

doi:10.3788/gzxb20154407.0711004

细胞工厂光学显微成像与图像处理技术

嵇晓强¹, 程揭章¹, 李琦¹, 宫平¹, 郭瑞鹃², 于源华¹

(1 长春理工大学 生命科学技术学院, 长春 130022)

(2 吉林农业大学 工程技术学院, 长春 130118)

摘 要:针对细胞工厂监控系统长工作距和大倾斜角的观测需求,设计了一种结构简单、成像清晰的光学显微成像系统.由于获得的细胞图像光照和色彩不均、样本浑浊、细胞重叠、边界粘连较多、细胞间距不明显,采用单尺度 Retinex 算法进行图像预处理,并结合 Otsu 阈值分割法与 K 均值聚类法进行细胞图像分割处理,最后应用改进的快速连通区域标记以及高准确度细胞计数方法进行细胞个数统计.仿真实验和实际测试结果表明:该系统成像分辨率和清晰度均达到工程需求,能够较清晰地辨识出培养皿中细胞的形态和分布情况.细胞显微图像处理方法取得了良好的图像增强效果,弱化了由光照不均和样本浑浊造成的人眼视觉无法清晰分辨细胞的现象,消除了由于图像分割不到位造成统计误差,细胞计数准确度达到 95% 以上.该方法适合多种类型细胞监测与计数处理,可满足细胞工厂实时准确监控的要求.

关键词:细胞工厂;光电监测;显微成像;细胞图像增强;细胞图像分割;细胞计数;计数准确度

中图分类号:TP391.4

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2015)07-0711004-8

Optical Microscopic Imaging and Image Processing for Cell Factories

Ji Xiao-qiang¹, Cheng Jie-zhang¹, Li Qi¹, Gong Ping¹, Guo Rui-juan², Yu Yuan-hua¹

(1 School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology,
Changchun 130022, China)

(2 School of Engineering and Technological, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: A simple structure, clear imaging optical microscopic imaging system aiming at the requirement of long working distance and large tilt angle for the cell factories was designed. According to the characteristics of the cell images uneven illumination, sample turbidity, cell adhesion, cell overlap and the unobvious cell distance, the Retinex algorithm was adopt to pretreat the image, then a fast and compositive image segmentation algorithm based on the Otsu and K-means clustering was used to segmented the cell images, at last, an improved fast connected component labeling method and a rapid high precision cell counting method were applied to count the number of cells. The results of simulation experiment and actual test show that the imaging quality of the system achieved the project actual requirements for resolution and definition, and the morphological and distribution of cells in culture dish could be identified clearly. The cell microscopic image processing method has a good image enhancement effect, weakens the phenomenon caused by the uneven illumination and sample turbidity that human vision cannot clearly distinguish the cell, and eliminates the statistical error caused by that image segmentation is not in place. The cell counting accuracy is above 95%. The method is suitable for various cells, which can meet the requirements of real-time and off-line monitoring for cell factories.

Key words: Cell factories; Optical monitoring; Microscopic imaging; Cell image enhancement; Cell image segmentation; Cell counting; Counting accuracy

OCIS Codes: 110.2970; 110.0180; 100.2980; 180.4315

基金项目:吉林省科技发展计划项目(Nos. 20140311099YY,20130204035GX)资助

第一作者:嵇晓强(1982-),女,讲师,博士,主要研究方向为光电医学仪器及图像处理. E-mail: zuoanmulan@163.com

通讯作者:于源华(1953-),女,教授,博士,主要研究方向为生物传感. E-mail: yuyuanhua8888@126.com

收稿日期:2015-02-02;录用日期:2015-04-16

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

近年来随着生物医药业的快速发展,细胞工厂培养技术以其污染风险低、操作无菌性、操作方式便捷安全、占用空间少、可控性好等优点,已广泛应用于疫苗制造、细胞治疗、单克隆抗体制造行业^[1].细胞工厂是1-40层细胞培养装置,其内细胞的生长状态及活性直接影响产品的质量,因此对细胞工厂内细胞进行实时监控十分必要^[2].目前传统细胞观察监测多采用只能监测1-2层细胞的倒置显微镜,由于其非自动化、效率低等弊端,不能达到细胞工厂多层监控的要求,因而迫切需要对1-40层培养皿中细胞进行快速、动态、高分辨率、无菌质量监控及细胞显微图像实时分析^[3],以此来实现自动化的细胞培养和生产.

细胞工厂显微光电监控系统一般由光学显微成像系统、数字图像处理系统、冷光照明系统以及高精度机电伺服机械控制系统组成.监控系统平台通过横向、纵向导轨、光栅尺及旋转台实现显微成像光学系统对于细胞工厂的无死角观察^[4-5],能够对细胞工厂多层细胞培养皿进行实时、快速、自动、离线观测.这种显微监测装置及技术目前国内未见相关报导,国外仅有日本公司研发成功,但价格昂贵,且无细胞活性监测及细胞计数功能,设备待优化和改进^[6].

本文主要针对细胞工厂监控系统中显微成像和图像处理进行研究,设计了一种长工作距和大倾斜角的光学成像系统,并针对细胞显微图像特点,对前端光学显微系统获取到的细胞图像,在计算机图像处理平台上进行细胞图像显示、增强、分割、计数等处理,完成对多层培养皿中的细胞自动化实时监测.

