技术与方法

# 面向空间实验的肌纤维细胞形态学参数测量算法

陈奕帆<sup>1,2,3,4</sup> 李华旺<sup>1\*</sup> 张永合<sup>1,2</sup> 王新宇<sup>1,2</sup> 丁国鹏<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>中国科学院微小卫星创新研究院,上海 201203; <sup>2</sup>中国科学院微小卫星重点实验室,上海 201203; <sup>3</sup>上海科技大学, 信息科学与技术学院,上海 201210; <sup>4</sup>中国科学院大学,北京 100049)

摘要 为了满足空间任务的自主需求,探索太空环境因素对宇航员肌肉萎缩的影响以及药物分子对肌纤维细胞分化的作用,科研人员通过观察肌纤维细胞的生长状态,判断药物分子对肌纤维细胞的影响。现阶段,科研人员手动测量肌纤维细胞宽度,统计细胞宽度分析肌纤维细胞的生长状态。该 文为实现自动测量肌纤维细胞形态学参数,提出了一种基于曲率和样条拟合的算法自动对肌纤维细胞 的形态学参数进行测量。将细胞图像进行预处理使细胞和背景分离,通过样条插值拟合细胞边界,计 算得到边界点的法向量和曲率,基于法向量寻找匹配点计算细胞宽度;根据曲率寻找细胞端点,进而拟 合细胞骨架获取细胞长度。实验结果表明,该算法获取的形态学参数与手动测量分布一致。该算法实 现了对肌纤维细胞的形态学测量,细胞测量平均时间缩短了85.2%,极大提高了科研人员研发效率。 关键词 肌纤维细胞;肌肉萎缩;曲率;形态测量;样条拟合

Algorithm for Measuring Morphology of Myotube in Space Experiments

CHEN Yifan<sup>1,2,3,4</sup>, LI Huawang<sup>1\*</sup>, ZHANG Yonghe<sup>1,2</sup>, WANG Xinyu<sup>1,2</sup>, DING Guopeng<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Innovation Academy for Microsatellites, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Microsatellites, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; <sup>3</sup>School of Information Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China; <sup>4</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** In order to meet the autonomous needs of space missions, explore the effects of space environmental factors on astronaut muscle atrophy and the role of drug molecules on myotube differentiation, researchers determine the effect of drug molecules on myotube by observing the growth status of myotube. At this stage, researchers measured the width of myotube manually and analyzed the growth status of myotube by measuring the cell width. In order to achieve the automatic measurement of morphological parameters of myotube, an algorithm based on curvature and spline fitting was proposed to automatically measure the morphological parameters of myotube. Firstly, the cell image was preprocessed to separate the cells from the background, and then the cell boundary was fitted by spline interpolation which helped to calculate the normal vector and curvature of the boundary points. Secondly, the matching points were found by the normal vector to compute the cell width. What's more, the cell endpoints were found by curvature and thus the cytoskeleton was fitted to measure the cell length. The experimental results showed that the morphological parameters obtained by the algorithm were consistent with the manual measurement distribution. The algorithm achieves the morphological measurement of myotube, and the average time of cell measurement is short-

收稿日期: 2020-02-29 接受日期: 2020-04-13 \*通讯作者。Tel: 13585859917, E-mail: lihw@microsate.com Received: February 29, 2020 Accepted: April 13, 2020 \*Corresponding author. Tel: +86-13585859917, E-mail: lihw@microsate.com

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5269

ened by 85.2%, which greatly improves the research and development efficiency of scientific researchers.

Keywords myotube; muscle atrophy; curvature; morphological measurement; spline fitting

在人类活动中,肥胖、糖尿病、肿瘤等因素会 导致肌肉萎缩,而长时间的太空活动也会导致宇航 员肌肉萎缩。面向未来人类太空活动的生命健康, 航天员在轨肌肉萎缩、骨质流失、免疫功能抑制等 研究需求,针对未来在空间使用药物抵抗人体生理 变化的途径探索,中国科学院微小卫星创新研究院 开展智能化空间生命科学实验,其目标是构建能够 开展空间生命科学实验的智能化系统及微小型卫 星平台,在空间实现自主的样本培育、培养液更换、 诱导分化、状态检测、数据分析等实验。

本文主要研究肌纤维细胞的状态检测问题。细 胞在分化过程中,多个肌肉细胞融合形成长管状的 肌纤维细胞,在此过程中,加入药物小分子观察细胞 的生长状态,跟踪状态良好的肌纤维细胞,统计细胞 的宽度分布,分析先导小分子化合物的影响。

