

文章编号: 1007-1482 (2015) 02-0180-0184

• 体视学理论方法 •

DOI: 10.13505/j.1007-1482.2015.20.02.013

体视学测试设计的几点考虑

杨正伟

(川北医学院 形态定量研究室, 南充 637000)

摘要: 运用体视学方法测量切片(截面)图像前,我们需要设计确定测格图案、视野间距与测量项目,后者包括测量什么结构及其定量指标以及进行什么基本测试——测点、交点、轮廓或粒子等的计数,直径或截距等的测量。基于对生物组织的形态定量研究经验,笔者认为,体视学测试的设计应考虑涉及测什么、怎么测与测多少的 8 个方面:(1) 结构量化的指标选择精细,(2) 相关结构的综合测量考究,(3) 所测结构的分类辨认准确,(4) 多项测试的组合搭配适当,(5) 不同结构的测试分配合理,(6) 切片测量的顺序安排稳妥,(7) 单个视野的测试测量容易,(8) 个体统计的样本含量合适。结合笔者的研究实例,本文简要地阐述了体视学测试设计中的这 8 点考虑。

关键词: 体视学; 测试; 设计

中图分类号: N3

文献标识码: A

Some considerations in the design of stereological tests

YANG Zhengwei

(Morphometric Research Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: Before measuring sectional images with stereological methods, we need to design and determine the pattern of test grid, the distances between fields of view, and the items of measurement, the last including what structures and their quantitative parameters to measure and what basic tests to perform – counting of test points, intersections, profiles or particles and so on, and measuring of diameters or intercepts and so on. Based on the experience of research in the morphometric study of biological tissues, the author suggests that the consideration in designing stereological tests should be 8 facets involving what to

收稿日期: 2015-05-07

作者简介: 杨正伟 (1963-), 男 (汉), 重庆璧山人, 教授。

研究方向: 形态定量研究。E-mail: zwyang@nsmc.edu.cn

measure, how to measure and how much to measure: (1) fine choice of parameters for quantifying structures, (2) selective synthetical measurement of relevant structures, (3) accurate classification and identification of structures to be measured, (4) suitable combination of multiple tests, (5) reasonable apportioning of measurement of different structures, (6) reliable arrangement of sections to be measured in turn, (7) easy measurement of single fields, and (8) appropriate sample size of individual statistic. In the present paper these considerations in the design of stereological tests are concisely elaborated with examples of the author's research.

Key words: stereology; test; design

0 引言

运用体视学方法测量切片(截面)图像前,我们需要设计确定测格图案、视野间距与测量项目。光镜下的测格图案最好由软件生成并叠加在用电脑屏观察的切片图像上,涉及测点、测线或测框的间距、多少或尺寸等;视野间距最好用机动显微镜载物台来控制^[1]。测量项目包括测量什么结构及其定量指标以及进行什么基本测试——测点、交点、轮廓或粒子等的计数,直径或截距等的测量。由于是定量研究,测试期间必需坚持(不能随意改变)由设计方案所确定的测试标准,否则,如测后发现问题,就可能需要全部重测。因此,正式测量之前,有必要对设计方案进行(反复的)预试分析^[2]。

具体的测试设计,主要取决于研究的目的与内容,很大程度上也取决于设计者的体视学(包括形态学)理论知识与实践经验。基于对生物组织的形态定量研究经验,笔者的体会是,体视学测试的设计应考虑涉及测什么、怎么测与测多少的以下8个方面。

1 结构量化的指标选择精细

这是定量研究的关键,决定着具体的测试方法。例如,若要研究呼吸阻塞或哮喘对肺内肺泡腔大小的影响,可研究肺泡空间的总体积与星体积这2个

指标,因此可同时进行测点计数与点取截距测量^[2-3]。又如,若要研究附睾内贮存的精子数量,可研究附睾内的精子总数,因此最好采用光学体视框来计数精子^[2,4];考虑到精子计数既麻烦又耗时,如果精子几乎都是以精子团的形式出现,就可以精子团的总体积来间接反映精子总数,这样就只需采用测点计数这种简便的测试^[2,5-6]。

2 相关结构的综合测量考究

即实践中要注意思考,所选择研究的结构是否合适、全面,是否可同时研究相关结构以全面或更好地反映其形态变化。例如,测量某种因素对睾丸内生精小管体积的影响时,就要注意观察考虑是否有必要同时测量生精小管腔,即把生精小管分成生精上皮和生精小管腔来测量^[2,5-7]。有意思的是,用这两者的体积,结合其他研究结果——生精小管的直径,我们还可进一步估计生精上皮的厚度,而这一指标可间接反映或佐证生精上皮里生精细胞数量的变化^[2,5-7]。又如,测量小肠绒毛的表面积(或脊髓灰质内突触素颗粒的数量)时,就最好同时测量小肠浆膜的表面积(或灰质内神经元的数量),因为前后两者结果的比值这个指标,可对比(与结构量不易变化的后者相比)显示前者的大小(或多少),也可避免生物组织形态定量研究中常见的问题——参照陷阱^[2,8-9]。