1 长工作距、大倾斜角显微光学系统

细胞工厂光电显微监测系统工作原理如图1,通过伺服控制系统控制细胞工厂水平运动,以及倾斜一

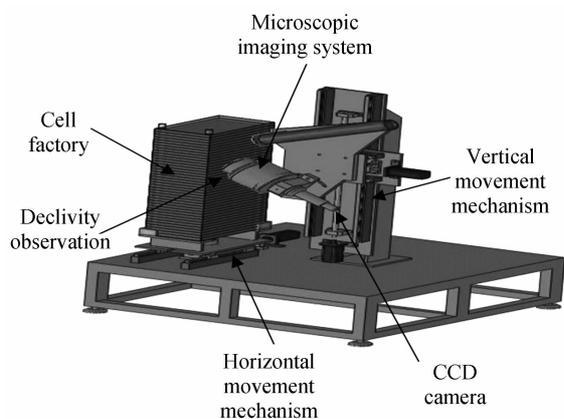


图1 细胞工厂监控系统原理

Fig. 1 The schematic diagram of cell factory monitoring system

定角度的长工作距显微镜的垂直运动,在照明系统的辅助下,细胞工厂培养皿所培养的细胞群,经显微镜头成像在后方的CCD(Charge-coupled Device)相机上,再传给图像处理平台进行显示和增强,细胞自动计数、存储、打印等处理,从而可实现细胞工厂1-40层培养皿自动观测的目的.

对细胞工厂而言,为达到清晰观察1~40层培养皿细胞的目的,要考虑单层培养皿尺寸限制(长、宽、高分别为:335 mm×205 mm×17 mm),监测系统需要透过培养层斜置观测底面细胞,要求光学系统斜视一定角度成像^[4].设计中发现,当45°角观测细胞时所需工作距离最小.当数值孔径相同,物方孔径角也相同的情况下,工作距离越大,第一片透镜口径就会越大,此时不易加工与装调,且更易引进杂光,会导致光学系统成像的清晰度下降.因此在光学系统设计时不仅要考虑到显微物镜是小像差系统,而且要尽量减小像差和杂光对系统成像的影响.

显微镜头在具备较高分辨率和放大倍率的情况下,还需具备较长的工作距离.考虑到每层培养皿中细胞的培养方式和生长状态基本一致,为了节省观测时间,只需观测到每层培养皿的部分区域即可,这样减轻了设计超长工作距离的负担.通过实际测量和计算得到,初定斜置45°观测每层培养皿底细胞时,第一片透镜中心距最近观测面为80 mm左右,所以设计确定工作距离为84.5 mm.

由于旋转平台观测手段可360°观测,为了能分辨出单位视场内的大量细胞,显微光学设备放大倍数定为5,通过后端CCD元件接以视频显示器进行二次放大40倍,因此整个显微光学系统综合放大倍数为200,辅以图像处理方法可实现细胞显微图像的清晰观测.

综合考虑各方面问题,最终确定系统参量为:数值孔径(Numerical Aperture, NA)为0.3时,显微镜的可分辨最小距离为1.1 μm,显微镜头组及CCD接视频显示器组合放大倍数为200,前工作距离为84.5 mm.

设计的光学系统分为两部分,光学显微成像系统和CCD成像系统.其中光学显微成像系统又分为两部分,即前端物镜结构和后端光路设计^[4].在设计上采用李斯特显微物镜作为初始结构形式,后方为卡塞格林系统.

中倍李斯特型消色差物镜采用两个双胶合透镜的组合,放大倍率为(5~20)×,数值孔径NA为0.2~0.3.在第一组负光焦度透镜中加入环形光阑以消除杂光干扰并校正像散.

在设计中以两组透镜中心作为对称轴,每个双胶合组分别消色差,可同时有效校正轴向色差与垂轴色差,消色差方程为

$$\begin{cases} \frac{\Phi_1}{v_1} + \frac{\Phi_2}{v_2} = 0 \\ \Phi_1 = \Phi_2 = \Phi \end{cases} \quad (1)$$

设计的显微监测传统的卡塞格林光学系统属于反射式系统,无色差.为了得到大数值孔径,口径可以做得很大,尽可能接收多的能量.卡式系统可以在减少光学元件个数的同时消除球差,系统像差较容易校正.图2为设计的显微装置光学系统图.显微系统基本参量为:数值孔径 NA=0.3,工作距离为 84.5 mm,系统所能分辨的最小尺寸为 1.1 μm,足以满足看清与分辨细胞的要求.

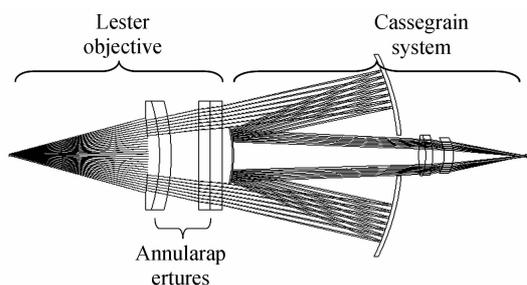


图2 显微成像光学系统图
Fig. 2 The micro imaging optical system diagram

根据景深公式可知,增大数值孔径能够满足显微镜分辨率的要求,但同时光学系统斜视观察会降低光学系统的景深,使清晰成像的物平面范围变小,不便于观测^[4].本系统采用转向棱镜组的方式来增大景深,如图3.

