

# 间充质干细胞生长汇合度自动分析算法研究

白 华<sup>1,2\*</sup> 张凤凤<sup>1,2</sup> 张 诚<sup>1,2</sup> 赵军发<sup>1,2</sup> 严淑琳<sup>3,4</sup> 张建中<sup>3,4</sup> 韩之波<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>天津工业大学电子与信息工程学院, 天津 300387; <sup>2</sup>天津市光电检测技术与系统重点实验室, 天津 300387;

<sup>3</sup>细胞产品国家工程研究中心, 天津 300457; <sup>4</sup>天津昂赛细胞基因工程有限公司, 天津 300457)

**摘要** 细胞生长汇合度是细胞体外培养环节中的重要参数。目前的细胞汇合度评估方法主要依靠人工, 其结果效率低、精度差, 且主观性强。图像处理技术具有快速、准确、自动化程度高等优点, 在生物医学领域应用日益广泛, 用来分析细胞汇合度可以在很大程度上提高检测效率和客观准确性。该文提出的贴壁细胞生长汇合度自动分析算法首先运用灰度形态学的高低帽变换组合与背景减除相结合的预处理增强图像对比度, 然后运用改进的K-Means聚类算法将前景和背景进行粗略地区分, 最后通过面积滤波和二值形态学的算法组合对图像进行后处理, 实现前景和背景的良好区分并计算细胞汇合度。实验结果显示, 该算法准确性较高, 可有效替代传统人工方法对细胞汇合度进行自动检测。

**关键词** 间充质干细胞; 细胞汇合度; 数学形态学; 改进的K-Means算法; 图像处理

## Research on Automatic Analysis Algorithm of Mesenchymal Stem Cell Growth Confluence

Bai Hua<sup>1,2\*</sup>, Zhang Fengfeng<sup>1,2</sup>, Zhang Cheng<sup>1,2</sup>, Zhao Junfa<sup>1,2</sup>, Yan Shulin<sup>3,4</sup>, Zhang Jianzhong<sup>3,4</sup>, Han Zhibo<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>College of Electronics and Information Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China;

<sup>2</sup>Tianjin Key Laboratory of Optoelectronic Detection Technology and System, Tianjin 300387, China; <sup>3</sup>National Engineering Research Center of Cell Products, Tianjin 300457, China; <sup>4</sup>Tianjin Amcellgene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

**Abstract** The cell confluence is an important parameter in cell culture *in vitro*. Currently, the assessment of this parameter is usually carried out by human, and thus there are many defects such as inefficiency, poor precision and low reliability. Image processing technology is a powerful tool that has been widely used in biomedical field owing to its characteristics of high-speed, high-veracity and high-automation. Therefore, the use of this technique for cell confluence analysis can greatly improve the detection efficiency and objective accuracy. An image processing method for automatic analysis of adherent cell confluence is presented in this paper. Firstly, the cell microscopic images were preprocessed by the top-bottom hat of gray morphology and background subtraction. Secondly, an improved K-Means clustering algorithm was used to coarsely distinguish between foreground and background. Then, an algorithm combining area filtering and binary morphology was adopted to optimize segmentation effect, which could obtain a good segmentation between cellular area and background, and finally calculated the cell confluence. Experimental results showed that the algorithm had a high accuracy and could

收稿日期: 2017-08-07 接受日期: 2017-09-13

国家自然科学基金(批准号: 61201106、61307094)、天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(批准号: 14JCQNJC01800)和天津市光电传感器与传感网络技术重点实验室开放项目资助的课题

\*通讯作者。Tel: 022-83955390, E-mail: baihua@tjpu.edu.cn

Received: August 7, 2017 Accepted: September 13, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.61201106, 61307094), Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (Grant No.14JCQNJC01800) and Tianjin Key Laboratory Open Project of Optoelectronic Sensor and Sensing Network Technology

\*Corresponding author. Tel: +86-22-83955390, E-mail: baihua@tjpu.edu.cn

网络出版时间: 2017-10-25 17:41:07 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1741.018.html>

effectively replace the traditional artificial method to automatically detect the cell confluence.

