

基于细胞核引导的明场显微图像细胞分割方法

王宜东¹, 杜永兆^{1,2*}, 黎玲¹, 傅玉青², 刁勇¹¹华侨大学医学院, 福建 泉州 362021;²华侨大学工学院, 福建 泉州 362021

摘要 针对明场显微细胞图像存在边缘弱、背景非均匀和细胞形状不规则等特点导致细胞分割困难的问题,提出一种基于荧光细胞核引导的明场显微图像细胞分割方法。首先,利用荧光细胞核质心确定明场单细胞局部显微图像,对局部明场显微细胞图像进行双重高斯滤波,以减弱非均匀背景的影响,采用顶帽变换增加图像的对比度,并采用二维最大类间方差分割方法以增强算法的抗噪性;其次,对完整的明场显微细胞图像进行双重滤波和顶帽变换预处理后,采用二维最大类间方差法进行全局分割,以增强局部分割丢失的细胞轮廓信息,解决细胞形状不规则导致的分割不准确问题;最后,将局部和全局分割的结果融合后采用分水岭变换进行二次分割,以提高对粘连性细胞的分割精度。在Hela细胞图像集上进行验证实验,得到明场细胞分割的精确率、召回率和F值分别为0.960、0.984和0.971,优于现有相关算法,验证了所提方法的高准确性和鲁棒性。

关键词 图像分析; 细胞分割; 细胞核引导; 全局分割; 局部分割

中图分类号 Q631

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP222437

Nucleus-Guided Cell Segmentation Method for Brightfield Micrographs

Wang Yidong¹, Du Yongzhao^{1,2*}, Li Ling¹, Fu Yuqing², Diao Yong¹¹School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China;²College of Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China

Abstract To address the issue of cell segmentation challenges caused by weak edges, uneven backgrounds, and irregular cell shape in brightfield microscopic images, we suggest a cell segmentation method for brightfield microscopic images based on fluorescent nucleus guidance. First, the fluorescent nuclear centroid determines the local microscopic image of a single cell in the brightfield, the double Gaussian filtering reduces the impact of nonuniform background, the top-hat transform enhances the contrast of the images, and the two-dimensional maximum interclass variance segmentation method enhances the antinoise performance of the algorithm. Second, the complete brightfield microscopic cell image is preprocessed using double filtering and top-hat transformation. This is followed by global segmentation using the two-dimensional maximum interclass variance method to enhance the lost cell contour information in local segmentation, which is beneficial to solve the inaccurate segmentation problem caused by irregular cell shape. To increase the segmentation accuracy of sticky cells when local and global findings are combined, the watershed transformation is then employed for secondary segmentation. Through the verification experiment on the Hela cell image set, the accuracy, recall rate, and F value of the brightfield cell segmentation are 0.960, 0.984, and 0.971, respectively, which are better than the existing algorithms; the results confirm the high accuracy and robustness of the proposed method.

Key words image analysis; cell segmentation; nuclear guidance; global segmentation; local segmentation

1 引言

细胞是生物体结构和功能的基本单位,充分了解细胞机制以及如何操纵它们在生命科学研究中具有重

要意义^[1]。光学显微成像技术是生物医学、生物学和细胞生物学等基础研究领域的重要研究工具^[2],广泛应用于细胞显微成像、细胞形态分析、细胞计数、细胞跟踪及细胞行为研究等领域^[3]。常用的显微成像技术

收稿日期: 2022-09-01; 修回日期: 2022-09-19; 录用日期: 2022-09-23; 网络首发日期: 2022-10-02

基金项目: 福建省自然科学基金(2021J01321)、集成光电子学国家重点实验室开放课题项目(IOSKL2020KF25)

通信作者: *yongzhaodu@hqu.edu.cn

有明场成像、暗场成像、相衬成像、微分干涉成像和荧光成像等模式^[4-5]。其中明场成像是最基本的成像方式,其他所有成像方式都是以明场成像为基础的。特别是在定量细胞生物学研究领域,会利用多种模态的细胞图像如明场图像和荧光图像综合分析细胞特性,而精确的细胞轮廓是获取多种定量细胞分析特性如形状、位置、RNA 表达和蛋白质表达的前提^[6-8]。然而,精确细胞轮廓的获取需要高效准确的细胞分割算法,因此可以说细胞图像分割算法在生物医学、生物学和细胞生物学等基础研究领域具有重要的应用价值^[9]。

细胞图像分割按照技术原理分为传统细胞分割算法和深度学习细胞分割算法,其中传统细胞分割算法包括阈值法、区域生长法、活动轮廓法、边缘检测法和聚类方法等。阈值分割方法是最简单有效的分割方法,众多研究学者也在阈值分割方法的基础上对其进行改进,以提高细胞分割的准确率。如 Jaccard 等^[10]对细胞图像进行光晕伪影校正后再采用局部对比度阈值算法分割出细胞,但是在处理形状不规则明场显微细胞图像时容易造成过分割问题。Zhang 等^[11]先采用高斯拉普拉斯算子对细胞图像进行平滑处理,再应用 Hessian 分析对图像进行分割,然而该方法在处理弱边缘明场显微细胞图像时容易将其当作背景。Chalfoun 等^[12]受图像梯度阈值分割算法速度快、内存占用低的启发,提出了一种适用于多种细胞模态图像和不同密度细胞图像的经验图像梯度阈值选择方法,用于分离图像中的前景和背景像素,但该方法不适用于对粘连细胞场景的分割。Flight 等^[13]利用均值滤波模拟明场显微细胞图像散焦时发生的对比度变化,通过差值运算提高对比度后运用全局阈值对细胞进行分割,解决了背景非均匀的问题,但是对噪声鲁棒性的效果差。

近年来,随着深度学习方法的兴起,它逐渐被用于图像分割领域^[14-18]。比如 Zhao 等^[19]提出了一种基于弱监督训练方法来得到端到端的细胞图像分割网络,该方法在仅使用点标注训练细胞分割的全卷积神经网络(FCN)^[20]、编码-解码网络(U-Net)^[21-23]和基于金字塔的全卷积神经网络^[24]上进行验证实验,实验结果显示该方法只需要少量的人工点标注数据集即可实现与全监督网络相同的分割效果。虽然基于深度学习的细胞分割方法有着高效快速的特点,但是需要大量数据集进行训练,不仅数据集标签的制作耗费人力,而且网络训练时间较长,对实验设备也有一定的要求,在数据量不足和实验设备匮乏的图像分割应用中存在限制^[25-26]。不仅如此,Minace 等^[27]认为基于深度学习的分割算法性能正在趋于平稳,尤其在医学图像分析应用领域。

基于明场显微图像的细胞分割仍然是一个具有挑战性的问题。其难点主要表现在以下几个方面:首先,由于明场成像方式不需要对细胞进行染色以及细胞内

部本身是一个非均质物体,细胞对比度差并且呈现边缘弱和背景非均匀的形式^[28];其次,一幅细胞图像中存在多个细胞,而且细胞类型多样,并且在不同的细胞周期有着不同的行为,即使对于同一细胞,在不同周期形态也不相同,使得细胞形态呈现多样性,表现出细胞形状不规则的形式^[29];最后,细胞在增殖阶段密度增大,使得细胞粘连现象突出,极大地增加了细胞分割的难度^[30-31]。

针对上述问题,本文提出了一种面向荧光显微成像系统的基于荧光细胞核引导的局部分割和全局分割相结合的明场细胞精确分割方法。首先,由于细胞核图像成像清晰,易于得到细胞核轮廓,因此利用荧光显微细胞核质心位置引导确定明场局部单细胞显微图像,以抑制全局细胞图像因对比度低、边缘弱和背景非均匀对细胞进行精确分割时产生的不利影响;其次,对预处理后的局部单细胞明场图像使用二维最大类间方差分割算法(2D OTSU)以降低噪声对模型的干扰,并采用形态学处理对其进行优化;然后,对全局细胞图像进行与对局部细胞图像相同的预处理和分割操作,以保留局部分割丢失的细胞轮廓信息,进而解决明场显微细胞形状不规则问题;最后,融合局部分割结果和全局分割结果,采用基于标记的分水岭变换实现对明场显微图像粘连性细胞的精确分割,进一步提高细胞分割的准确性。