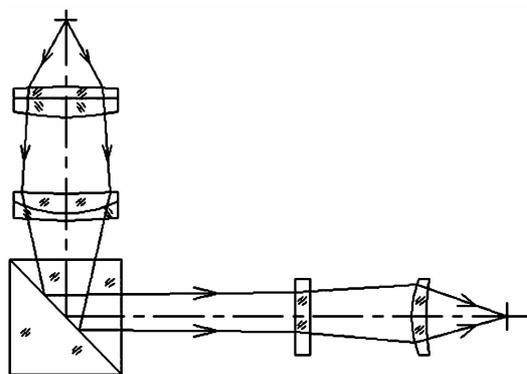


图3 转向棱镜及透镜组原理图
Fig. 3 The principle diagram of steering prism and lens group

后端的 CCD 相机选用 MV-UC20 型高分辨率工业相机,其分辨率为 1 280 × 960,光学系统技术参量为:焦距 60 mm,线视场 0.6 mm,像高 6 mm,系统调制传函 (Modulation Transfer Function, MTF) 截止频率 133 lp/mm. MTF 传递函数曲线如图 4, MTF 值在中频 66 lp/mm 时大于 0.5,在高频 133 lp/mm 时大于 0.3,接近衍射极限.各视场的子午和弧矢重合较好,有较好的成像质量.

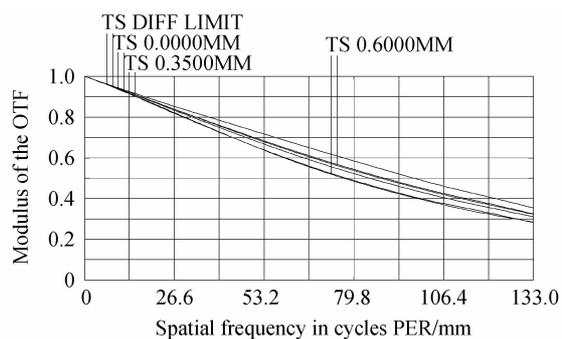


图4 MTF 传函曲线图
Fig. 4 MTF transfer function curve

2 基于 Retinex 理论的细胞显微图像增强处理

采集细胞显微图像时,通常将焦点对准细胞区域,而背景处于离焦状态.设计的光学显微成像系统在采集细胞图像时,由于光照强度对其影响较大,照明系统光照过强或过低以及局部照明不均匀,使得细胞显微图像的对比度较低、亮度不均匀、颜色不一致.同时,伺服系统控制准确度也会影响显微镜焦点聚焦细胞区域的准确性、培养皿内液体的流动、样本浑浊等问题,会导致细胞图像模糊不清、噪声较多.而细胞特有的复杂结构特性,如大小各异、形状不规则且粘连分布,细胞边缘的灰度值比较低,边界不明显,细胞内部灰度值不均衡,同样会造成图像模糊.这些问题会给细胞显微图像分割和计数带来相当大的困难.

因此,前端获得的细胞图像需要进行对比度增强和色彩、亮度不均匀校正与调节.传统的彩色图像增强方法如对比度调整、直方图均衡、色彩空间变换处理等,都很难同时实现细胞图像对比度增强以及亮度和色彩校正. Retinex 理论利用人眼的视觉特性这一优势,可以实现压缩图像动态范围、增强边缘清晰度和颜色恒常,是彩色显微图像处理的有效方法^[7-8].所以本文采用单尺度 Retinex 图像增强方法用以处理彩色细胞显微图像.

单尺度 Retinex 图像增强算法实现过程为:

1) 设原始图像 F 是环境亮度 I 和反射率 R 的乘积,则在对数空间中,计算得到的反射分量为

$$\log R(x, y) = \log F(x, y) - \log I(x, y) \quad (2)$$

2) 环境亮度图像可以看作环绕函数和通道光强卷积的表达式,即

$$\log I(x, y) = \log [G(x, y) * F(x, y)] \quad (3)$$

3) 令 $r_i(x, y) = \log R(x, y)$, 则单尺度 Retinex 在对数域中的表达式为

$$r_i(x, y) = \log F_i(x, y) - \log [G(x, y) * F_i(x, y)] \quad (4)$$

式中, $F_i(x, y)$ 为环境亮度,即原始图像的第 i 个颜色分量, $r_i(x, y)$ 是 SSR 理论算法输出, $G(x, y)$ 是低通卷

积的环绕函数表达式.

采用高斯卷积形式是为了在原图像中估算亮度图像 $I_i(x, y)$, 其表达式为

$$G(x, y) = \lambda e^{-(x^2+y^2)/c^2} \quad (5)$$

式中 λ 为归一化常量参量, C 为尺度因子, 决定卷积核的作用范围. 通过实验分析将 C 值选在 80 左右.

利用单尺度 Retinex 算法实现对模糊不清、光照不均匀、色彩有偏差的细胞显微图像进行对比度增强和色彩、照度不均矫正处理, 实验取得了良好的效果, 为进一步的细胞图像分割和计数做好了预处理工作.