**Keywords** mesenchymal stem cells; cell confluence; morphology mathematics; improved K-Means algorithm; image processing

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于发育早期中胚层的具有多向分化潜能和自我更新能力的多能干细胞<sup>[1-3]</sup>,可在体外培养扩增,并能在适当诱导条件下分化为神经细胞<sup>[4]</sup>、表皮细胞<sup>[5]</sup>和心肌细胞<sup>[6]</sup>等,在组织工程及细胞替代治疗方面具有极大的应用价值。近年来发现的脐带源间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)因其来源集中、取材方便、不涉及伦理问题,且具有免疫调节、免疫抑制和多向分化潜能等功能<sup>[7-9]</sup>,在神经系统损伤病变<sup>[10-12]</sup>、免疫系统疾病<sup>[13]</sup>和血液系统疾病<sup>[14]</sup>等治疗中取得了显著效果,成为MSCs的理想来源。

通常为满足UC-MSCs在研究和临床治疗等应用中的大量需求,需要将UC-MSCs进行体外扩增培养。在培养过程中,随着细胞不断增殖,细胞汇合度也随之增加。当汇合度较高时,细胞容易相互接触而发生接触性抑制,生长速度减慢甚至停止;另一方面,也会因营养物不足和代谢物积累而不利于生长或发生中毒,因此需要及时传代培养。细胞汇合度是进行细胞传代培养的重要参考依据。目前传统的汇合度评估方式主要通过相衬显微仪器进行肉眼观测。由于细胞扩增能力个体差异较大,因此需要频繁地观测细胞汇合度以免延误传代,而在大规模细胞培养中,这将带来极大的工作量。此外,人工评估方式是通过显微镜观察细胞生长情况,根据贴壁细胞的面积粗略估算其在视野中的占比,因此严重依赖于检验员的经验和水平等主观因素,难以对细胞汇合度作出客观准确的评价。

图像处理技术有可能为实现细胞汇合度的客观准确评价提供新的手段。事实上,采用图像处理技术对组织细胞图像进行分析已成为干细胞研究领域的一个热点<sup>[15-18]</sup>。谢哲理等<sup>[15]</sup>提出了一种采用图像处理和分析技术定量评价MSCs活性的方法,降低了细胞活性评价的成本,克服了传统评价方法破坏细胞的缺点。Afridi等<sup>[18]</sup>应用图像处理技术实现对不同培养环境和力学因素作用下的MSCs图像的自动分割,完善了再生医学和组织工程领域的研究人员关于MSCs在不同培养条件下对应力刺激响应行为的理解。然

而,目前的相关研究工作主要针对切片细胞图像进行,对形态多样化的体外培养贴壁细胞图像研究尚鲜见报道。相比切片细胞图像,贴壁细胞图像的分析处理面临新的挑战,主要表现在细胞未经染色、图像的前景和背景不易区分等方面。本文采用体外培养贴壁UC-MSCs相衬显微图像为研究对象,在不破坏细胞生长环境的条件下,应用图像处理技术实现对细胞汇合度客观准确的自动检测,为细胞显微图像自动分析技术的建立提供了基础理论和实验依据。

## 1 材料与方法

脐带采自健康产妇,胎儿发育良好,供者自愿提供脐带并签署了知情同意书,实验符合中国医学科学院和北京协和医学院研究伦理委员会的规定并获得其许可。在无菌条件下,剪取新鲜脐带,将其剪碎至50~100 mm<sup>3</sup>大小,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗,去除其血液成分。加入含有2.5 g/L胰蛋白酶(Gibco公司)和1 g/L胶原酶II(Gibco公司)的DPBS(有康公司),于37 °C恒温摇床内各消化30 min。消化产物经200目无菌金属滤网过滤,去除未消化的组织。过滤后的细胞悬液用PBS洗2次,然后进行细胞计数。以上来源的细胞计数后采用T75培养瓶(Corning公司),用含10%胎牛血清的DF-12(Gibco公司)细胞培养液,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的条件下培养。在培养过程中,定期用显微镜(IX71, Olympus公司)观察细胞并估计其生长汇合度,当细胞汇合度分别达到5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%和90%时,记录细胞显微图像用于图像分析。

对细胞图像的处理过程如图1所示,分为预处理、图像背景与前景的粗分、图像的后处理以及细胞汇合度的分析。其中,预处理可提高图像对比度,同时降低背景干扰因素。预处理完成后,对所得图像进行分割处理可实现细胞与背景的粗分。接着采用后处理优化图像分割结果,可去除噪声、实现细胞与背景的较好区分并计算细胞汇合度。