2 细胞图像分割方法

所提明场细胞图像分割算法的流程如图 1 所示,主要包括局部分割、全局分割和分割融合 3 个关键步骤。其中局部分割过程中,将荧光显微细胞核质心位置引导至单细胞图像,对单细胞图像块进行图像预处理和图像分割操作,在不受其他细胞影响的情况下能够得到精确的细胞轮廓信息;全局分割过程中,对整幅明场细胞图像进行预处理和图像分割操作,能够获取局部分割缺少的细胞轮廓细节,特别是对细胞不规则形状的分割,局部分割极易将其当作噪声滤除;最后对局部分割的结果和全局分割的结果进行融合,对于融合得到的分割结果,采用基于标记控制的分水岭变换处理粘连细胞问题,进一步提高分割的精确率。

2.1 细胞核引导明场细胞图像局部分割

精确分割出细胞轮廓是测量多种细胞特性的基础,考虑到细胞分析中往往需要多种模态的细胞图像,相互补充荧光细胞核图像信息和明场细胞图像信息。但是,相比于明场细胞图像,从荧光细胞核图像中更容易分割出细胞轮廓,因此利用细胞核荧光显微模态图像对明场细胞图像进行引导定位。首先求得细胞核质心并将其映射到明场细胞图像中,其次以质心为中心,得到一个 256×256 大小的包含细胞的单细胞局部明场显微图像,最后对局部明场显微细胞图像进行预

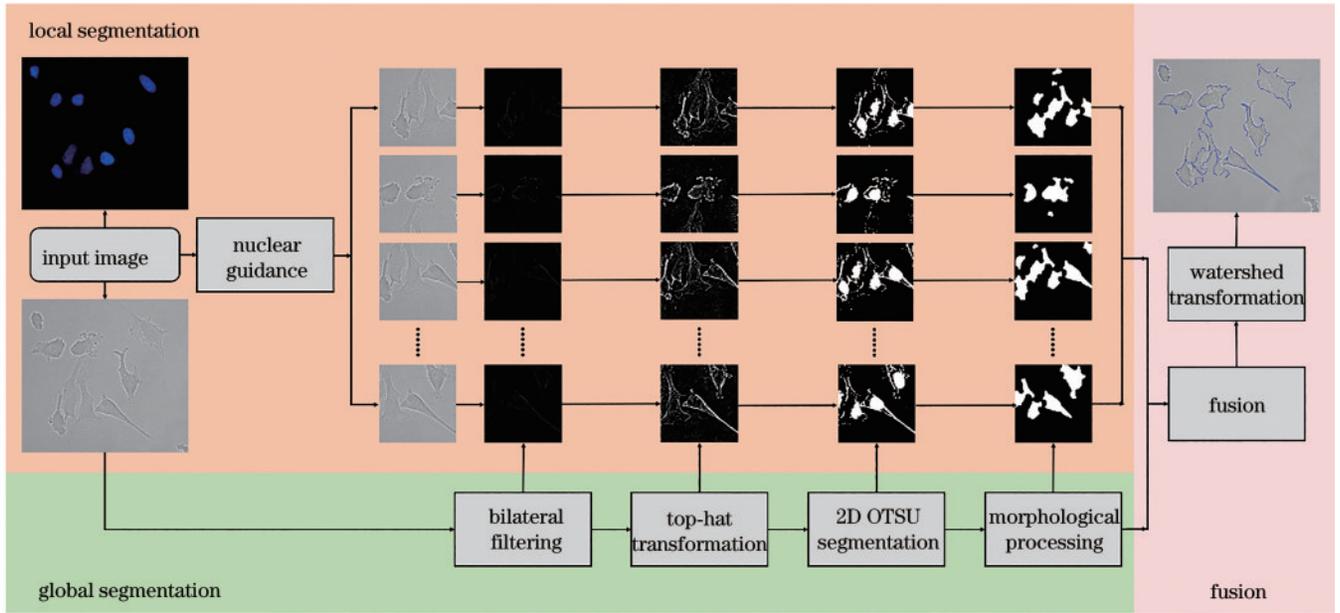


图1 基于细胞核引导的明场显微图像细胞分割方法的实现流程

Fig. 1 Flowchart of the implementation of a nucleus-guided cell segmentation method for brightfield micrographs

处理和分割。由于单细胞图像能够聚焦细胞物体，相比于全局细胞图像，受非均匀背景的影响较小，可以减弱非均匀背景的影响。具体实施步骤如下：

- 1) 将荧光细胞核图像转换为灰度图像；
- 2) 因为细胞核分布稀疏，粘连现象不严重，采用一维 OTSU 对其进行分割，得到细胞核二值化图像；
- 3) 对分割得到的细胞核二值图像逐一求取每个细胞核的质心，将质心坐标映射到明场细胞图像中，以质心为中心，得到一个 256×256 大小的明场单细胞局部显微图像；
- 4) 对明场单细胞局部显微图像进行双重高斯滤波和顶帽变换后，采用 2D OTSU 进行细胞分割；
- 5) 遍历所有细胞，直到所有明场单细胞局部显微图像分割完成。

2.1.1 局部细胞图像预处理

针对单细胞局部图像存在背景非均匀和对比度较差的问题，本文采用双重高斯滤波模型^[32]进一步减弱背景非均匀和增强对比度。高斯滤波器是一种线性滤波器，能够有效地抑制噪声和平滑图像，在图像处理中极为常用。其工作原理和均值滤波器类似，都是对窗口内部的像素进行均值输出的，但是窗口模板系数却随着距离高斯模板中心的增大而减小。由于单个高斯滤波只能去除噪声和平滑图像，并不能减弱背景不均匀的影响，因此通过构造两个内核大小不同的高斯滤波器，并进行差分运算以实现增强高频、减弱低频的目的，达到增强细胞边缘和消除背景不均匀的效果。

对细胞图像进行双重高斯滤波，关键是标准差 σ 的取值， σ 取值越大图像越模糊，保留的细胞边缘细节信息越少； σ 取值越小，图像越清晰，保留的细节信息越多。定义二维高斯滤波函数为 G ，通过选取不同的

标准差 σ_i ，构造两个大小不同的高斯滤波器 G_1 和 G_2 ：

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

式中： σ_i 为高斯函数的标准差，其半径服从 3σ 准则。定义双重高斯滤波处理后的图像为 f_{dg} ：

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

式中： f 为输入的细胞灰度图像； $*$ 表示卷积运算； G_1 为标准差取值更小的 σ_1 的小高斯滤波器； G_2 为标准差取值更大的 σ_2 的大高斯滤波器。

小高斯滤波器的 σ_1 取值原则是对原始细胞图像进行滤波后尽可能保留原始细胞大部分信息，文献^[32]根据细胞不可能为半径小于 3 像元的区域的特点，将 σ_1 取值为 1。本文借鉴 σ_1 的取值原则，为了充分保留细胞图像中的高频细节信息的同时滤除部分噪声，实验中 σ_1 取值为 1。而对于 σ_2 值，取值太小会影响低频信息的提取，间接影响高频信息的提取；取值太大，对分割结果改善不明显。为了选取合适的 σ_2 值，需要对其进行定量分析。固定小高斯滤波器的 σ_1 值为 1，令大高斯滤波器的 σ_2 的取值范围为 $[1, 50]$ ，两者作差值运算后得到双重高斯滤波后的图像 f_{dg} 。输出细胞图像 f_{dg} 的对比度能够通过图像的标准差体现，因为标准差越大，图像中细胞与背景的对比越明显。所以可以通过观察相减之后细胞图像的标准差确定 σ_2 的取值。以大高斯滤波器的标准差 σ_2 为横坐标，双重高斯滤波之后结果图像 f_{dg} 的标准差为纵坐标，对一幅图像中的所有细胞进行测试，结果如图 2 所示，选取了一幅明场图像中 10 个细胞的情况。观察图 2 可知，当 σ_2 值大于 20 时， f_{dg} 标准差的变化不明显，所以选取 σ_2 为 20 进行实验。

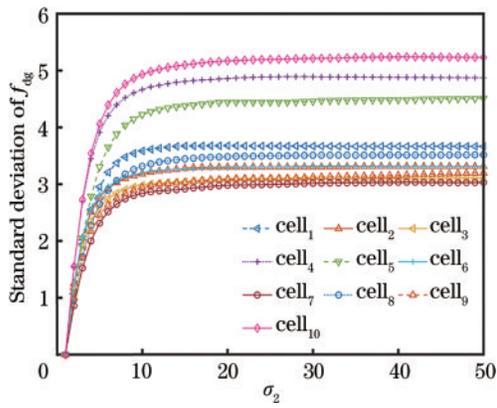


图2 高斯滤波器的 σ_2 取值和图像 f_{dg} 标准差的关系

Fig. 2 Relationship between the σ_2 value of Gaussian filter and standard deviation of the image f_{dg}