3 细胞显微图像分割处理

考虑到细胞工厂显微光电监控系统对实时性和自动化程度的需求, 同时兼顾细胞图像特点, 采用一种混合分割方法. 首先利用 Otsu 阈值分割法对细胞显微图像进行全局粗阈值分割, 得到二值化图像^[9]; 接着在综合考虑分割效果和算法复杂度的前提下, 采用 K 均值聚类算法对图像进行细分割; 最后结合空洞填充法、形态学处理和中值滤波, 进一步优化得到最终分割图像. 混合分割原理流程如图 5.

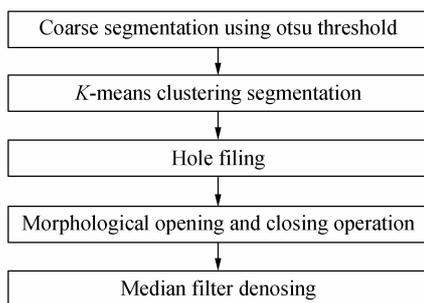


图 5 细胞显微图像分割流程图

Fig. 5 The schematic diagram of microscopic cell image segmentation

K 均值聚类算法为细胞显微图像分割处理的核心, 通过分析现有的 K 值、原始聚类中心的选择方法和实验结果, 给出了一种聚类准确性高且处理时间短的方法, 其中选取聚类数目 K 为 5^[10]. 采用欧式距离作为准则函数. 原始聚类中心的选取方法为灰度取平均值法, 即根据直方图将图像的 0~255 个灰度级分为 K 大类, 计算每一类像素灰度平均值作为聚类中心, 将整幅图像全像素灰度平均值作为初始聚类中心, 实现对整幅图像的细分割处理^[11].

对于细胞分布比较密集的图像, 获得的图像各细胞连通域之间通常存在粘连、突出、边界缺口以及微小空洞, 采用形态学图像处理办法进行优化. 首先对图像进行开运算, 再进行闭运算, 即

$$\begin{cases} A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \\ A \cdot B = (A \oplus B) \ominus B \end{cases} \quad (6)$$

根据实际实验, 结构元素 B 选取半径为 5 的方形

结构元素. 综合运用形态学开闭运算断开了细胞边界狭窄的粘连, 去掉了不规则突出后, 又将边界缺口补全, 填充了细小空洞^[12-14].

进一步对该细胞显微图像分割结果采用背景比法进行优化, 填充了较大的被边界包围而无法被结构元素填充的大型空洞.

最后采用中值滤波去除极小噪音点, 消除多余连通域. 细胞图像经过处理, 能够较快地获得分割结果, 同时有效解决细胞分布密集、粘连、细胞边界不清晰等问题, 能将目标图像转化为只有 0 和 1 像素点的二值图像, 为后续的细胞计数打下了良好的基础.

4 显微图像细胞计数

细胞计数是细胞显微图像分析的重要环节, 细胞显微图像分割结果里存在若干个细胞连通区域. 为准确判定和统计这些连通区域个数, 采用改进的快速细胞连通区域判定方法、标准细胞判定方法和基于面积的细胞个数统计来最终完成细胞计数^[15].

4.1 细胞图像连通域标记方法

目前传统的图像连通区域标记方法主要是四邻域和八邻域扫描查找方法, 其中后者较为常用, 但是该算法需要遍历每个像素点的邻域内其它八个像素点, 这就造成了很多像素或邻域的重复查找, 计算量增多^[16].

为此, 本文提出一种改进的连通区域标号算法, 运行速度更快, 其连通区域标记实现步骤为:

1) 扫描并去除全部图像距离边界 1~5 个像素的区间范围, 以避免边界不完整连通区域的干扰, 生成新图像 A .

2) 对 A 进行自左上至右下的遍历查找, 找到未标记的初始连通区域边界起始查找点 $First$, 即未被标记过的像素值为 1 的点. 未标号的像素值为 1 的点统称连通区域像素点 X .

3) 如图 6(a), 对该点八邻域按顺时针遍历查找 (上邻域为起始), 在发现第一个 X 点时停止 (该点上一查找点为 C).

4) 在程序检查缓存数组 S 中记录 C 坐标, 每查找到新 X 点便用其上一查找点替换 C 坐标.

5) 以该 X 点为新起始点, 八邻域遍历找到新 X 点, 重复步骤 3)~5), 直至找到全部连通域后结束, 即程序无法找到新 X 点时.

6) 执行遗漏检查, 如图 6(b). 自上邻域起顺时针遍历 C 八邻域, 是否有之前未标记过的遗漏的该连通区域点. 若有, 将第一个错误点标记为该连通域内部点, 并以此为新 X 点重复步骤 5), 直到结束; 若没有, 则程序未发生错误, 重复步骤 2)~6) 完成整幅图像多个连通域的全部标记.