3 所测结构的分类辨认准确

这是准确测试的前提。(1)要采用能清晰辨认所测结构(和其他结构)的足够大的分辨率与放大倍数。(2)所测结构(和其他结构)要有明确的定义。实际操作上,①测试前,最好先做个“病理诊断”——仔细观察切片,确定所测结构的主要形态特征(与改变)^[2];②预试中、测试前,最好先写出结构的定义。例如,所测“肺泡空间”指的是什么,是否包括以及怎么确定导管部的腔“生精小管”指的是什么,是否包括其周围的基膜与肌样细胞。③注意测试记录可疑结构或相关特征。例如,在计数睾丸间质内的Leydig细胞核时,若有些细胞核难以准确辨认,就可把这部分细胞核定义为可疑Leydig细胞核单独记录^[10]。又如,在计数生精小管轮廓时,若所数轮廓中见部分轮廓有重要相关形态特征(例如长形精子细胞滞留、精子细胞脱落或减少),就可分类计数这些轮廓^[5-7,10]。

4 多项测试的组合搭配适当

无论研究什么,有一项内容一般都要测,那就是针对所测结构的测点计数——用以估计其体积或体积分数等^[2]。若还要测量其他项目(例如交点、轮廓或粒子计数,直径或截距测量),就可考虑多项测试同时进行,只要这些项目的测量能在同一视野、同一放大倍数下进行。这是为了收到事半功倍之效。例如,若所进行的研究要估计胎盘绒毛的表面积,自然就该设计利用既包含测点又包含测线的测格,前者用于测点计数以估计绒毛的体积,并用于估计实际用于交点计数的测线总长,后者用于交点计数以估计(结合交点计数结果与测线总长)绒毛的表面积^[2,11]。若要测量生精小管的直径,就可设计利用既包含测点又包含测框的测格,前者用于测点计数

以估计生精小管的体积(即使以后不发表或利用这个测量内容,也不宜在测量时忽略它),后者用于挑选生精小管来测其直径^[2,5-7,10]。

5 不同结构的测试分配合理

即在(平均)每个视野上,针对不同所测结构所计数的测点、交点、轮廓或粒子等的数量,或者所测量的直径或截距等的数量,最好相似或差异不大。多种同样重要的所测结构中,若针对其中一种结构的测量多得多,就可减少这种结构的测量以提高效率;若针对某种重要结构的测量,反倒比其他结构的测量少得多,就有必要增加重要结构、减少其他结构的测量以避免“短板效应”。例如,若某种拟测重要结构(例如生精小管腔)的体积,比其他结构(例如整个生精小管和间质)小得多,就可用较密集的测点(例如在每个视野上叠加20个测点)来计数该结构,而用较稀疏的测点(例如仅用较密集测点中的1个测点,或仅用1个单独设计的不同形状的测点)来计数其他结构^[2,6]。又如,若切片里所数的某种细胞(例如生精小管里的精原细胞)很少,而另一种细胞(例如精子细胞)很多,就可在视野上叠加多个(例如4个)测框,用所有测框来计数前者,而只用其中1个测框来计数后者,甚至可只用部分(例如1/2)所选视野来计数后者^[2,10]。

6 切片测量的顺序安排稳妥

即有多组切片需要测量时,最好能交替测量各组的切片。例如,首先测量对照组的1个动物的1张切片,然后测量实验组的1个动物的1张切片,再测量对照组的另1个动物的1张切片,再测量实验组的另1个动物的1张切片……^[2]。整项体视学研究可能要测很多切片,花很长时间;其间,测试者的测量标准可能会有一定的改变,仪器设备的工作性

能也可能会有一些变化。如上交替测量切片,虽不能矫正这些改变所致系统误差,但可增加各组间的可比性,使组间的对比更可靠。

7 单个视野的测试测量容易

每个视野里要计数的测点、交点、轮廓或粒子等,或者要测量的直径或截距等,最好只有几个,此即所谓的“几个”原则^[2]。每个视野测少点、测快点,有利于增加测试视野甚至切片的数量,从而提高整个测试的效率。此即所谓“多而粗”测试的好处^[2]。另外,单个视野(或者说“一口气”)测试的量大了,可能易致测试疲劳或厌烦。尤其是,运用光学体视框计数粒子时,如果单个测框计数的粒子偏多(例如超过10个),计数过程中就可能难以记住或确定计数结果;此时,单个测框的双倍计数,可能就不如2个测框的单倍计数来得快速、轻松。因此,单个视野的测试测量容易,还可能更易保证各个视野测试的顺利进行。

8 个体统计的样本含量合适

这是抽样估计准确性的重要保证。一般经验是,在从每个个体(每个人或动物的某个或某种所测器官,或器官内的某个或某种所测亚器官)随机抽选的所有切片的所有视野上,针对每种所测结构(主要感兴趣的结构,例如生精小管而非其内的管腔或周围的间质,间质内的Leydig细胞而非其周围的细胞)所计数的测点、交点、轮廓或粒子等的总数,或者测量的直径或截距等的总数,最好能接近或达到,但通常不必超过,一二百个。此即所谓的“一二百”原则^[2]。前提是:放大倍数要适当,即在保证能清晰而准确辨认所测结构的前提下,放大倍数宜较小;抽样间距要较大(例如遵循“几个”原则),即抽样宜广延而不局限。一般来讲,随机抽选很多轮廓来测量时,平均每个轮廓内计数的测点数,测线与每个轮廓形