### 1.1 预处理算法

体外培养的贴壁UC-MSCs相衬显微图像存在

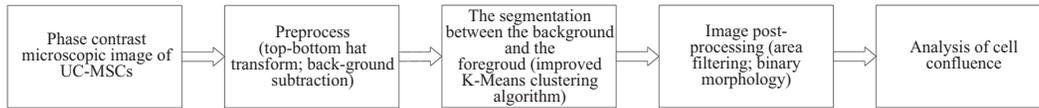
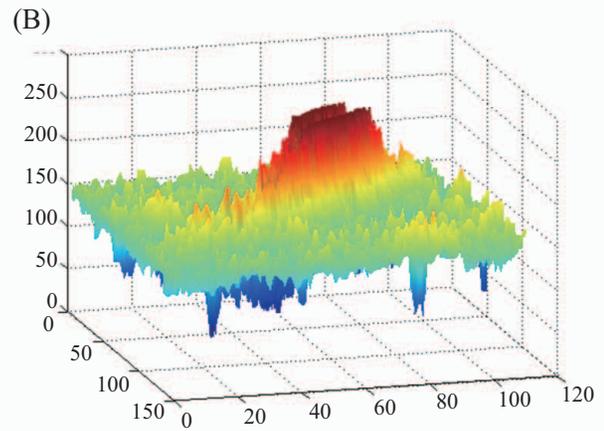
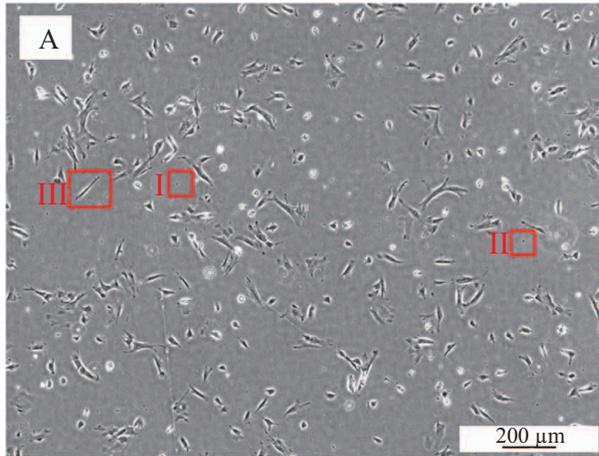


图1 实验流程框图

Fig.1 Experimental flow diagram



A: 10%细胞汇合度UC-MSCs图像; B: 图2A中区域III的三维表面图。

A: UC-MSCs image of 10% confluence; B: three-dimensional surface map of area III in Fig.2A.

图2 10%细胞汇合度UC-MSCs图像及三维表面图

Fig.2 UC-MSCs image of 10% cell confluence and three-dimensional surface map

前景与背景对比度弱、背景灰度不平衡、含溶液杂质和组织碎屑等不利于细胞分割的因素,有必要采用合适的预处理来改善图像质量。图2A给出10%细胞汇合度的贴壁UC-MSCs图像,其中I和II是非细胞杂质区域,III是包含细胞和部分背景的区域。图2B是图2A中区域III的三维表面图,可以看出细胞灰度值分布满足:细胞内部<背景<细胞边缘,这也是本文在选取算法时的重要特征依据。

目前常见的预处理算法有滤波、边缘检测和灰度变换,虽然各有优点,但适用范围都较小,不适合用于处理贴壁UC-MSCs图像。本文提出高低帽变换组合与背景减除相结合的预处理算法,可有效增强前景细胞,同时抑制背景中与细胞灰度近似的干扰因素,提高图像质量。

**1.1.1 高低帽变换组合** 首先,采用灰度形态学中的高低帽变换组合应用对图像进行预处理。灰度形态学<sup>[19-21]</sup>的形成是对二值形态学的扩展,与二值图像相比,灰度图像包含的图像信息更加丰富。灰度形态学也是由四种基本变换构成:腐蚀、膨胀、开运算和闭运算。它与二值形态学的主要区别是:形态变换对象不再是集合,而是图像函数。

高低帽变换<sup>[19,22-23]</sup>是灰度形态学中重要的处理

方法,起增强图像细节的作用,组合应用构成本预处理算法的核心,其原理如下:设 $f(s,t)$ 是原始灰度图像, $b(x,y)$ 是结构元素,通常可以选取方形、圆盘形、菱形等结构元素,虽然贴壁UC-MSCs形态多样化,但都具有平滑的边界,若选用方形或菱形等结构元素,可能会造成处理过后细胞带有边界毛刺的问题,因此使用圆盘形结构元素显然比较合理。

输入图像 $f(s,t)$ 通过结构元素 $b(x,y)$ 进行膨胀、腐蚀分别定义为 $f \oplus b$ 和 $f \ominus b$ ,表达式如(1)、(2)所示:

$$(f \oplus b)(s,t) = \max \{ f(s-x, t-y) + b(x,y) \mid (s-x, t-y) \in D_f, (x,y) \in D_b \} \quad (1)$$

$$(f \ominus b)(s,t) = \min \{ f(s+x, t+y) - b(x,y) \mid (s+x, t+y) \in D_f, (x,y) \in D_b \} \quad (2)$$