	1	2	3	4	
Begin	15	13	11	9	5
	14	12	10	8	6
				7	

(a) Neighborhood labeling sequence

	1	2	3	4	
Begin	15	13	11	9	5
	Checking point 14	12	10	8	6
	20	16	17	7	
		19	18		

(b) Fault detection

图6 连通域标记示意图

Fig. 6 The sketch map of connected component labeling method

4.2 标准细胞判定和细胞个数统计

本文采用了基于数学统计学的标准细胞判定方法和计数准则^[17],只要效果相对良好的分割图像中标准独立细胞(即标准连通区域)个数大于粘连细胞区域(即粘连单一连通域)数目,就能够相对准确地计算出标准细胞大小和细胞个数。

大量的实验验证发现,在本文设计的光学系统放大倍率及分辨率下获得的不同类型、不同疏密分布的细胞显微图像,其真实细胞连通区域实际像素个数存在一个区间,即介于200~3 000个像素范围内,包含过小和过大的像素个数的连通区域,绝多数情况下(90%以上)为过分割区域、错分割区域、噪音区域及死细胞区域。

图7给出了细胞计数算法的实现流程:首先将连通区域大小分为若干个区间,像素个数小于200和大于3 000的连通区域不进行统计,仅统计单一连通区域像素个数在200~3 000范围内的,每200像素梯度为一个区间,分别统计在各个区间内符合条件的细胞连通区域个数,个数最多的即被认定为标准区间,认为标准细胞大多存在于这个集合中^[18]。

一幅分割后的图像,只要具有相对良好的分割效果,其中得到准确分割的标准细胞数目一定是占大多数的,只有少数为粘连区域。此时,通过细胞图像连通域标记法统计出的细胞连通区域集合就较为准确。

为进一步提高精确度,在标准区间内对所有连通

区域的像素个数求均值,认定该均值为标准细胞大小即细胞面积。随后统计整幅图像各个连通区域面积。

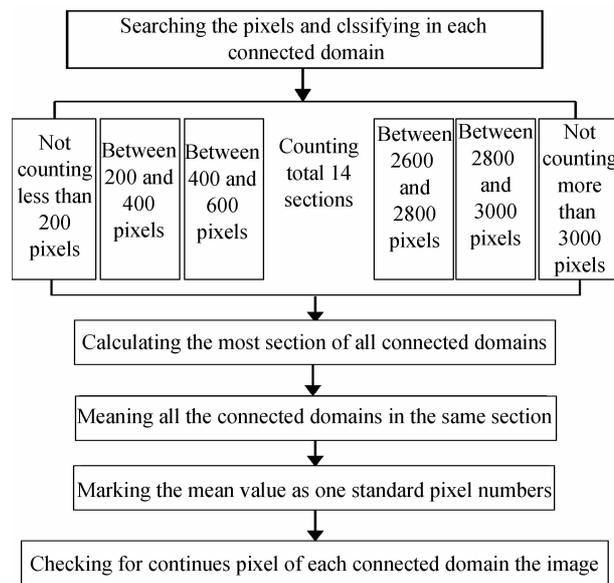


图7 基于统计学的标准细胞判定方法

Fig. 7 The determine standard cell method based on statistics

根据判定的标准细胞,规定细胞连通域判定规则为:对于单个细胞面积小于标准细胞面积0.5倍的不予计数,介于0.5~1倍之间的计1个,对于单个细胞面积大于标准细胞的,大于几倍计几个^[18-19]。

5 实验结果与分析

利用前端设计的光学成像系统获取不同类型的密集型和稀疏型细胞显微图像,应用本文方法进行图像增强和分割处理并统计细胞个数,与文献[20]和文献[21]的算法结果进行了对比分析,实验结果如图8和图9。其中,文献[20]采用的方法是基于对比度拉伸变化和HSV色彩空间(Hue, Saturation, Value)转换的彩色图像增强方法,文献[21]采用的方法是基于模糊C均值聚类图像分割方法。所有算法在计算机上利用Matlab7.1软件编程实现。

由图8的图像增强实验结果可以看出,基于单尺度Retinex的图像增强算法对原始图像增强后,对比度得到了明显加强,细胞区域与背景色反差明显,亮度及色彩饱和度有了较大提高,人眼视觉效果明显优于对比文献结果。

图9给出的图像分割实验结果表明,与文献[21]所采用的基于模糊C均值聚类图像分割方法相比,本文提出的混合分割方法的分割效果更佳,噪音点较少,细胞连通区域完整性高,细胞边界平滑且明显,错分割现象较少,细胞间隙明显,只有少数细胞粘连区域,其个数远小于标准细胞个数,基本不影响细胞计数准确率,整体效果优于对比文献算法。