据我们所知,现阶段科研人员在肌纤维细胞分 化的过程中,通过肉眼观测肌纤维细胞图像,挑选出 长势良好的细胞,手动标记细胞宽度。但手动测量 细胞宽度具有强烈的主观性,容易造成主观误差,同 时手动进行数据处理会耗费大量人力和时间,并且 不适用于在太空环境中开展。

为实现自动测量肌纤维细胞的形态学参数,我 们提出了一种基于曲率与样条拟合的自动测量算 法。肌纤维细胞多为长管状细胞,即类平行线段。 对类平行线段最常见且研究最多的对象是视网膜血 管。多年来,大多数团队都采用中心线方法印测量视 网膜血管的宽度,即通过确认物体的中心线来确定 物体的走向,最后拟合出边界进而对血管宽度进行 测量。中心线提取方法主要分为三类,基于拓扑细 化的方法[2-8],主要通过"燃火"法来获得血管中心线, 由于该方法是一个迭代过程,所以会很耗时,且易受 图像质量的影响;基于距离变换的方法[9-11],主要通 过"最大内接圆"来获取血管中心线;基于追踪的 方法[12-14], 给定初始点, 在通过确定其与邻域点之间 的关系,自动迭代跟踪出中心线上所有的点集,缺点 是在追踪过程中值考虑局部信息,会导致中心线提 取不完整。

而在确认中心线之前需要对视网膜血管进行准 确地分割。例如根据视网膜血管的自身结构特点的 方法<sup>[15]</sup>,基于不同比例的线检测器的线性组合的方法<sup>[16-18]</sup>,将提取的特征输入AdaBoost分类器<sup>[19]</sup>对各个像素点进行分类判定的方法,基于眼底图像中视网膜血管的层次特征的方法<sup>[20]</sup>,基于多重去趋势分析的视网膜图像分割方法<sup>[21]</sup>。2019年,汪维华等<sup>[22]</sup>提出了一种修正的形态学与Otsu相结合的无监督视网膜血管分割算法。2020年,ZHAO等<sup>[23]</sup>提出一种端到端的消光算法对未知区域中的血管像素进行分类并完成最终的血管分割,以提高现有分割方法的性能。

另外,为了测量视网膜血管的宽度,2012年 BANKHEAD等<sup>[24]</sup>用小波阈值化对血管进行分割,再 使用样条拟合确定血管方向,接着搜索垂直于坐标轴 的二阶导数的零交叉点,从而提取中心线并定位血管 边缘。2014年,SUKANYA<sup>[25]</sup>利用局部熵阈值法从图 像中提取血管网络,再凭借sobel边缘检测方法提取血 管边界。将骨架化操作应用于血管网络并绘制血管 边界和骨架图像,然后执行分支点检测法以定位所有 交叉位置,最后用旋转不变的掩模从边缘图像中搜索 像素对,并计算出最短距离对,即为该横截面的血管 宽度。另外,2018年,ARAÚJO等<sup>[26]</sup>提出了一种通过 血管横断面强度轮廓模型拟合眼底图像中血管口径 的方法。

本文所涉及的肌纤维细胞图像,存在光照不均、 细胞相互黏连等问题。如图1所示,为了精确测量肌 纤维细胞的长度和宽度,本文结合细胞形态特点,基 于已进行图像分割的肌纤维细胞进行二值化处理<sup>[27]</sup>, 采用样条曲线拟合细胞边缘,通过法向量寻找匹配 点测量细胞宽度,再通过曲率确定细胞端点和骨架 进而测量细胞的长度。

### 1 相关工作

图2为科研人员手动测量示意图。科研人员观 测长势良好的肌纤维细胞,选取该细胞最宽处测量其 宽度,以此作为该细胞的宽度。通常情况下,肌纤维 细胞越宽,表示细胞状态越好。肌纤维细胞中大部分 细胞的边缘是较宽的复带,且细胞存在交叠和交叉。

曲率<sup>[28]</sup>可以用来描述曲线的弯曲程度。在数学中,平面曲线的曲率κ就是针对曲线上某个点的切线 方向对弧长的转动率,通过微分定义,表明曲线偏离



绿色字母数字表示细胞的长度序号。

Green character indicates the length serial number of the cell.