图3为双重高斯滤波后和局部处理后的实验结果。分析图3(c)可知,局部细胞图像经过双重高斯滤

波之后,细胞轮廓部分表现为黑色背景下的白色目标,并且局部细胞图像整体偏暗,导致细胞轮廓不突出。为了进一步增强细胞边缘信息,对双重高斯滤波后的图像再次采用顶帽变换处理。与其他图像对比度增强方法相比,顶帽变换具有简单、不易受噪声影响的优点,本质上属于组合形态学运算,即从原图中减去形态学开操作后所得的图像^[33]。顶帽变换和对比度调整的效果如图3(d)所示,可以看出相比于经过双重高斯滤波后的图3(c),图3(d)中细胞轮廓得到明显增强,细胞图像的整体对比度得到提高。

2.1.2 局部分割与形态学后处理

考虑到对局部明场细胞图像进行双重高斯滤波后减弱了大部分背景非均匀的影响,顶帽变换之后对细胞图像中细胞部分进行了增强,但是仍然存在噪声的影响,因此需要增强分割算法对噪声的鲁棒性。

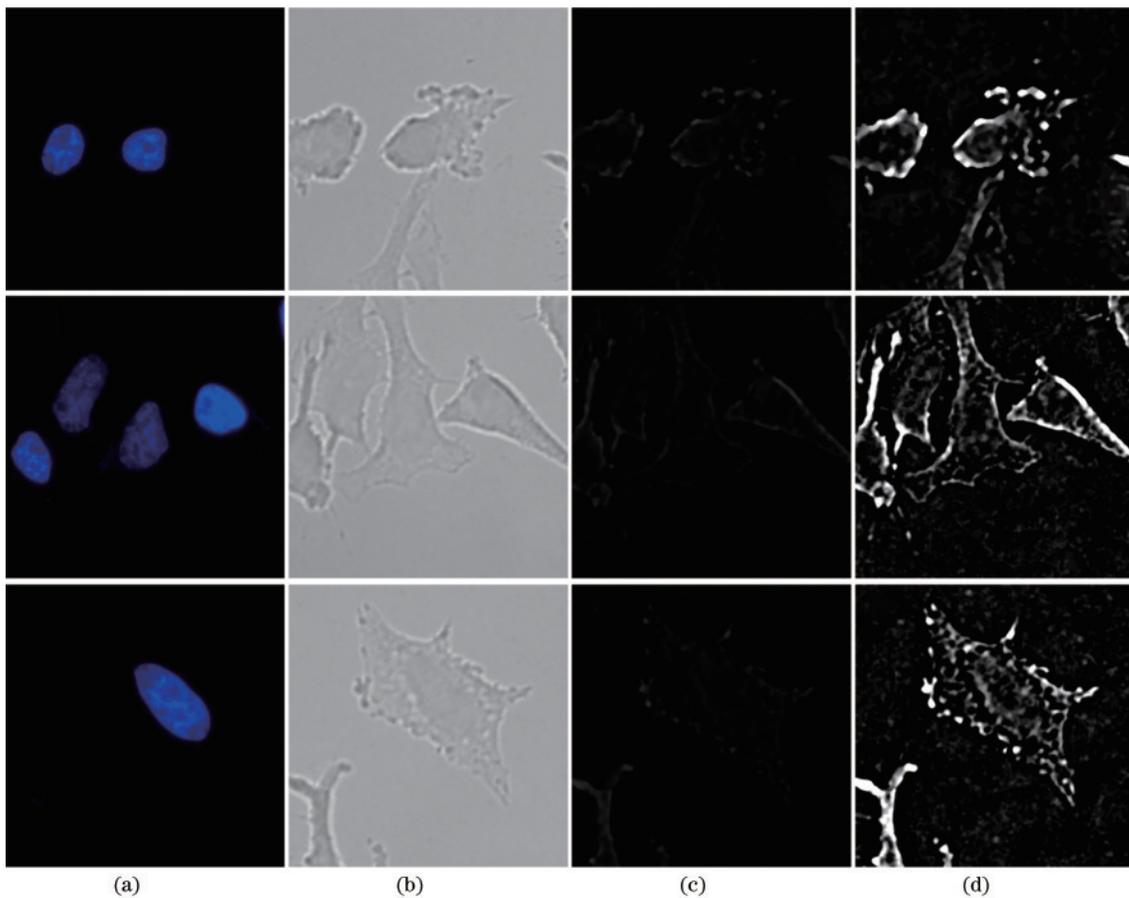


图3 双重高斯滤波和顶帽变换预处理后的对比图像。(a)荧光细胞核;(b)明场细胞;(c)双重高斯滤波处理后的图像;(d)顶帽变换处理后的图像

Fig. 3 Contrast images after double Gaussian filtering and top-hat transformation. (a) Fluorescent nuclei; (b) brightfield cells; (c) images after double Gaussian filtering; (d) images after top-hat transformation

一维OTSU^[34]可以快速分割细胞,但是不能区分灰度值与目标相似的噪声区域,所以采用2D OTSU对预处理后的明场局部细胞图像进行分割。传统2D OTSU分割是在二维上寻找最佳分割阈值(s, t)对前景和背景进行区分的(s 为灰度图像的分割

阈值, t 为邻域灰度图像的分割阈值),快速2D OTSU算法通过将计算值保存起来降低了计算量。文献^[35]在快速2D OTSU算法的基础上提出了一种基于分解的二维灰度图像阈值选取算法,将远离对角线区域的视作噪声,即将二维直方图的投影图中远离对角线的

区域忽略不计,将计算量降低到了原来的 1/2。将在二维上求取最佳分割阈值(s^* , t^*)的过程转换为分别求取两个一维上 s 和 t 最佳阈值的过程,最佳分割阈值(s^* , t^*)满足

$$\begin{aligned} \text{tr}\sigma_b(s^*, t^*) &= \max\{\text{tr}\sigma_b(s, t)\} = \\ &= \max_{0 \leq s \leq L-1} \{\text{tr}\sigma_b(s)\} + \max_{0 \leq t \leq L-1} \{\text{tr}\sigma_b(t)\} = \\ &= \text{tr}\sigma_b(s^*) + \text{tr}\sigma_b(t^*), \end{aligned} \quad (3)$$

式中: $\text{tr}\sigma_b$ 为类间散度,用其确定最佳阈值; L 为图像的灰度等级; i 和 j 分别为图像灰度值和邻域灰度值; $\text{tr}\sigma_b$ 和 $\text{tr}\sigma_{b_i}$ 分别为图像和邻域图像的类间散度。

因为局部明场细胞图像经过双重高斯滤波和顶帽变换后仍存在着噪声的影响,观察图 3(d)可知,细胞周围存在着表现为脉冲形式的白色噪声点,而中值滤波可以有效地消除孤立的脉冲噪声,因此选取局部细胞图像预处理后的邻域中值作为另一个维度,组成二维直方图后进行 2D OTSU 阈值分割,以增强算法的抗噪性。令输入图像为 $f(x, y)$,取每个像素周围 $\kappa \times$

κ 邻域像素点,则中值滤波后的图像 $m(x, y)$ 满足

$$\begin{aligned} m(x, y) &= \text{med}\left\{f(x+a, y+b) \mid a, \right. \\ & \left. b = -\frac{\kappa-1}{2}, -\frac{\kappa-3}{2}, \dots, \frac{\kappa-1}{2}\right\}. \end{aligned} \quad (4)$$

中值滤波窗口大小的选取对滤波影响效果不大,选取 5×5 的邻域范围进行中值滤波。经 2D OTSU 阈值分割后得到的结果如图 4(c)所示,仍存在空洞和杂质的影响。因此,需要图像形态学运算对分割结果进行优化。首先,为了填充细胞内部空洞并获取完整细胞区域,采用形态学闭运算填充空洞,闭运算选用的结构元素是半径为 8 的圆盘。其次,为了消除杂质,考虑到面积过小的区域不太可能为细胞,对局部明场细胞图像中所有细胞区域进行面积统计,取均值得到细胞的平均面积后,设定面积阈值为 1400 个像素,可以去除大部分杂质。最后,经过空洞填充和面积约束条件处理后得到的分割效果如图 4(d)所示,可以看出细胞内部空洞得到了填充并且大部分杂质得到有效去除。