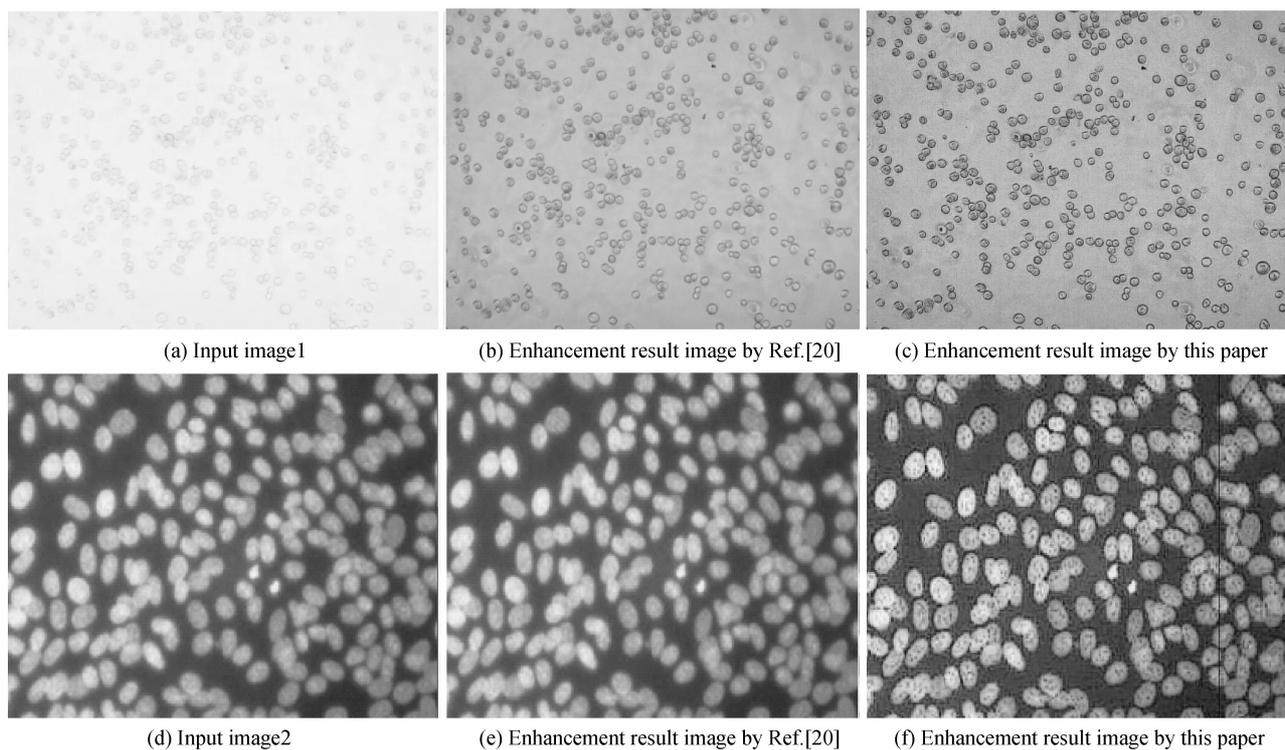
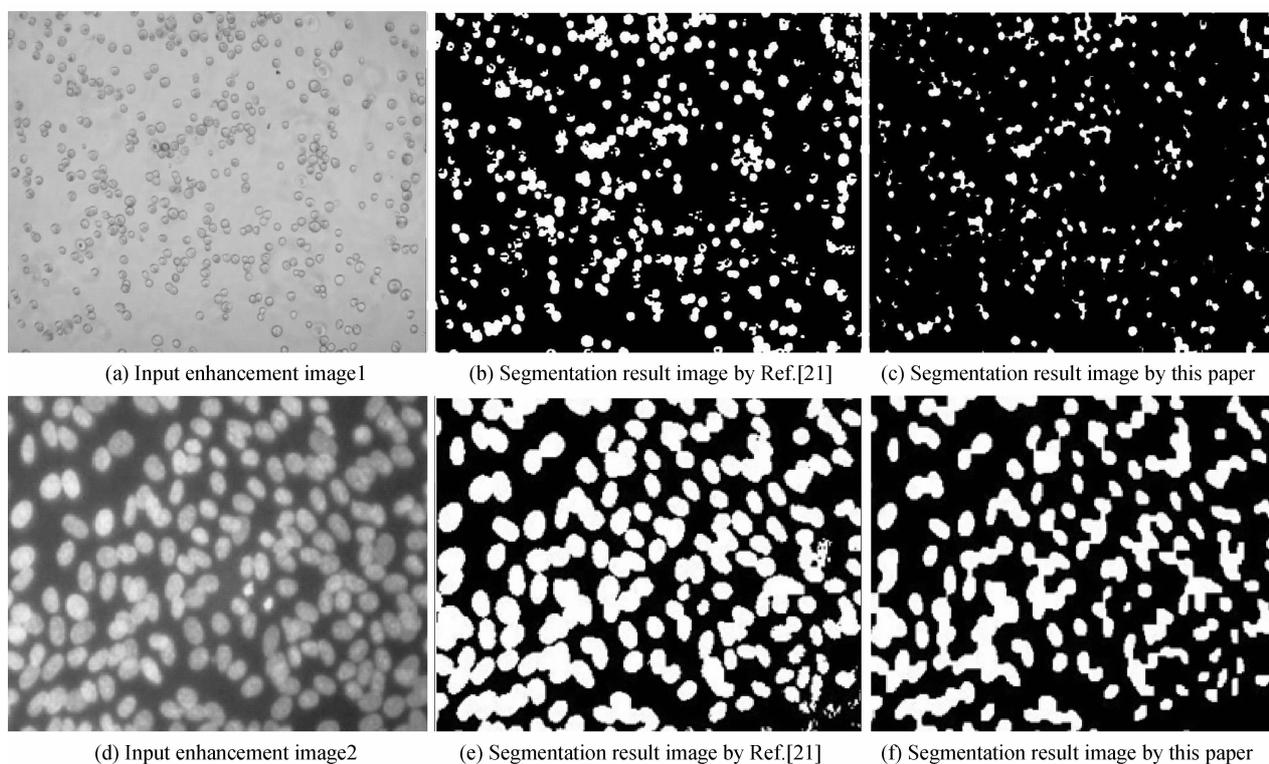