图2 手动测量肌纤维细胞示意图 Fig.2 Manual measurement of myotube

直线的程度,如图3所示。

数学形式为:

$$\kappa = \lim_{\Delta \alpha \to 0} \left| \frac{\Delta \alpha}{\Delta s} \right| = \left| \frac{d\alpha}{ds} \right| \tag{1}$$

设曲线的方程为
$$y=f(x)$$
且 $f(x)$ 具有二阶  
导数,因为 $tan\alpha=y'$ ,所以  
 $d\alpha = (\arctan y')'dx = \frac{y''}{1+{y'}^2}dx$  (2)

又因为
$$ds = \sqrt{1 + y'^2} dx$$
,从而最终得到曲率

$$\kappa = \frac{f''}{(1 + (f')^2)^{\frac{3}{2}}}$$
(3)

如图4所示,曲线的曲率与弯曲程度呈正相关。 二值化图像中每一个连通区域都是一个单独的肌纤 维细胞,肌纤维细胞的端点对应曲率较大的地方。 图像中肌纤维细胞的边界没有显性的解析表达式。 >



Fig.4 Curves with different curvatures

为了计算出每一个点的曲率,使用二次样条插 值<sup>[29]</sup>拟合细胞边界,对于曲线参数*θ*,有

$$x = m_1 + m_2\theta + m_3\theta^2$$
  

$$y = n_1 + n_2\theta + n_3\theta^2$$
(4)

$$\kappa = \frac{x''y' - x'y''}{((x')^2 + (y')^2)^{\frac{3}{2}}} = \frac{2(m_2n_3 - m_2n_3)}{(m_2^2 + n_2^2)^{\frac{3}{2}}}$$
(5)

和该点对应的法向量

$$\vec{v} = \frac{(n_2, -m_2)}{\sqrt{m_2^2 + n_2^2}} \tag{6}$$

当曲线有显性解析表达式时,可直接对曲线表 达式进行解析求导。但是对于离散的点,情况比较 复杂, 式子(5)中的x和y的一阶和二阶导数如果直接 用差分方法计算会造成比较大的误差。本文采用样 条插值的方法, 利用相邻2个点确定中间点在该二次 曲线的曲率。如图5所示, 3个点(x1, y1)、(x2, y2)、(x3, y3)确定一条二次曲线, 计算点(x2, y2)处的曲率。另 外在求解二次曲线参数方程的同时得到各个点的法 向量以便求得细胞的宽度。

#### 2 方法

本实验得到已进行分割处理和二值化的肌纤 维细胞图像,根据图像中每个细胞的轮廓计算出边 界点的曲率和法向量,寻找匹配点进而计算宽度,确 定肌纤维细胞的端点,依次连接中间点拟合细胞骨



架,计算肌纤维的长度,最终结合肌纤维细胞的宽度和长度以此判断肌纤维细胞的生长状态。

2.1 算法简介

算法:肌纤维细胞宽度及长度测量算法。

输入:已分割的肌纤维细胞图像。

输出:肌纤维细胞的长度和宽度。

(1)图像应用OTSU阈值化算法使其成为二值化 图像;

(2)识别各个肌纤维细胞的轮廓;

(3)遍历细胞轮廓求出每个边界点对应的法向 量**v**和曲率κ;

(4)沿着法向量的方向寻找对应的匹配点;

(5)计算该点与对应的匹配点之间的距离作为 该点的细胞宽度;

(6)寻找曲率最大的h个点,筛选出距离最远的2 个点作为细胞端点;

(7)寻找端点之间连线等距的d个点,依次连接 各点作为细胞初始骨架;

(8)寻找与这d个点距离最近的边界点,再确认 这些边界点与其对应的匹配点之间的中点,作为最 终骨架点;

(9)依次连接最终骨架点,骨架点之间距离相加 之和即为估计的细胞长度。

这里, h和d可以根据精度、时间等要求进行调整。h越大, 就越容易找到细胞的端点, 但如果过大算法就失去了意义, 相当于计算所有边界点之间的距离。d越大, 拟合出来的骨架越准确, 但也需要耗费更多的时间。因此, 在本文实验中取h=16, d=8。

#### 2.2 宽度测量

如图6所示,以点O为例,确定该点在细胞另一 侧边缘的匹配点。

步骤如下:

(1)从O点出发, 沿着v方向前进一个单位的像 素长度, 采用双线性插值法<sup>[30]</sup>估算该点的像素值, 判 断其像素值为0或者1, 对应是否属于细胞。若属于 细胞, 则以v为匹配点方向, 若属于背景, 则以反方 向-v为匹配点方向;