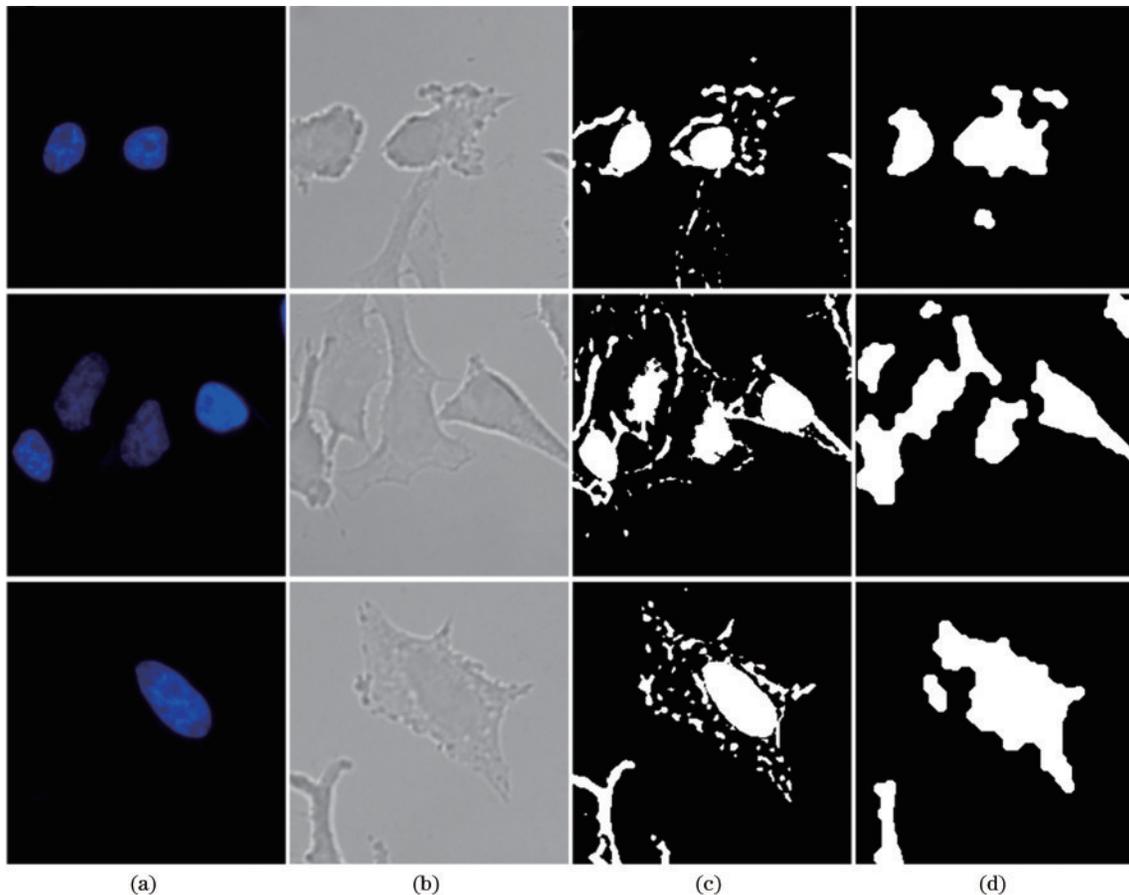


图 4 局部细胞分割图像。(a) 荧光细胞核图像; (b) 明场细胞图像; (c) 2D OTSU 阈值分割后的图像; (d) 二值形态学处理后的图像
Fig. 4 Local cell segmentation image. (a) Fluorescent nucleus images; (b) brightfield cell images; (c) images after 2D OTSU threshold segmentation; (d) images after binary morphology processing

2.2 明场显微图像细胞全局分割

由于细胞容易发生形变,同一细胞在不同的生长周期也会表达出不同的形状,导致局部明场细胞分割

中根据细胞核质心获取的矩形框可能并不能充分涵盖整个细胞。局部分割也没有考虑细胞像素之间的全局关系。这些原因都会导致后续细胞分割不完整。为了

充分得到细胞的细节轮廓信息,另外增加一条全局分割路线。全局分割是对整幅明场细胞图像进行处理的步骤,与局部明场细胞图像处理的步骤相同,包括了图像预处理和图像分割2步。其中,全局图像预处理包括双重高斯滤波以消除图像背景非均匀的影响和顶帽变换以增加对比度;全局图像分割使用2D OTSU 阈值分割获取细胞分割结果,并且同样采用形态学后处理优化分割结果。全局分割的目的是尽可能地保留细胞图像的细节信息,以获取完整的细胞轮廓信息,便于后续对细胞内部荧光点和荧光强度的分析。得到全局图像分割的结果后,对其与局部图像分割结果进行并

运算,得到相融合后的结果,表达式为

$$F = J \cup Q, \quad (5)$$

式中: J 为局部分割结果; Q 为全局分割结果; \cup 为并运算; F 为局部分割和全局分割的融合结果。图5(c)和图5(d)分别为局部分割和全局分割的结果,可以看出局部分割包含了细胞图像的主要信息,但是信息较为离散,而全局分割包含了图像的细节轮廓信息,信息较为连续但是容易缺失内容。图5(c)局部分割的方框部分包含了图5(d)方框中不存在的细胞内容,对两者进行并运算相融合后得到了细胞的完整信息。

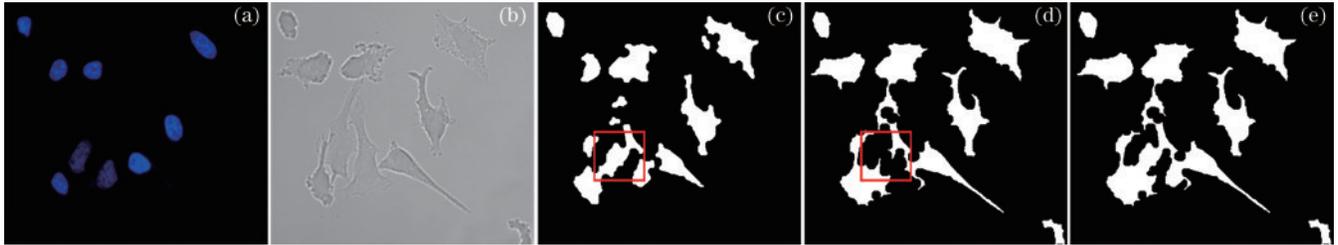


图5 细胞全局分割结果。(a)荧光细胞核图片;(b)明场细胞图像;(c)局部分割结果;(d)全局分割结果;(e)融合分割结果
Fig. 5 Global segmentation results for cell. (a) Fluorescent nucleus image; (b) brightfield cell image; (c) local segmentation result; (d) global segmentation result; (e) fused segmentation result

2.3 分水岭融合分割

如图5(e)所示,对局部明场细胞图像分割和全局明场细胞图像分割的结果进行并运算融合后,存在细胞粘连的问题,影响了分割的准确性,为了得到更加精确的分割结果,需要进一步处理细胞粘连的问题。文献[36]总结了粘连细胞分割的主要两种思路:基于边界跟踪的分割和基于数学形态学的分割。

分水岭算法^[37]是一种基于拓扑理论的数学形态学的分割方法,本质上属于区域增长法。其基本原理是:把图像看作测地学上的拓扑地面,图像中每一点像素

的灰度值对应着该点的海拔高度,每一个极小值及其影响的区域称为集水盆地,两集水盆地之间的大坝则形成了分水岭^[37]。该算法的实现可以模拟成洪水淹没的过程,首先图像的最低点被淹没,然后洪水逐渐淹没图像最低点所在的邻近区域;当水位到达一定高度时会溢出,此时在溢出边界处的修筑大坝即为分开各个盆地区域的分水岭。整个过程如图6所示,在图中洪水从箭头所指的最低部位开始淹没,当水淹没A点时,在其上方建立堤坝,当整个淹没过程结束后,在堤坝的B处将形成物体1和物体2的分水岭。