图 8 图像增强效果对比图
Fig. 8 The compared results of image enhancement



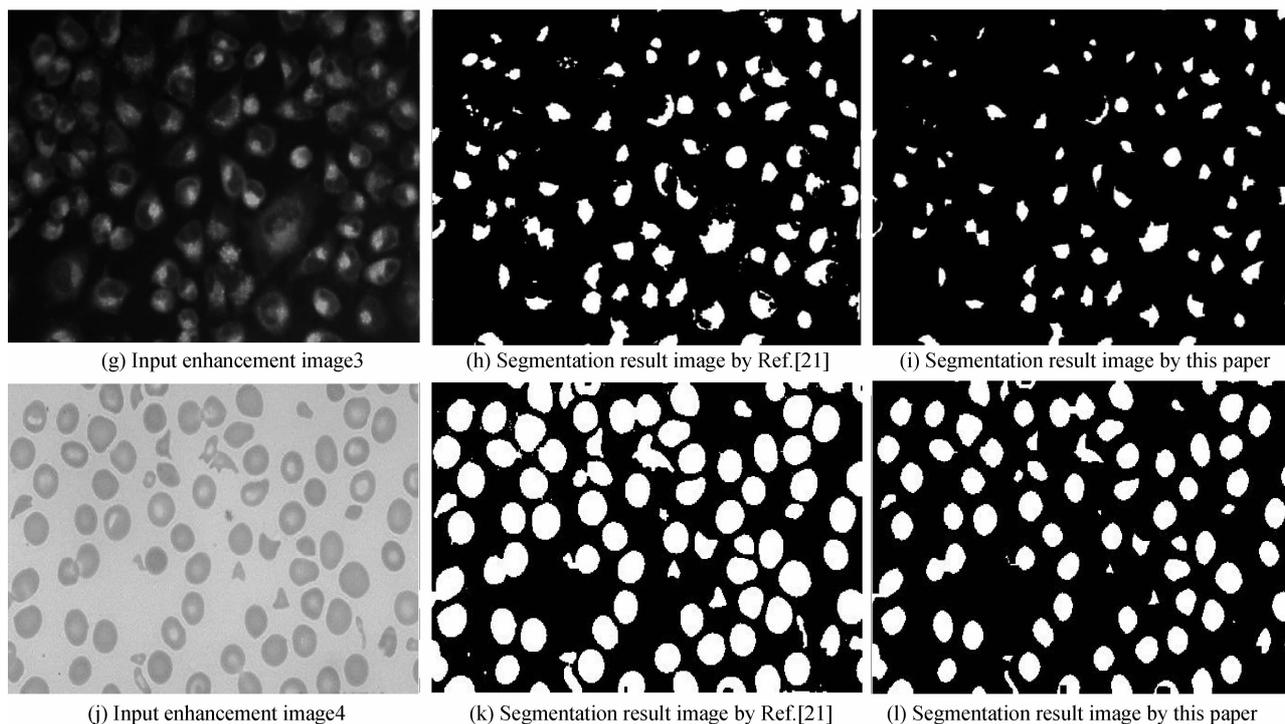


图9 图像分割效果对比图

Fig. 9 The compared results of cell image segmentation

本文对图像分割后的细胞显微图像进行连通区域标记、标准细胞判定和基于面积的细胞个数统计. 表1给出了算法的计数结果,并与人工计数结果进行了对照. 结果表明:本文算法弱化了粘连细胞连通域对计数准确度造成的影响,计数准确度较高,达到95%以上. 对大量不同类型的密集型细胞图像以及稀疏型细胞图像进行处理,结果表明算法具有良好的参量适应性和较强的通用性.

表1 细胞计数准确度对比表

Table 1 The compared table of counting accuracy

Classify	Input image 1	Input image 2	Input image3	Input image 4
Manual counting results	302	191	89	62
System counting results	293	186	91	64
Counting accuracy	97.0%	94.7%	97.8%	96.8%

6 结论

本文设计了一种结构简单、成像清晰并适用于细胞工厂光电监测设备的长工作距、大倾斜角显微光学成像系统. 采用了基于单尺度 Retinex 的图像增强优化方法、基于 Otsu 阈值分割与 K 均值聚类分割相结合的混合图像分割方法、快速连通域标记判定方法以及基于数学统计学和面积的细胞计数方法. 实验结果表明这些方法能有效对细胞显微图像进行增强和分割,

增强后图像对比度良好,图像细节清晰,分割后细胞边界清晰可见,粘连较少,噪音点及错分割现象较少. 通过优化使算法计数准确度达到95%以上,多种类细胞通用性较强. 对于工业及生物医学领域细胞显微图像成像、增强和计数达到自动化智能化的计算机操作提供了可行性.

参考文献

- [1] MA Xiang-hu, SHEN Yi-qing, YANG Yue-lian, *et al.* Application of ACFM in varicella vaccine production [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2014, **23**(20): 2446-2449. 马相虎,沈谊清,杨月莲等. 细胞工厂自动化操作系统在水痘疫苗生产中的应用[J]. *中国新药杂志*, 2014, **23**(20): 2446-2449.
- [2] YAO Bao-li, LEI Ming, XUE Bin, *et al.* Process and applications of high-resolution optical imaging in space and biology[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(11): 1607-1618. 姚保利,雷铭,薛彬等. 高分辨和超分辨光学成像技术在空间和生物中的应用[J]. *光子学报*, 2011, **40**(11): 1607-1618.
- [3] ZHI Shao-tao, ZHANG Hai-jun, ZHANG Dong-xian. Super-resolution optical microscopic imaging method based on annular illumination with high numerical aperture[J]. *Acta Physica Sinica*, 2012, **61**(2): 0242071. 支绍韬,章海军,张冬仙. 基于大数值孔径环形光锥照明的超分辨光学显微成像方法研究[J]. *物理学报*, 2012, **61**(2): 0242071.
- [4] LI Qi, XIANG Yang, GU Jun-da, *et al.* Optical design of "cell factory" microscopic monitoring device[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, **41**(10): 1-6. 李琦,向阳,谷俊达,等. 细胞工厂显微监测装置的光学设计[J]. *中国激光*, 2014, **41**(10): 1-6.
- [5] ZUO Shuang, XU Zhong-bao, LÜ Qing-hua. Extension characteristics of the depth of field for microscopic system[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2013, **40**(5): 120-126.