式中 $D_f$ 、 $D_b$ 分别是输入图像和结构元素的定义域。膨胀运算是在由结构元素确定的领域中选取 $f+b$ 的最大值,而腐蚀运算是在由结构元素确定的领域选取 $f-b$ 的最小值,因此对灰度图像的膨胀(腐蚀)操作会使输出图像比输入图像亮(暗)。

定义 $f \circ b = (f \oplus b) \ominus b$ 为输入图像 $f$ 在结构元素 $b$ 作用下的闭运算,是对灰度图像进行先膨胀后腐蚀。

定义 $f \bullet b = (f \ominus b) \oplus b$ 为输入图像 $f$ 在结构元素 $b$ 作用下的开运算,是对灰度图像进行先腐蚀后膨胀。

记输入图像 $f$ 在结构元素 $b$ 作用下的高帽变换为 $\text{Top}(f,b)$ , 则:

$$\text{Top}(f,b)=f-(f \circ b) \quad (3)$$

记输入图像 $f$ 在结构元素 $b$ 作用下的低帽变换为 $\text{Bottom}(f,b)$ , 则:

$$\text{Bottom}(f,b)=(f \circ b)-f \quad (4)$$

本文提出的高低帽变换组合是在原始图像上进行图像叠加, 叠加图像为输入图像在相同结构元素作用下的高帽变换结果与低帽变换结果之差, 实现了增强细胞与背景对比度的目的。记组合变换后的图像为 $F(f)$ , 则:

$$F(f)=f+\text{Top}(f,b)-\text{Bottom}(f,b) \quad (5)$$

1.1.2 背景减除 高低帽算法组合处理后, 图像仍存在背景灰度不平衡的问题。本文提出基于背景模型的差分方法, 建立灰度值为图像 $F(f)$ 的均值, 尺寸与其相同的均值背景模型实现背景减除, 降低背景干扰因素。背景模型记作 $\text{Background}$ , 表达式如下:

$$\text{Background}=\text{Zeros}(M,N)+\frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N F(i,j)}{M \times N} \quad (6)$$

式中, 参数 $M \times N$ 是图像 $F(f)$ 的尺寸,  $\text{Zeros}(M,N)$ 是 $M \times N$ 的全零矩阵。

基于图像 $F(f)$ 的灰度值分布满足细胞内部<背景<细胞边缘的特征, 图像 $F(f)$ 与背景模型 $\text{Background}$ 进行差分运算(忽略负值运算结果, 将其设为零), 将得到突出细胞内的处理图, 将其记作 $F(f)_{\text{Sub1}}$ , 则:

$$F(f)_{\text{Sub1}}=\text{Background}-F(f) \quad (7)$$

同理, 进行反向差分运算(忽略负值运算结果, 将其设为零), 得到突出细胞边缘的处理图, 将其记作 $F(f)_{\text{Sub2}}$ , 则:

$$F(f)_{\text{Sub2}}=F(f)-\text{Background} \quad (8)$$

通过建立均值背景模型实现背景减除, 将细胞内和细胞边缘区域提取出来, 为后续的图像分割处理奠定了基础。

## 1.2 背景与前景的粗分

预处理后, 有效增强了图像中细胞和背景的对比, 同时背景干扰因素得到有效抑制。应用改进的K-Means聚类算法分别对图像 $F(f)_{\text{Sub1}}$ 和 $F(f)_{\text{Sub2}}$ 进行分割处理, 通过迭代过程把图像数据集划分为类间独立、类内紧凑的聚类集合<sup>[24-26]</sup>。

改进的K-Means聚类算法的核心思想是迭代计算。在图像矩阵中选取 $k$ 个聚类中心, 根据灰度特征相似性的计算结果把数据点分类到与其灰度值最为相似的聚类集合中, 数据集划分完毕后, 重新计算每个划分区域所有数据点的平均值, 并将其作为新的聚类中心。重复这一过程, 直到前一次迭代聚类中心与当前这一次的聚类中心相一致, 或满足一定的精度要求时, 聚类结束完成图像分割, 此时每个聚类 $k$ 实现最小化类内方差 $e_k^2$ :

$$e_k^2 = \sum_{x_h \in C_j} (x_h - c_j)^2, j = 1, 2, \dots, k \quad (9)$$

其中, 参数 $C_j$ 是聚类中心为 $c_j$ 的聚类集合且 $x_h \in C_j$ 。

本文设置聚类总数 $k=2$ , 其中初始聚类中心 $c_1$ 和 $c_2$ 的选取方式如下:

a. 从输入数据集中随机选取一个点作为第一个初始聚类中心 $c_1$ ;

b. 计算输入数据集中每一个点 $x_m$ 与聚类中心 $c_1$ 的欧式距离 $d(x_m, c_1)$ ;

c. 第二个初始聚类中心 $c_2$ 为概率 $\frac{d^2(x_m, c_1)}{\sum d^2(x_m, c_1)}$ 最大时所对应的数据点;