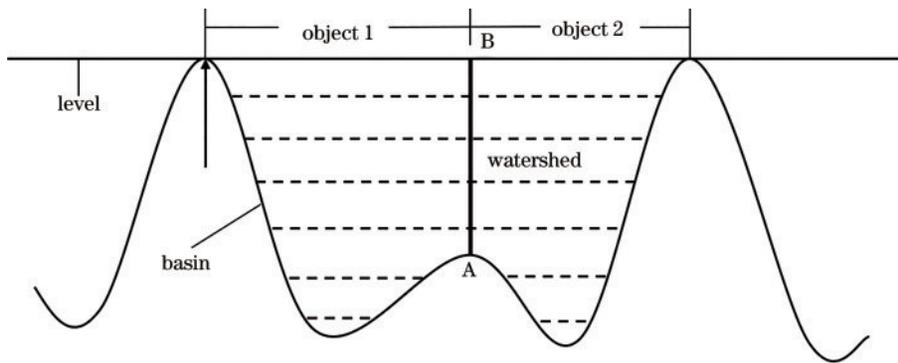


图6 分水岭算法示意图
Fig. 6 Schematic of the watershed algorithm

传统分水岭分割算法能够处理粘连目标的问题,但是特别容易出现过分割或者欠分割的问题。为了解决这个问题,Köppen等^[38]提出了一种标记分水岭算法,分割之前先对图像进行一些标记,并将标记分为前景和背景两类标记。将这些标记作极小值,同时屏蔽

存在的其他极小值,以此为基础再进行分水岭分割。该方法的难点在于需要根据先验知识产生标记点,如果缺乏先验知识,只能靠人工根据图像的特点进行设定。考虑到细胞核包含在细胞内部,并且局部明场细胞图像分割使用了细胞核图像为引导,因此利用细

细胞核二值图像为标记点。具体过程如下:首先对细胞核二值图像求补,之后进行距离变换并取负值得到 d_1 ;其次采用扩展极小值变换处理 d_1 ,获取掩模 $mask$,为了将标记强制作为局部极小值点,对 $mask$ 使用强制极小值变换,得到 d_2 ,减弱了过多局部极小值区域造成的过分割影响;最后将分水岭变换应用于 d_2 ,取 d_2 中强

度值为 0 的像元,即为分水岭,并使用面积约束条件从分水岭变换得到的细胞分割结果中去过度分割的部分。结果如图 7 所示,从图 7(d)和图 7(e)可知,粘连细胞部分得到了有效分割,提高了明场细胞分割的精确率。

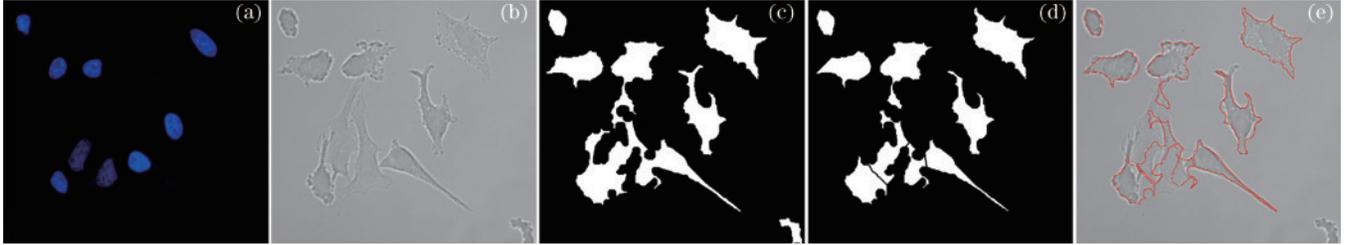


图 7 分水岭融合分割结果。(a)荧光细胞核图片;(b)明场细胞图像;(c)局部分割和全局分割融合后的结果;(d)分水岭分割处理;(e)利用 Canny 算子对图 7(d)进行边缘检测后,将检测结果叠加在原始细胞图像上的结果

Fig. 7 Watershed fusion segmentation result. (a) Fluorescent nucleus image; (b) brightfield cell image; (c) result after fusion of local segmentation and global segmentation; (d) result after watershed segmentation; (e) result of superimposing detection result on the original cell image using the Canny operator after the edge detection of the Fig. 7(d)

3 实验结果分析与讨论

3.1 实验平台及数据

实验选用 Leica DM6 B 正置双目生物显微镜对人类 Hela 细胞进行图像采样,采样方式为明场成像,分别在不同培养时期对其进行采样,得到了 3 组图像数据,得到的图片分辨率大小为 2048×2048 。每一组数据都包含 1 张明场图像、1 张细胞核图像、1 张荧光融合图像、1 张荧光强度图像和 4 张不同颜色的荧光点图像。选取每一组其中的 1 张明场图像和 1 张细胞核图像作为本次实验对象,为了方便展示,示例图只展示了细胞图像中存在目标细胞的情况。此外,全部实验使用 64 位 Windows 10 系统,主板为 3.20 GHz Inter(R) Core i7 (TM),16.00 GB 内存,采用 Matlab R2021b 软件实现。

3.2 评估指标

为了综合评估算法的分割效果,采用精确率 (precision, P)、召回率 (recall, R) 和 F 值 (F-score, F) 三类指标进行定量分析,表达式分别为

$$P = \frac{N_{TP}}{N_{TP} + N_{FP}}, \quad (6)$$

$$R = \frac{N_{TP}}{N_{TP} + N_{FN}}, \quad (7)$$

$$F = 2 \times \frac{P \times R}{P + R}, \quad (8)$$

式中: N_{TP} 为算法正确分割的细胞个数; N_{FP} 为算法错误分割的细胞个数; N_{FN} 为算法没有正确分割的细胞个数。精确率表示算法误检的概率,值越大,概率越小;召回率表示算法漏检的概率,值越大,概率越小;F 值是精确率和召回率的调和均值,表示算法的综合性能,值越大,表示算法性能越好。此外,还使用运行时间对算法进行评价,分别运行 5 次取平均时间。

3.3 细胞分割实验结果与分析

为了验证所提算法的综合性能,分别与最新的精确细胞图像分割方法包括 Jaccard 算法^[10]、dLoGH-Zhang 算法^[11]、sEGT 算法^[12]和 Flight 算法^[13]进行对比分析,从算法模型的精确率、召回率、F 值及对细胞图像中背景非均匀、边缘弱和细胞形状不规则的鲁棒性角度进行评价。实验中,所有数据均是在各自模型最优参数条件下获取的。各算法模型对不同生长周期内细胞密度图像的分割效果分别如图 8~10 所示。

图 8 所示的细胞图像中,明场细胞图像中细胞具有边缘弱和细胞形状不规则的特点,并且细胞周围也存在粘连现象。第 1 行为输入的原始荧光细胞核图像,第 2 行为输入的原始明场细胞图像,第 3 行为细胞分割结果,第 4 行为采用 Canny 算子对分割结果进行边缘检测后将结果叠加在原始明场细胞图像上的结果。通过对比图 8(a)人工标记的细胞分割真值区域可以看出:Jaccard 算法只能分割部分细胞区域;Flight 算法无法识别弱边缘细胞部分;dLoGH-Zhang 算法和 sEGT 算法正确识别了细胞区域,但是无法对粘连细胞部分进行区分;所提算法可以识别细胞区域并且对粘连细胞部分进行了分割。

图 9 展示了明场显微细胞图像存在轻微背景非均匀的问题。通过对比人工标记的细胞分割真值区域可知:所提局部分割和全局分割相融合的算法模型在背景非均匀的情况下仍可以准确地分割细胞,如图 9(f)所示;dLoGH-Zhang 算法和 sEGT 算法正确识别了细胞区域;Jaccard 算法和 Flight 算法则滤除了大部分细胞区域。图 10 所示细胞图像中,细胞形状不规则和背景非均匀现象突出。通过对比人工标记的细胞分割真值区域可知:Jaccard 算法容易受噪声影响,将细胞轮