(2)从O点出发,以像素点方向循环移动一个单位的像素长度,即IO<sub>1</sub>O<sub>2</sub>I,判断O<sub>1</sub>和O<sub>2</sub>的像素值是否不同,若不同则停止循环;

(3)遍历O<sub>2</sub>的周围像素点A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>的像 素值, O<sub>1</sub>的周围像素点A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub>的像素值, 这 里针对图6而言, 提取出它们共有且属于细胞的像素 点A<sub>1</sub>、A<sub>4</sub>, 分别比较*O*A<sub>1</sub>和*O*A<sub>4</sub>与匹配点方向的夹角, 夹角较小的像素点即为最终的匹配点。这里假设A<sub>4</sub> 为最终的匹配点。I*O*A<sub>4</sub>I即为细胞在该点的宽度。

#### 2.3 长度测量

遍历细胞所有的边界点,计算所有宽度的平均 值作为该细胞最终的宽度。本文采用基于端点分割 进行骨架拟合的方法测量细胞长度。步骤如下。

(1)计算得到曲率κ。对于边界点P<sub>i</sub>,用P<sub>i-2</sub>、P<sub>i</sub>、 P<sub>i+2</sub>三点进行样条插值计算出曲率k<sub>i</sub>,把前后总计5个 点的曲率k<sub>i-2</sub>、k<sub>i-1</sub>、k<sub>i</sub>、k<sub>i+1</sub>、k<sub>i+2</sub>的均值作为边界点P<sub>i</sub> 的曲率k<sub>Pi</sub>,即:

$$k_{p_i} = \frac{k_{i-2} + k_{i-1} + k_i + k_{i+1} + k_{i+2}}{5}$$
(7)



图6 沿法向量寻找匹配点 Fig.6 Find matching points along the normal vector



蓝色线段为细胞每个点对应的宽度,细胞两端最粗的2个黑点为算法寻找到的细胞端点,细胞端点之间橙色线段为估计的细胞骨架,由骨架计 算细胞的长度。

The blue line is the width corresponding to each point of the cell. The thickest two black dots at both ends of the cell are the cell endpoints found by the algorithm. The orange line between the cell endpoints is the estimated cytoskeleton. The length of the cell is calculated from the skeleton.

图7 长度和宽度测量效果图

#### Fig.7 Results graph of length and width measurement

(2)确认曲率最大的16个点*max*1、...*max*16作为 备选的端点,计算每两个点之间的距离,取距离最远 的两个点作为骨架的端点。

在步骤2中得到的两个端点之间取8个等距的 点,寻找与这8个点最近的边界点及其对应的匹配 点,把边界点与其对应匹配点的中点作为细胞的骨 架点,按顺序依次连接这些骨架点,得到曲线S,S的 长度即为估计的细胞长度。

#### 3 实验结果

本实验所使用计算机配置为:操作系统ubuntu16.04 LTS,内存8 GB,处理器 Intel i7-6700HQ, GPU NVIDIA GeForce GTX 960 M。所使用编译器 为PyCharm Community Edition,编程语言为Python 3.7。

图7直观地展示了肌纤维细胞宽度和长度测量 效果。



A:用4 nmol/L的牛血清蛋白终浓度处理细胞的宽度测量结果; B:用0.25 nmol/L的牛血清蛋白终浓度处理细胞的宽度测量结果。 A: width measurement results of cells treated with 4 nmol/L final concentration of bovine serum albumin; B: width measurement results of cells treated with 0.25 nmol/L final concentration of bovine serum albumin.

## 图8 宽度测量分布统计图

Fig.8 Width measurement distribution chart

夜1 览度分布万差 与标准差 Table 1 Variance and standard deviation of width distribution				
Centerline <sup>[1]</sup>	41.99	1094.06	33.08	
Manual measurement	35.16	216.77	14.72	
This paper	34.76	63.84	7.99	

# 

据我们了解的情况,相比单个的肌纤维细胞宽 度,科研人员更关注肌纤维细胞宽度具体的分布情 况。通过肌纤维细胞的宽度分布,科研人员可以分 析出所加入的药物小分子的作用。因此,实验需要 对同一时间段的多组细胞的宽度进行统计分析,不 同的分布对应不同的细胞状态。本文实验根据药 物浓度进行分组,将同一药物浓度作用下的7张不 同的肌纤维图像分为一组,按分组统计分析细胞宽 度的分布。图8A、图8B展示了其中2组图像的宽 度分布。BSA4表示使用4 nmol/L的牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)终浓度处理分化第四天的 C2C12肌管24 h之后拍照测量的细胞图像。将7幅 图像得到的所有细胞宽度从[10,80] µm以10 µm为1 个单位统计数量,计算每一个宽度区域的占比。对 比3种方法的结果数据,本文算法宽度分布与手动 测量结果更加一致,说明本文算法比中心线算法更 加准确。