本文采用改进的K-Means聚类算法进行细胞分割, 解决了初始种子点的获取问题, 减少了迭代运行次数, 从而提高了算法的运行效率和聚类质量, 实现了前景和背景的粗略区分。

## 1.3 后处理算法

1.3.1 面积滤波 图像 $F(f)_{\text{Sub1}}$ 的分割结果为二值图像, 其中灰度值为1的区域由两部分组成: 细胞内区域和背景中灰度较暗的区域; 图像 $F(f)_{\text{Sub2}}$ 的分割结果同样为二值图像, 其中灰度值为1的区域由细胞边缘和背景中灰度较亮的区域组成, 本文提出通过面积滤波去除二值图像中存在的错分割背景区域。

面积滤波处理首先对二值图像中的联通区域作标记, 并计算每个连通区域所包含的像素数, 然后设定一个阈值 $S$ , 通过全局搜索, 将二值图像中区域像素数小于 $S$ 的区域进行取反, 实现去除噪声的目的。依据先验知识, 本文采用4邻接(默认为8邻接)关系对图像 $F(f)_{\text{Sub1}}$ 和 $F(f)_{\text{Sub2}}$ 分割结果图中的联通区域作标记, 阈值 $S$ 分别设置为25和37, 去除像素数低于 $S$ 的噪声干扰区域。

1.3.2 二值形态学 面积滤波去除噪声后保留了

细胞内和细胞边缘区域,将滤波结果进行或运算,得到完整的细胞二值图像。针对二值图像中细胞内和细胞边缘区域连接处断裂的问题,采用二值形态学膨胀运算将细胞内和细胞边缘区域进行连通,优化图像分割结果。

实际对于不同的细胞二值图像,膨胀运算参数的选取尤为重要。基于或运算处理结果,应用数据分析技术,创建出二值图像初始汇合度 $rate$ (自变量)与膨胀运算参数 $par$ (应变量)之间近似的函数关系表达式,如(10)所示,实现对膨胀运算参数的自适应分析。

$$par = \begin{cases} 1 & rate \leq 0.1 \\ 22.22 \times rate - 1.22 & 0.1 < rate < 0.28 \\ 5 & rate \geq 0.28 \end{cases} \quad (10)$$