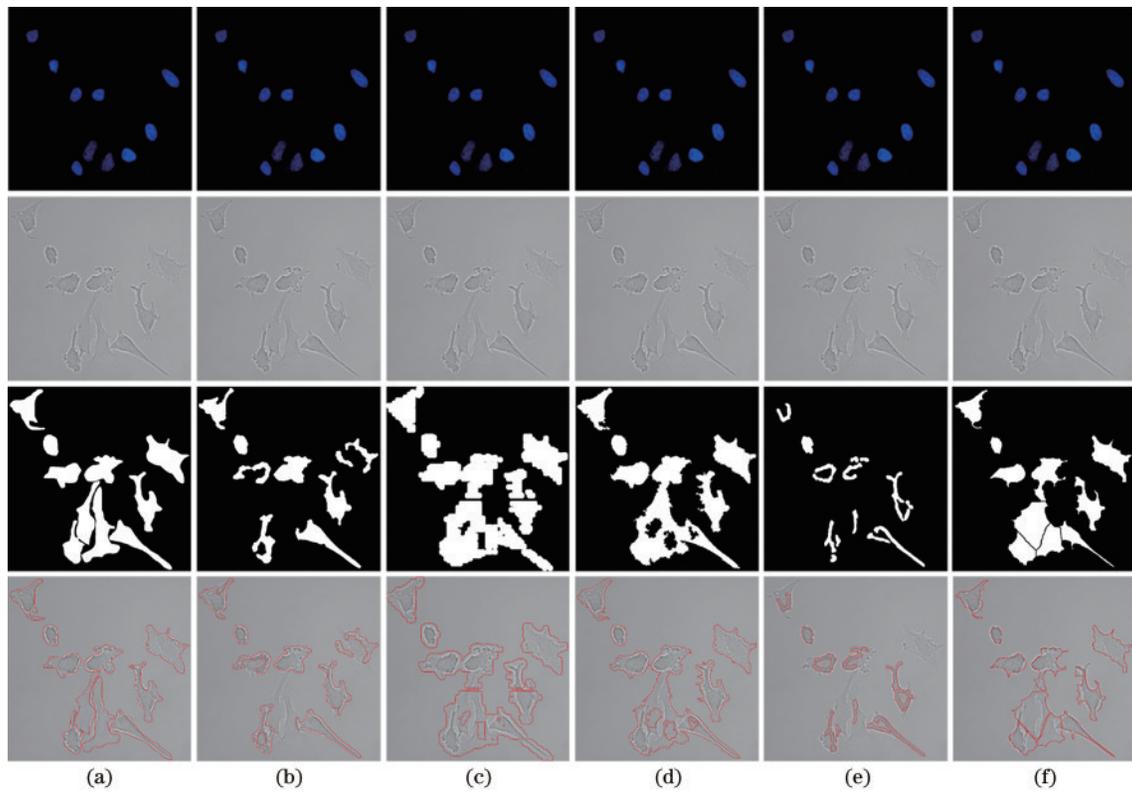


图8 第一组细胞图像分割实验结果。(a)标准细胞分割结果;(b)Jaccard算法;(c)dLoGH-Zhang算法;(d)sEGT算法;(e)Flight算法;(f)所提算法

Fig. 8 Results of the first set of cell image segmentation experiment. (a) Standard cell segmentation; (b) Jaccard algorithm; (c) dLoGH-Zhang algorithm; (d) sEGT algorithm; (e) Flight algorithm; (f) proposed algorithm

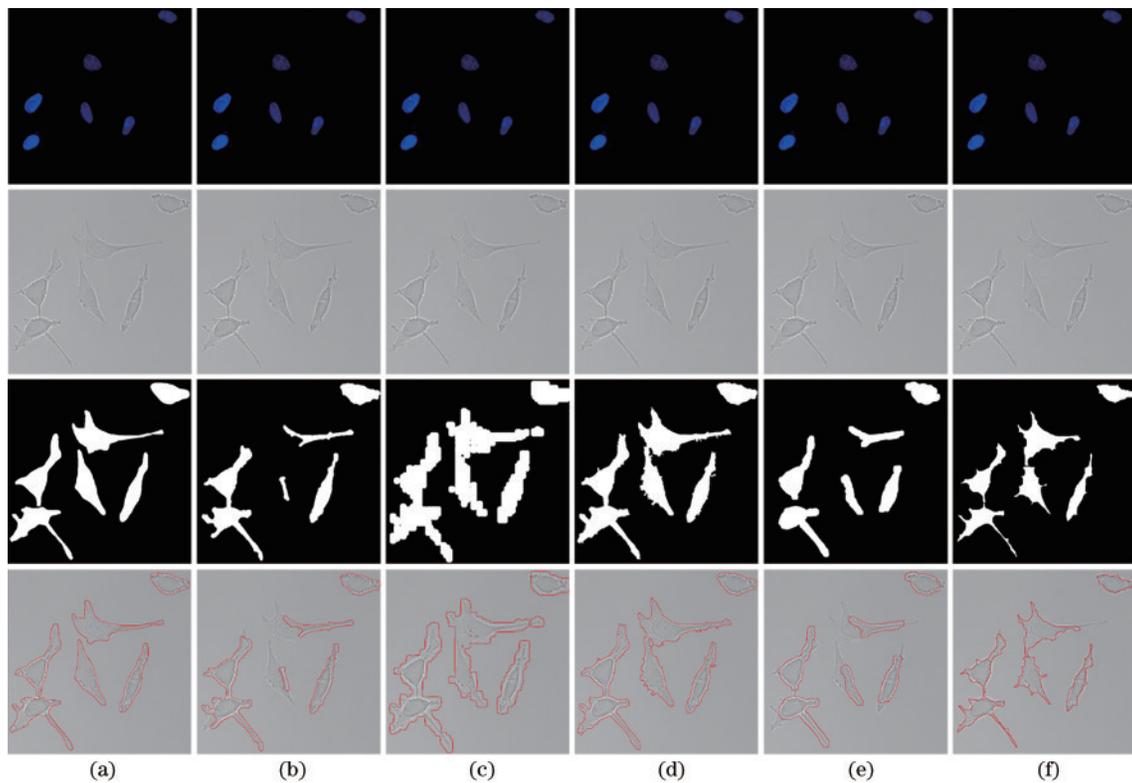


图9 第二组细胞图像分割实验结果。(a)标准细胞分割结果;(b)Jaccard算法;(c)dLoGH-Zhang算法;(d)sEGT算法;(e)Flight算法;(f)所提算法

Fig. 9 Results of the second set of cell image segmentation experiment. (a) Standard cell segmentation; (b) Jaccard algorithm; (c) dLoGH-Zhang algorithm; (d) sEGT algorithm; (e) Flight algorithm; (f) proposed algorithm

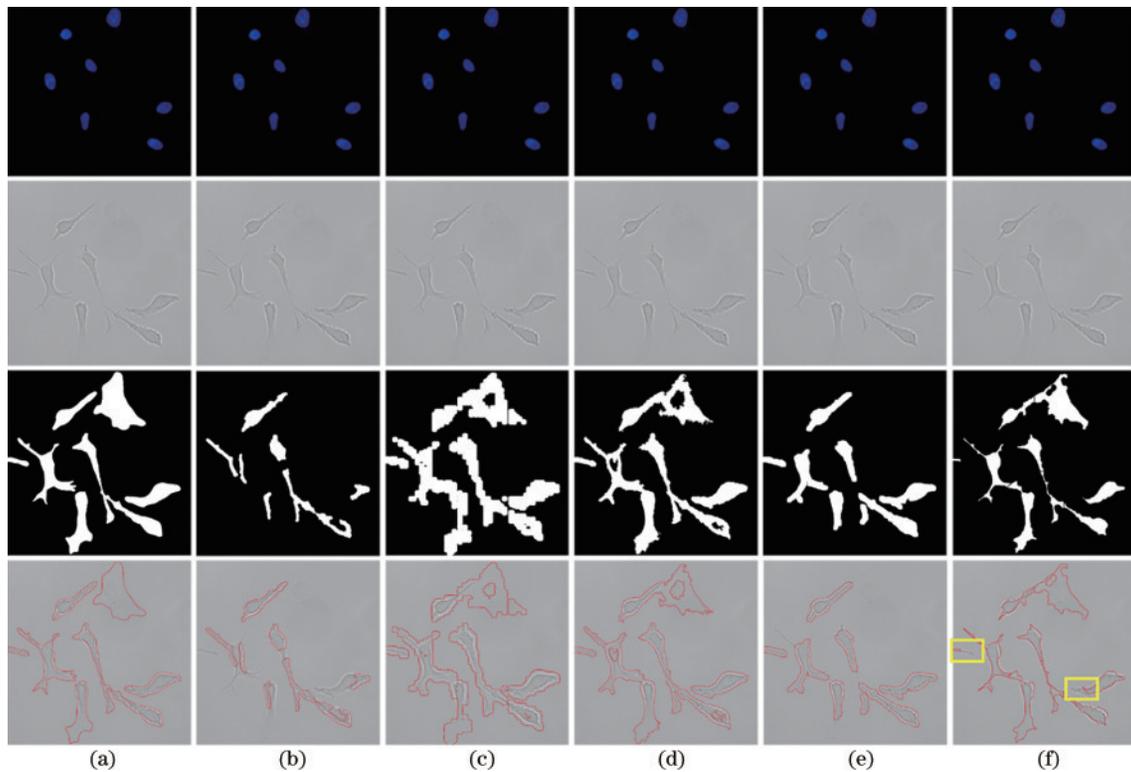


图 10 第三组细胞图像分割实验结果。(a)标准细胞分割结果;(b)Jaccard算法;(c)dLoGH-Zhang算法;(d)sEGT算法;(e)Flight算法;(f)所提算法

