(1): 62-66.
- [22] Sha C S, Hou J, Cui H X. A robust 2D Otsu's thresholding method in image segmentation[J]. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 2016, 41: 339-351.