其中,初始汇合度 $rate$ 的计算方法如表达式(11)所示,参数 $M \times N$ 是二值图像的尺寸, $sum$ 是二值图像中细胞的像素数。

$$rate = \frac{sum}{M \times N} \quad (11)$$

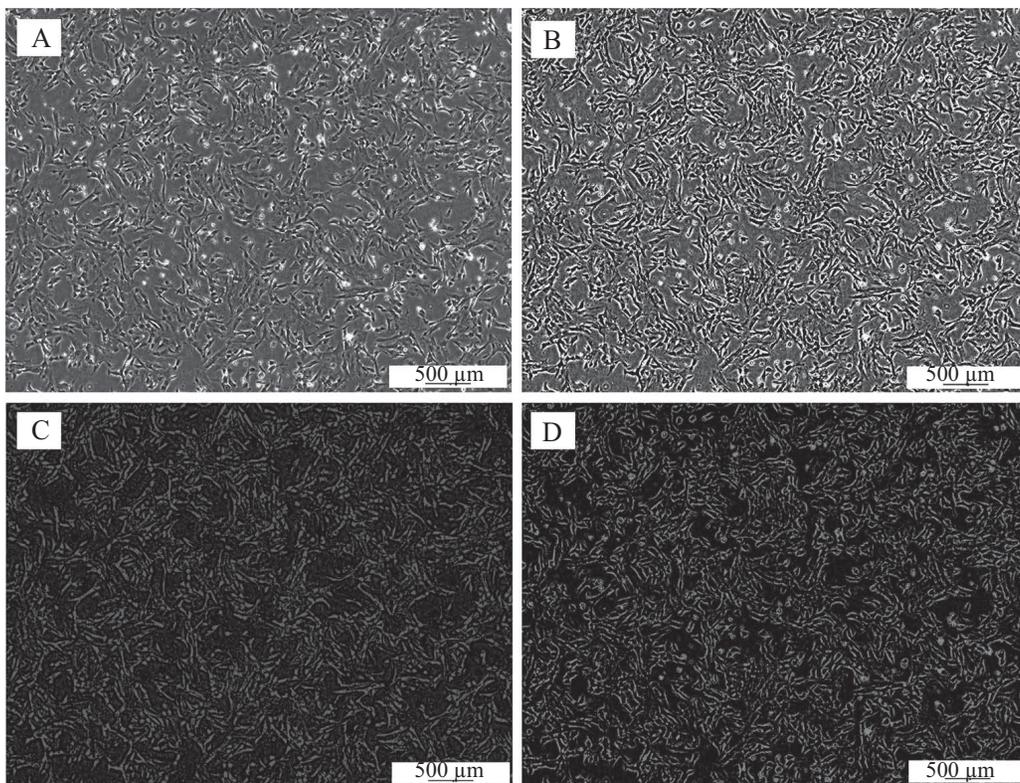
#### 1.4 细胞汇合度分析

图像经过后处理算法,实现了细胞和背景的较好区分。通过像素计数法统计后处理所得图中的细胞像素数 $sum2$ ,将其代入表达式(12),计算最终汇合度 $rate2$ ,并以百分比形式输出。

$$rate2 = \frac{sum2}{M \times N} \times 100\% \quad (12)$$

## 2 结果

为描述图像处理效果,本文采用如图3A所示的60%细胞汇合度的贴壁UC-MSCs相衬显微图像(放大40倍)为例,按照图1所述流程依次进行图像处理。预处理过程中,首先依据表达式(5)对原始图像应用高低帽变换组合算法进行处理,处理结果如图3B所示,可以看到,高低帽变换以灰度形态学为基础,能有效增强贴壁UC-MSCs图像前景与背景的对比度。接着,依据表达式(7)、(8)对高低帽变换组合后的图像应用背景减除算法,得到突出细胞内和细胞边缘区域的背景减除图。如图3C和图3D所示,有效解决了由于背景不平衡造成图像分割难的问题,为后续

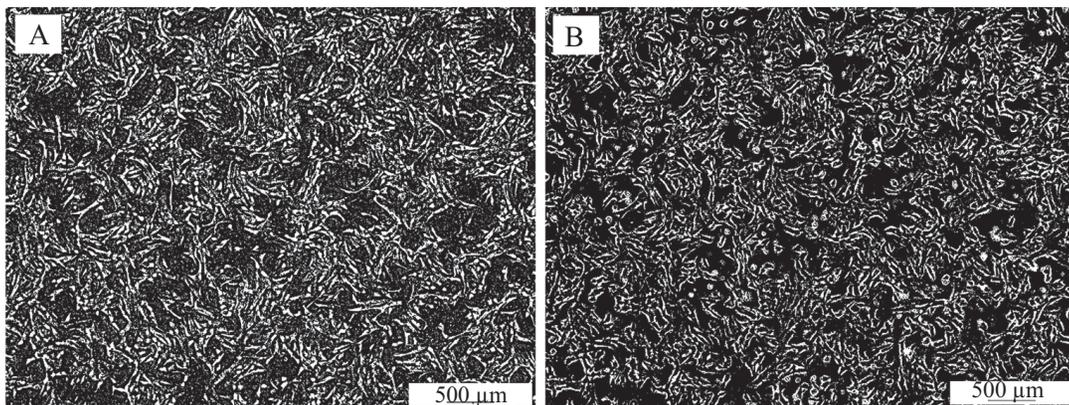


A: UC-MSCs 60%细胞汇合度图像; B: 高低帽变换组合后的图像; C: 突出细胞内区域的背景减除图; D: 突出细胞边缘区域的背景减除图。

A: UC-MSCs image of 60% confluence; B: the result image processed by top-bottom hat transformation of gray morphology; C: the image contains the cell interior region; D: the image contains the cell boundary region.