Fig. 10 Results of the third set of cell image segmentation experiment. (a) Standard cell segmentation; (b) Jaccard algorithm; (c) dLoGH-Zhang algorithm; (d) sEGT algorithm; (e) Flight algorithm; (f) proposed algorithm

廓分割成小部分,产生了过分割的结果,对于弱边缘细胞部分,容易将其当作背景从而得不到完整的细胞轮廓;dLoGH-Zhang算法对形状不规则的细胞能够有较好的分割效果,但是对于细胞粘连部分由于不能很好区分而产生了欠分割问题,对于弱边缘细胞图像容易产生过分割问题,后续结合一些其他处理目标粘连问题的算法后,分割效果可能得到改善;sEGT算法在处理细胞形状不规则和背景非均匀细胞图像时,整体分割效果较好,但在分割弱边缘细胞图像时处理的图像内部容易出现孔洞的问题,不能准确分割粘连细胞;Flight算法存在和Jaccard算法同样的问题,对噪声敏感,将细胞轮廓作为噪声处理,分割的细胞轮廓出现大量破碎的小斑点,处理弱边缘细胞图像时容易将细胞核背景混淆,过分割现象严重;所提分割算法由于结合了改进2D OTSU阈值分割算法,对噪声点进行了滤除,又采取二值图像数学形态学方法进一步进行细胞分割,对于粘连细胞部分,结合细胞核图像采用改进的标记控制分水岭分割算法进行处理,整体视觉分割效果是最好的,分割的细胞区域结果最准确。针对图10(f)方框中存在的细胞轮廓提取不完整的情况,进一步分析原因,在对明场细胞图像应用形态学面积约束条件时,要选择合适的面积阈值设置条件,设置的面积阈值过大,会导致原本属于细胞的一部分被当作噪声被消除,这样就降低了分割准确率。

除了从视觉效果进行主观评价外,还需要进行定量评价,各类算法对4组明场细胞数据集的分割结果的定量评价如表1所示。分析可知:dLoGH-Zhang算法和sEGT算法的精确率、召回率和F值都不是太高,原因可能是对粘连细胞部分的处理效果太差进而影响了分割的整体评价数值,但是sEGT算法的平均运行时间仅为0.40 s,表现出了较大的竞争力;所提算法在每一组数据集上的精确率、召回率和F值分别为0.960、0.984和0.971。实验结果表明,所提算法在处理细胞形状不规则图像、细胞边缘弱图像和背景非均匀图像时具有最好的分割效果。

表 1 不同算法分割结果对比

Table 1 Comparison of segmentation results of different algorithms

Algorithm	Precision	Recall	F-score	Time /s
Jaccard	0.817	0.681	0.743	1.55
dLoGH-Zhang	0.772	0.826	0.796	23.36
sEGT	0.785	0.824	0.802	0.40
Flight	0.804	0.861	0.830	0.12
Proposed algorithm	0.960	0.984	0.971	5.31

为了进一步验证所提算法是否适用于其他相同类型明场的细胞图片,选用另外一组包含细胞核的细胞数据作为验证。图11是对另一组细胞图片的分割结果,图11(a)为荧光细胞核图片,图11(b)为明场细胞图片,图11(c)为标准细胞分割掩模,图11(d)为所提

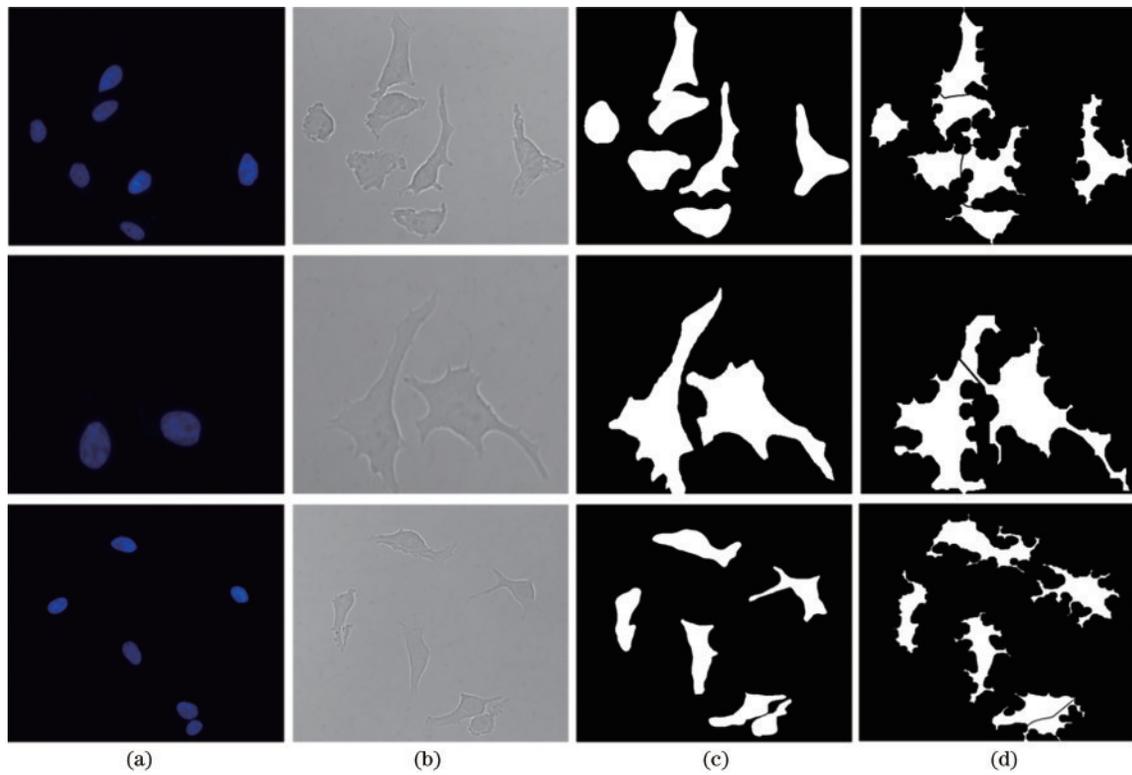


图 11 细胞分割结果。(a)荧光细胞核;(b)明场细胞;(c)标准细胞分割结果;(d)所提算法分割结果
 Fig. 11 Cell segmentation results. (a) Fluorescent cell nucleus; (b) bright field cell; (c) standard cell segmentation result; (d) segmentation result of the proposed algorithm

算法分割结果。分析可知,图 11(c)标准细胞分割结果和图 11(d)所提算法分割结果差别不大,基本上都能准确分割出细胞部分,较少把细胞轮廓细节当作噪声去除的情况。结果验证了所提算法适用于边缘弱和背景非均匀的明场细胞情况。

3.4 细胞计数

细胞在不同的生长周期有不同的表现,可以对

细胞数量的计数进行分析。常用的细胞计数工具是细胞分析仪,但是细胞分析仪会对细胞产生侵入性的损害。而图像分析作为一种非侵入性的方法,能够在不同生长周期对细胞进行计数,达到不损害细胞的目的。三组细胞计数结果如表 2 所示,分析可知,所提算法能够准确且较快地对细胞进行计数。

表 2 三组细胞图像计数结果对比
 Table 2 Comparison of cell image counting results in three groups

Algorithm	Group	GT	EN	N_{TP}	N_{FP}	N_{FN}	Precision	Recall	F-score	Time /s
Jaccard	1	32	29	24	5	8	0.828	0.750	0.787	1.55
	2	33	28	21	7	12	0.750	0.636	0.689	1.56
	3	33	26	23	3	10	0.885	0.697	0.780	1.56
dLoGH-Zhang	1	32	36	26	10	6	0.722	0.813	0.765	23.22
	2	33	40	27	13	6	0.675	0.818	0.740	23.14
	3	33	35	29	6	4	0.829	0.879	0.853	23.16
sEGT	1	32	32	28	4	4	0.875	0.875	0.875	0.57
	2	33	36	26	10	7	0.722	0.788	0.754	0.52
	3	33	31	26	5	7	0.839	0.788	0.813	0.52
Flight	1	32	38	26	12	6	0.684	0.813	0.743	0.12
	2	33	33	28	5	5	0.848	0.848	0.848	0.12
	3	33	38	30	8	3	0.789	0.909	0.845	0.12
Proposed algorithm	1	32	32	30	2	2	0.938	0.938	0.938	4.93
	2	33	33	33	0	0	1.000	1.000	1.000	5.21
	3	33	34	33	1	0	0.971	1.000	0.985	5.23

Note: GT is the result of manual cell counting, and EN is the result of cell counting obtained by algorithm.