- 邹爽,许忠保,吕青花. 大景深显微成像方法研究[J]. 光电工程, 2013, **40**(5):120-126.
- [6] 日本 taitec 公司细胞监控系统[EB/OL]. (2011-1-10)[2014-02-03]. <http://taitec.net/products/products-info.php>.
- [7] CHU Zhao-hui, WANG Rong-gui, ZHANG Xuan, *et al.* Enhancement method of JPEG2000 compressing image based on retinex theory[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2012, **41**(2): 200-204.
储昭辉,汪荣贵,张璇,等. 基于 Retinex 理论 JPEG2000 压缩图像增强方法[J]. 光子学报, 2012, **41**(2):200-204.
- [8] ZHANG Peng, ZHANG Zhi-hui. Image nonlinear enhancement based on subsection histogram transform[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2014, **43**(1): 0110002.
张鹏,张志辉. 基于分段直方图变换的图像非线性增强[J]. 光子学报, 2014, **43**(1):0110002.
- [9] LIN Zhong-hua. The cell Image segmentation based on the K-L transform and OTSU method[C]. International Conference on Multimedia and Signal Processing(CMSP), 2011: 25-28.
- [10] WU Chun-hong, FU Guo-liang. A stereo matching method based on K-means segmentation and neighborhood constraints relaxation[J]. *Chinese Journal of Computers*, 2011, **34**(4): 755-760.
伍春洪,付国亮. 一种基于图像分割及邻域限制与放松的立体匹配方法[J]. 计算机学报, 2011, **34**(4):755-760.
- [11] ZHANG Shuo, PENG Dong-liang. Cell Image segmentation based on mathematical morphology [J]. *Journal of Hangzhou Dianzi University*, 2008, **28**(6): 52-55.
张硕,彭冬亮. 基于数学形态学的细胞图像分割[J]. 杭州电子科技大学学报, 2008, **28**(6):52-55.
- [12] ALAIN P, HERVÉ D, PAUL M. Automated image segmentation: issues and applications[J]. *Medical Imaging Systems Technology*, 2005: 195-243.
- [13] DE M C A. An interactive algorithm for image smoothing and segmentation[J]. *Computer Vision and Image Analysis*, 2009: 17-49.
- [14] GAO Jing. The segmentation of cells image based on the morphological watershed algorithm[D]. Jilin: Jilin University . 2008, 5:65-71.
高静. 基于形态学分水岭算法的细胞图像分割[D]. 吉林:吉林大学, 2008, 5:65-71.
- [15] XIE Qin, YU Xiao-hui. An engineering way for red blood cells counting based on Matlab[J]. *Journal of South-Central University for Nationalities (Nation Science Edition)*, 2013, **32**(4): 69-72.
谢勤,于小卉. 一种基于 Matlab 的血红细胞计数的工程方法[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2013, **32**(4):69-72.
- [16] WANG Hai-jun, LIU Ming. Medical images segmentation using active contours driven by global and local image fitting energy[J]. *Image Grap*, 2012, **12**(2): 1-15.
- [17] ZHAO Xin-xin. A cell counting method for microscopic image of biological tissues[D]. Hubei: Huazhong University of Science & Technology, 2012: 78-85.
赵欣欣. 生物组织显微图像中的细胞计数方法[D]. 湖北:华中科技大学, 2012:78-85.
- [18] CHENGJie-zhang, JI Xiao-qiang, LI Ming-guang. Method of high precision and fast counting for Intensive cell microscopic image[J]. *Journal of Changchun University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2014, **37**(2): 71-75.
程揭章,嵇晓强,李明光. 密集型细胞显微图像高准确度快速计数方法[J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2014, **37**(2): 71-75.
- [19] SU Mao-jun, WANG Zhao-bin, ZHANG Hong-juan, *et al.* A new method for blood cell image segmentation and counting based on PCNN and it's auto move characteristic[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2009, **28**(1): 145-152.
苏茂君,王兆滨,张红娟,等. 基于 PCNN 自动波特征的血细胞图像分割和计数方法[J]. 中国生物医学工程学报, 2009, **28**(1):145-152.
- [20] DUAN Jun, YU Le. A WBC segmentation method based on HSI color space[C]. 2011 4th IEEE International Conference on Broadband Network and Multimedia Technology (IC-BNMT). 2011: 629-632.
- [21] PENG Ren, HU Shang-liang, ZHU Hui-ping. Application of improved fuzzy c-means clustering in cell Image segmentation [C]. 2011 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 2011: 1-4.