另外如表1所示,本文算法相对于中心线算 法,离散程度以及宽度均值更加接近于手动测量 结果,且宽度分布更加集中。在某一个生长周期内, 细胞生长状态应当相同,所以宽度数据也就应当 更加集中,说明本文算法比手动测量结果更加合 理准确。

因细胞形态弯曲且不规则无法手动测量其长 度,则无法为本文算法提供基准。对于中心线方法, 本文中图像存在光照不均和细胞黏连的问题,得到 的中心线骨架有许多粗细不均的分叉,且不连续,故 中心线也无法测量细胞长度。因此,在本文中细胞 长度的数据不做具体对比。但长度参数可以作为辅 助估计细胞生长状态。表2列出了6组实验下的细胞 平均长度,可以看出组BSA0.25细胞的平均长度比 组BSA4细胞的平均长度更长,与图8A、图8B中的 两组实验宽度分布比较一致,说明本文算法具有可 行性。

另外,根据经验统计,科研人员手动测量30到40 个细胞至少需要6 min,每个细胞大约需要10 s。本文 算法平均测量一个细胞的宽度和长度仅需要1.48 s, 时间缩短了85.2%,极大提高了科研人员的测量效率。

Table 2 Myotube length under DSA			
BSA终浓度/nmol·L <sup>-1</sup>	细胞平均长度/µm		
Final concentration of BSA /nmol· $L^{-1}$	Average cell length /µm		
4.00	494.483		
2.00	591.916		
1.00	633.129		
0.50	519.819		
0.25	527.444		
0	566.538		

表2 BSA作用下肌纤维细胞长度 Table 2 Myotube length under BSA

### 4 结束语

本文基于太空生命实验的实际需求,提出了一 种针对肌纤维细胞的形态学参数测量的算法。该算 法能够准确有效地测量出细胞的宽度和长度,以此 判断药物对肌纤维细胞生长状态的影响。该算法运 算量较小,适用于宇航处理芯片搭载。同时该算法 不仅可用于太空生命实验,在地面应用上也有普及 的意义。

#### 参考文献 (References)

- GRISAN E, PESCE A, GIANI A, et al. A new tracking system for the robust extraction of retinal vessel structure [C]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2004, 1:1620-3.
- MA C M, SONKA M. A fully parallel 3D thinning algorithm and its applications [J]. Comput Vis Image Underst, 1996, 64(3): 420-33
- [3] LOHOU C, DEHOS J. Automatic correction of Ma and Sonka's thinning algorithm using P-simple points [J]. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 2010, 32(6): 1148-52.
- HARIS K, MAGLAVERAS N, EFSTRATIADIS S, et al. Artery skeleton extraction based on consistent curvature labeling [C]. Computers in Cardiology 1999. Vol.26 (Cat.No.99CH37004). IEEE, 1999: 269-72.
- [5] KOEHLER H, COUPRIE M, BOUATTOUR S, et al. Extraction and analysis of coronary tree from single X-ray angiographies [C]. Medical imaging 2004: visualization, image-guided procedures, and display. International Society for Optics and Photonics, 2004, 5367: 810-9.
- [6] MANNIESING R, VELTHUIS B K, VAN LEEUWEN M S, et al. Skeletonization for reinitialization in level-set-based vascular tree segmentation [C]. Medical imaging 2004: image processing. international society for optics and photonics, 2004, 5370: 506-14.
- [7] EIHO S, QIAN Y. Detection of coronary artery tree using morphological operator [C]. Computers in Cardiology 1997. IEEE, 1997: 525-8.
- [8] CHENG Y, HU X, WANG Y, et al. Automatic centerline detection of small three-dimensional vessel structures [J]. J Electron Imaging, 2014, doi: 10.1117/1.JEI.23.1.013007.
- [9] MALANDAIN G, FERNÁNDEZ-VIDAL S. Euclidean skeletons

[J]. Image Vis Comput, 1998, 16(5): 317-27.