图3 UC-MSCs 60%细胞汇合度图像及其预处理过程

Fig.3 UC-MSCs image of 60% confluence and the preprocessing procedure

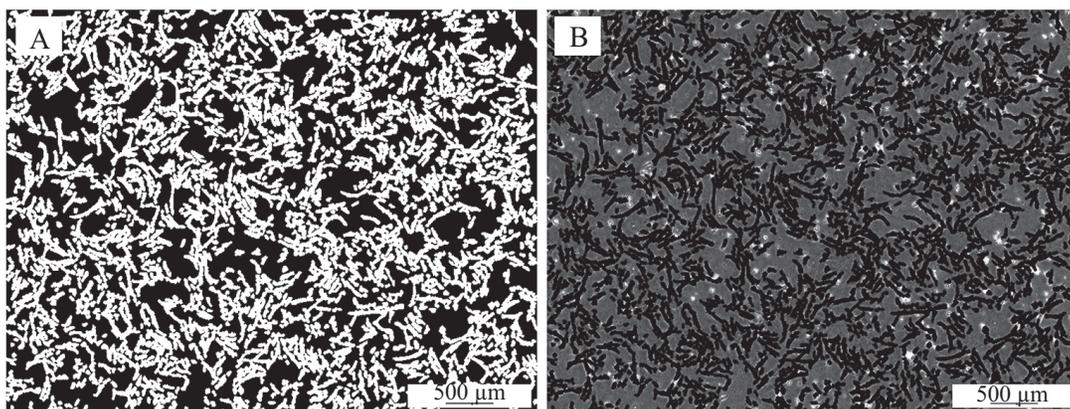


A: UC-MSCs内部区域聚类结果图; B: UC-MSCs边缘区域聚类结果图。

A: the clustering result image of UC-MSCs interior region; B: the clustering result image of UC-MSCs boundary region.

图4 UC-MSCs 60%细胞汇合度图像分割结果

Fig.4 The segmentation result of UC-MSCs image about 60% confluence



A: 优化处理后的图像; B: 像素级相乘后的图像。

A: the optimized image; B: the image of the pixel level multiplication.

图5 UC-MSCs 60%细胞汇合度图像处理最终结果

Fig.5 The final results of UC-MSCs image about 60% confluence

的分割处理奠定了基础。

图像预处理后,采用改进的K-Means聚类算法完成对图像背景与细胞的粗分,图像分割结果如图4所示。可以看到,细胞内和细胞边缘区域基本实现了完整的分割。图像分割完成后,采用后处理操作将分割结果进行优化,首先通过面积滤波算法去除分割结果中的噪声,然后依据关系表达式(10)采用合理的膨胀运算对细胞图像进行断点连接,实现细胞和背景的较好区分,优化处理后的图像如图5A所示。同时,为直观体现图像处理效果,对优化处理后的图像进行灰度取反,并将其与原始图像像素级相乘,相乘结果如图5B所示。

基于上述处理过程,依据表达式(12)对优化处理后的图像进行汇合度分析,结果显示为54.18%。

同时,采用此算法对不同汇合度(汇合度范围5%~90%)的10幅贴壁脐带间充质干细胞显微图像进行了分割处理,其汇合度计算结果与人工检测结果的平均偏差为2.5%,准确性较高。进一步采用成对 $t$ 检验方法,计算不同汇合度条件下细胞汇合度的图像处理评估结果,其与人工评估结果的成对 $t$ 检验 $P$ 值为0.97,  $P>0.05$ 表示两者在统计学上无显著差异。本文提出的图像处理方法可有效替代传统人工方法对细胞汇合度进行自动检测。

### 3 讨论

针对体外培养贴壁细胞相衬显微图像的特点,本文提出一种基于图像处理的自动分析贴壁细胞生长汇合度的方法。首先,运用灰度形态学高低帽

变换组合与背景减除相结合的预处理算法增强图像对比度,同时抑制背景中与细胞灰度近似的干扰因素。预处理后,根据图像灰度分布特征采用改进的K-Means聚类算法实现前景和背景的粗略区分。接着采用面积滤波与二值形态学相结合的后处理算法优化图像分割结果,实现前景和背景的良好区分(如图5A所示),进一步计算汇合度。该方法较好地解决了贴壁UC-MSCs相衬显微图像前景与背景对比度弱、背景灰度不平衡、含溶液杂质和组织碎屑等不利于图像分割的问题。

实验结果显示,在不同细胞汇合度(从5%到90%)的条件下,基于图像处理的汇合度自动评估结果与人工评估结果的平均偏差为2.5%,且成对t检验进一步证明二者在统计学上具有一致性,表明该实验方法具有很好的自适应性,在不同细胞密度条件下均可得到与人工评估相似的结果。需要指出的是,这里采用人工评估结果作为对照,并不意味着将其作为精确的结果,也就是说,自动评估结果与人工评估结果存在偏差,并不代表自动评估的准确性比人工评估低。相反,人工评估易受到检验员水平和经验等主观因素的影响,且往往只能作出大体的估计,准确性较低;而基于图像处理的自动评估根据图像像素的灰度进行聚类分割,并精确计算细胞区域面积与图像面积的比值从而得到细胞汇合度,相比人工评估,其可提供更准确的细胞汇合度指标。