4 结 论

针对明场细胞图像存在边缘弱、背景非均匀和细胞形状不规则的问题,提出了一种局部分割和全局分割相结合的方法,局部分割对单个细胞进行处理,全局分割对整幅图像进行处理。主要贡献有:1)对图像进行预处理操作,分别采用双重高斯滤波以减弱背景非均匀的影响和顶帽变换以增强细胞边缘;2)将预处理后的细胞图像和中值滤波后的细胞图像各作为一个维度,使用改进的 2D OTSU 阈值分割方法进行粗分割,之后采用二值图像数学形态学处理方法进一步细化细胞分割结果;3)将局部分割结果和全局分割结果融合后,最后结合细胞核图像,使用改进的标记控制分水岭变换对粘连细胞图像进行精确分割。实验结果表明,与其他分割算法相比,所提算法具有较高的准确性,能够有效对背景非均匀、形状不规则和边缘弱细胞图像进行分割,为研究后续细胞行为奠定基础。在未来的工作中,如何对密集细胞图像进行分割、得到细胞轮廓后如何对细胞内部的荧光点和细胞内部荧光强度值进行分析,是今后进一步的研究方向。

参 考 文 献

- Meijering E. Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences] [J]. IEEE Signal Processing Magazine, 2012, 29(5): 140-145.
- Zhang L. Phase contrast microscopy cell population segmentation: a survey[EB/OL]. (2019-11-25)[2022-03-06]. <https://arxiv.org/abs/1911.11111>.
- Tegunov D, Cramer P. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with warp[J]. Nature Methods, 2019, 16(11): 1146-1152.
- Buggenthin F, Marr C, Schwarzfischer M, et al. An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 297.
- Ali R H, Gooding M, Christlieb M, et al. Phase-based segmentation of cells from brightfield microscopy[C]//2007 4th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, April 12-15, 2007, Arlington, VA, USA. New York: IEEE Press, 2007: 57-60.
- Stringer C, Wang T, Michaelos M, et al. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation[J]. Nature Methods, 2021, 18(1): 100-106.
- Carpenter A E, Jones T R, Lamprecht M R, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes[J]. Genome Biology, 2006, 7(10): R100.
- McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, et al. CellProfiler 3.0: next-generation image processing for biology[J]. PLoS Biology, 2018, 16(7): e2005970.
- Edlund C, Jackson T R, Khalid N, et al. LIVECell: a large-scale dataset for label-free live cell segmentation[J]. Nature Methods, 2021, 18(9): 1038-1045.
- 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.
- Zhang M, Wu T, Bennett K M. Small blob identification in medical images using regional features from optimum scale[J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2015, 62(4): 1051-1062.
- Chalfoun J, Majurski M, Peskin A, et al. Empirical gradient threshold technique for automated segmentation across image modalities and cell lines[J]. Journal of Microscopy, 2015, 260(1): 86-99.
- 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.
- 张恒良, 李镛, 关欣. 一种改进的三维双路径脑肿瘤图像分割网络[J]. 光学学报, 2021, 41(3): 0310002.
- Zhang H L, Li Q, Guan X. An improved three-dimensional dual-path brain tumor image segmentation network[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(3): 0310002.
- 刘佳伟, 刘巧红, 李晓欧, 等. 一种改进的双 U 型网络的结肠息肉分割方法[J]. 光学学报, 2021, 41(18): 1810001.
- Liu J W, Liu Q H, Li X O, et al. Improved colonic polyp segmentation method based on double U-shaped network[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(18): 1810001.
- 赵欣, 王欣, 王洪凯. 融合注意力和 Inception 模块的脑白质病变端到端分割[J]. 光学学报, 2021, 41(9): 0910002.
- Zhao X, Wang X, Wang H K. End-to-end segmentation of brain white matter hyperintensities combining attention and Inception modules[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(9): 0910002.
- Moen E, Bannon D, Kudo T, et al. Deep learning for cellular image analysis[J]. Nature Methods, 2019, 16(12): 1233-1246.
- Xing F Y, Xie Y P, Su H, et al. Deep learning in microscopy image analysis: a survey[J]. IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems, 2018, 29(10): 4550-4568.
- Zhao T Y, Yin Z Z. Weakly supervised cell segmentation by point annotation[J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2021, 40(10): 2736-2747.
- Long J, Shelhamer E, Darrell T. Fully convolutional networks for semantic segmentation[C]//2015 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, June 7-12, 2015, Boston, MA, USA. New York: IEEE Press, 2015: 3431-3440.
- 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.

- [22] Falk T, Mai D, Bensch R, et al. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 67-70.
- [23] 朱琳琳, 韩璐, 杜泓, 等. 基于 U-Net 网络的多主动轮廓细胞分割方法研究[J]. *红外与激光工程*, 2020, 49(S1): 20200121.
Zhu L L, Han L, Du H, et al. Multi-active contour cell segmentation method based on U-Net network[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2020, 49(S1): 20200121.
- [24] Zhao T Y, Yin Z Z. Pyramid-based fully convolutional networks for cell segmentation[M]//Frangi A F, Schnabel J A, Davatzikos C, et al. *Medical image computing and computer assisted intervention-MICCAI 2018*. Cham: Springer, 2018, 11073: 677-685.
- [25] Gamarra M, Zurek E, Escalante H J, et al. Split and merge watershed: a two-step method for cell segmentation in fluorescence microscopy images[J]. *Biomedical Signal Processing and Control*, 2019, 53: 101575.
- [26] Robitaille M C, Byers J M, Christodoulides J A, et al. Robust optical flow algorithm for general single cell segmentation[J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0261763.
- [27] Minaee S, Boykov Y, Porikli F, et al. Image segmentation using deep learning: a survey[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2022, 44(7): 3523-3542.
- [28] Yi J R, Wu P X, Jiang M L, et al. Attentive neural cell instance segmentation[J]. *Medical Image Analysis*, 2019, 55: 228-240.
- [29] Biswas S, Barma S. A large-scale fully annotated low-cost microscopy image dataset for deep learning framework[J]. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2021, 20(4): 507-515.
- [30] 智绪浩. 显微图像细胞分割算法及其应用研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
Zhi X H. Research on segmentation algorithm of cell microscopic image and its applications[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018.
- [31] Ghaznavi A, Rychtarikova R, Saberioon M, et al. Cell segmentation from telecentric bright-field transmitted light microscopy images using a Residual Attention U-Net: a case study on HeLa line[EB/OL]. (2022-03-23) [2022-06-05]. <https://arxiv.org/abs/2203.12290>.
- [32] 吴京城, 施露露, 杜亚南, 等. 基于双重高斯滤波的细胞图像快速分割方法[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(2): 0210002.
Wu J C, Shi L L, Du Y N, et al. Fast segmentation method of cell image based on dual-Gaussian filtering[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(2): 0210002.
- [33] Bai X Z, Zhou F G. Multi scale top-hat transform based algorithm for image enhancement[C]//IEEE 10th International Conference on Signal Processing Proceedings, October 24-28, 2010, Beijing, China. New York: IEEE Press, 2010: 797-800.
- [34] Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms[J]. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, 9(1): 62-66.
- [35] 岳峰, 左旺孟, 王宽全. 基于分解的灰度图像二维阈值选取算法[J]. *自动化学报*, 2009, 35(7): 1022-1027.
Yue F, Zuo W M, Wang K Q. Decomposition based two-dimensional threshold algorithm for gray images[J]. *Acta Automatica Sinica*, 2009, 35(7): 1022-1027.
- [36] 徐露. 医学显微细胞图像分割算法及荧光强度提取研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
Xu L. Research on the medical microscopic cell image segmentation algorithms and fluorescence intensity extraction[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [37] Parvati K, Rao B S P, Mariya Das M. Image segmentation using gray-scale morphology and marker-controlled watershed transformation[J]. *Discrete Dynamics in Nature and Society*, 2008, 2008: 384346.
- [38] Köppen M, del Ruiz-Solar J, Soille P. Texture segmentation by biologically-inspired use of neural networks and mathematical morphology[J]. *NC*, 1998, 98: 267-272.