- [10] ZHOU Y, TOGA A W. Efficient skeletonization of volumetric objects [J]. IEEE Trans Vis Comput Graph, 1999, 5(3): 196-209.
- [11] BITTER I, KAUFMAN A E, SATO M. Penalized-distance volumetric skeleton algorithm [J]. IEEE Trans Vis Comput Graph, 2001, 7(3): 195-206.
- [12] SUN Y. Automated identification of vessel contours in coronary arteriograms by an adaptive tracking algorithm [J]. IEEE Trans Med Imaging, 1989, 8(1): 78-88.
- [13] XU Y, ZHANG H, LI H, et al. An improved algorithm for vessel centerline tracking in coronary angiograms [J]. Comput Methods Programs Biomed, 2007, 88(2): 131-43.
- [14] AYLWARD S R, BULLITT E. Initialization, noise, singularities, and scale in height ridge traversal for tubular object centerline extraction [J]. IEEE Trans Med Imaging, 2002, 21(2): 61-75.
- [15] 黄文博, 王珂, 燕杨. 彩色视网膜眼底图像血管自动检测方法
   [J]. 光学精密工程(HUANG W B, WANG K, YAN Y. Automatic detection method of blood vessel for color retina fundus images
   [J]. Optics and Precision Engineering), 2017, 25(5): 1378-86.
- [16] KHAN M A U, KHAN T M, BAILEY D G, et al. A generalized multi-scale line-detection method to boost retinal vessel segmentation sensitivity [J]. Pattern Anal Appl, 2019, 22(3): 1177-96.
- [17] SHAH S A A, SHAHZAD A, KHAN M A, et al. Unsupervised method for retinal vessel segmentation based on gabor wavelet and multiscale line detector [J]. IEEE Access, 2019, 7: 167221-8.
- [18] KAUR J, KAUR N, ACHARYYA M, et al. An effective algorithm for automatic measurement of vessel calibre in retinal fundus images [C]. 2016 5th International Conference on Wireless Networks and Embedded Systems (WECON). IEEE, 2016: 1-5.
- [19] FREUND Y, SCHAPIRE R E. A desicion-theoretic generalization of on-line learning and an application to boosting [C]. European Conference on Computational Learning Theory. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995: 23-37.
- [20] 余林芳, 邓伏虎, 秦少威, 等. 基于眼底图像层次特征的分类方法[J]. 计算机应用(YU L F, DENG F H, QIN S W, et al. Classification method based on hierarchical features of fundus images [J]. Journal of Computer Applications), 2019, 39(9): 2575-9.
- [21] 张石, 佘黎煌, 王雅凡, 等. 基于多重分形去趋势波动分析的视网膜图像分割[J]. 东北大学学报(自然科学版)(ZHANG S, SHELH, WANG Y F, et al. Retinal image segmentation based on multifractal detrended fluctuation analysis [J]. Journal of Northeastern University Natural Science), 2019, 40(2): 158-63.
- [22] 汪维华,张景中,吴文渊.改进的形态学与Otsu相结合的视网 膜血管分割[J].计算机应用研究(WANG W H, ZHANG J Z,

WU W Y. New approach to segment retinal vessel using morphology and Otsu [J]. Application Research of Computers), 2019, 36(7): 2228-31.

- [23] ZHAO H, LI H, CHENG L. Improving retinal vessel segmentation with joint local loss by matting [J]. Pattern Recognit, 2020, 98: 107068.
- [24] BANKHEAD P, SCHOLFIELD C N, MCGEOWN J G, et al. Fast retinal vessel detection and measurement using wavelets and edge location refinement [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32435.
- [25] SUKANYA S, ABINAYA S, TAMILSELVI D. Detection of blood vessels and measurement of vessel width for diabetic retinopathy [J]. Comput Sci Inf Technol, 2014: 233-46.
- [26] ARAÚJO T, MENDONÇA A M, CAMPILHO A. Parametric

model fitting-based approach for retinal blood vessel caliber estimation in eye fundus images [J]. PloS One, 2018, 13(4): e0194702.

- [27] OTSU N. A threshold selection method from gray-level histograms [J]. IEEE Trans Syst Man Cybern Syst, 1979, 9(1): 62-6.
- [28] FEDERER H. Curvature measures [J]. Trans Am Math Soc, 1959, 93(3): 418-91.
- [29] SCHOENBERG I J. Contributions to the problem of approximation of equidistant data by analytic functions. Part B. On the problem of osculatory interpolation. A second class of analytic approximation formulae [J]. Q Appl Math, 1946, 4(2): 112-41.
- [30] SEILER M C, SEILER F A. Numerical recipes in C: the art of scientific computing [J]. Risk Anal, 1989, 9(3): 415-6.