综上,本文提出了一种基于图像处理的自动分析贴壁细胞生长汇合度的方法,实现了在不破坏细胞生长环境的条件下对生长汇合度作出客观准确的自动检测,从而替代传统人工评估方式。同时,该方法作为细胞自动化培养的关键技术之一,在体外培养细胞产品的研发与应用中具有重要的意义。

### 参考文献 (References)

- Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95(1): 9-20.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-301.
- 毕薇薇, 郭立斌, 李志刚. 人脐带源间充质干细胞的培养及生物学性状. *中国现代医学杂志*(Bi Weiwei, Guo Libin, Li Zhigang. Culture and biological characteristics of human umbilical cord derived mesenchymal stem cell *in vitro*. *China Journal of Modern Medicine*) 2009; 19(10): 1511-33.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(7): 3908-13.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 王艳, 王海萍, 吕洋. 中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化. *中国组织工程研究*(Wang Yan, Wang Haiping, Lv Yang. Chinese medicine induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2014; 20(1): 155-60.
- Li YN, Liu X. Bone marrow mesenchymal stem cells. *Academic Journal of Kunming Medical College* 2005; 9(17): 2673-77.
- Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2010; 109(2): 277-82.
- Bai H, Chen P, Tang GO, Lin L, Fang H, Mu GG, *et al*. Relations between reactive oxygen species and Raman spectral variations of human umbilical cord mesenchymal stem cells with different viability. *Laser Phys* 2011; 21(6): 1122-9.
- Liao W, Zhong J, Yu J, Xie J, Liu Y, Du L, *et al*. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24(3/4): 307-16.
- Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 195-207.
- EI Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20(5): 523-44.
- Wang L, Wang L, Cong X. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev* 2013; 22(24): 3192-202.
- Fu Y, Wang Q, Zhou J, Liu S, Fang B, Wei X, *et al*. Reduced intensity conditioning and co-transplantation of unrelated peripheral stem cells combined with umbilical cord mesenchymal stem/stroma cells for young patients with refractory severe aplastic anemia. *Int J Hematol* 2013; 98(6): 658-63.
- 谢理哲, 吴江, 李德玉, 林江莉, 王天富, 郑昌琼. 基于图像分析的骨髓间充质干细胞活性评价方法. *生物医学工程杂志*(Xie Lizhe, Wu Jiang, Li Deyu, Lin Jiangli, Wang Tianfu, Zheng Changqiong. A method based on image processing and analyzing technology for estimating the activity of mesenchymal stem cells. *J Biomed Eng*) 2006; 23(2): 279-81.
- 马德义, 戴若兰, 李廉, 吴承虎. 生物细胞图像分割技术的进展. *生物医学工程杂志*(Ma Yide, Dai RuoLan, Li Lian, Wu Chenghu. The state and development of cell image segmentation technology. *J Biomed Eng*) 2002; 19(3): 487-92.
- 汤春明, 许东滨, 马玲, 王炎庆. 神经元干细胞序列图像的结合局部灰度阈值的水平集分割算法. *计算机辅助设计与图形学学报*(Tang Chunming, Xu Dongbin, Ma Ling, Wang Yanqing. Level-set segmentation algorithm combined with local gray threshold on image sequences of neuron stem cells. *Journal of Computer-Aided Design and Computer Graphics*) 2010; 22(8): 1279-85.
- Afridi MJ, Liu C, Chan C, Baek S, Liu X. Image segmentation of mesenchymal stem cells in diverse culturing conditions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89(1): 516-23.
- Serra J. *Image analysis and mathematical morphology*. New York:

- Academic Press, 1982, 43-50.
- 20 Serra J. Introduction to mathematical morphology. *Computer Vision Graphics and Image Processing* 1986; 35(1): 283-305.
- 21 Sternberg SR. Grayscale morphology. *Computer Vision Graphics and Image Processing* 1986; 35(3): 333-55.
- 22 章毓晋. 图象工程上册-图象处理和分析, 第二版. 北京: 清华大学出版社, 1999, 269-72.
- 23 Lee CK, Wong SP. A mathematical morphologic for segmenting heavily noise-corrupted images. *Pattern Recognition* 1996; 29(8): 1347-58.
- 24 Singh M, Patel P, Khosla D, Kim T. Segmentation of functional MRI by K-means clustering. *IEEE Trans Nucl Sci* 1996; 43(3): 2030-6.
- 25 Lloyd S. Least squares quantization in PCM. *IEEE Trans Inform Theory* 1982; 28(2): 129-37.
- 26 Arthur D, Vassilvitskii S. K-means<sup>++</sup>: the advantages of careful seeding. *Eighteenth Acm-siam Symposium on Discrete Algorithms* 2007; 11(6): 1027-35.