成的平均交点数,或从每个轮廓平均测量的截距数等,都不宜大于1。

参考文献(References)

- [1] 杨正伟. 体视学研究的辅助工具: 现状与展望[J]. 中国体视学与图像分析, 2013, 18(3): 249-254.
YANG Zhengwei. Assisting tools in stereological studies: current status and perspectives[J]. Chinese Journal of Stereology and Image Analysis, 2013, 18(3): 249-254. (in Chinese)
- [2] 杨正伟. 生物组织形态定量研究基本工具: 实用体视学方法[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
YANG Zhengwei. Essential tools for morphometric studies of biological tissues: practical stereological methods[M]. Beijing: Science Press, 2012. (in Chinese)
- [3] Yang Z W, Qin Y H, Su S R. Use of star volume to measure the size of the alveolar space in the asthmatic guinea-pig lung[J]. Respirology, 2002, 7(2): 117-121.
- [4] Wen X H, Yang Z W. Quantitative (stereological) study on the spermatozoal storage capacity of epididymis in rats and monkeys[J]. Asian Journal of Andrology, 2000, 2(1): 73-77.
- [5] Peng B, Mao Y, Tang X F, et al. Comparison of spermatogenic damage induced at 6 months after ligation of the vas deferens at proximal and distal locations in the rabbit[J]. Andrologia, 2011, 43(2): 129-138.
- [6] Ma L, Guo Y, Yuan Y, et al. Morphometric study of the testis and reproductive tract (including sperm granuloma) after vasectomy in mature rats[J]. Asian Journal of Andrology, 2015 Mar 17. [Epub ahead of print]
- [7] Zhengwei Y, Wreford N G, Schlatt S, et al. Acute and specific impairment of spermatogonial development by GnRH antagonist-induced gonadotrophin withdrawal in the adult macaque (*Macaca fascicularis*) [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1998, 112(1): 139-147.
- [8] 朱家媛, 杨正伟, 崔成虎. 小鼠小肠绒毛表面积的定量研究[J]. 川北医学院学报, 1990, 5(3): 1-4.

- ZHU Jiayuan , YANG Zhengwei , CUI Chenghu. A quantitative study of the surface area of the villi in the small intestine of the mice [J]. Journal of North Sichuan Medical College , 1990 , 5(3) : 1 - 4. (in Chinese)
- [9] Peng B , Lin J Y , Shang Y , et al. Plasticity in the synaptic number associated with neuropathic pain in the rat spinal dorsal horn: a stereological study [J]. Neuroscience Letters , 2010 , 486(1) : 24 - 28.
- [10] Yang Z W , Kong L S , Guo Y , et al. Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study [J]. Asian Journal of Andrology , 2006 , 8(3) : 289 - 299.
- [11] Huang A , Zhang R , Yang Z. Quantitative (stereological) study of placental structures in women with pregnancy iron-deficiency anemia [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology , 2001 , 97(1) : 59 - 64.

• 动态与信息 •

2015 年《中国体视学与图像分析》征稿函

《中国体视学与图像分析》是经国家新闻出版署批准,中国科学技术协会主管、中国体视学学会主办的国家级学术期刊。该刊多年来一直是中国科技论文统计源期刊——中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)、《中国学术期刊综合评价数据库》全文收录期刊、中国期刊网中国学术期刊(光盘版) 全文收录期刊、《中国学术期刊文摘》收录期刊、《中国生物医学文献数据库》收录期刊、《中文生物医学期刊文献数据库》收录期刊、《中国生物医学科学引文数据库》收录期刊和《CAJ - CD 规范》执行优秀期刊。

《中国体视学与图像分析》热忱欢迎国内外从事体视学研究及图像分析的专家学者积极投稿。

投稿内容:

凡涉及体视学、图像分析、三维视觉、三维成像与可视化、相关图像的获取(如各种显微镜、CT、特种摄影技术) 和处理技术、相关数学原理的研究(几何概率、分形理论、数学形态学)、计算机仿真与信号处理、三维图像技术及其在各专业领域(如生物学、医学、材料科学、地学、矿物学、农学、遥感、计算机、航空等) 中研究和应用的内容, 均可给本刊投稿。

投稿要求:

1、来稿应具有创新性、学术性。中英文论文兼收。研究论著全文在 7000 字以内, 综述论文一般不超过 8000 字。凡涉及保密内容或作者所在单位科技成果的文章请作技术处理, 并经作者单位保密审查后加盖公章再投寄。

2、欢迎以电子邮件(tscss@mail. tsinghua. edu. cn) 方式提交论文稿。

3、来稿的内容要齐全、完整(如: 标题, 作者姓名, 作者单位及地址, 邮编, 中英文摘要, 关键词, 中图法分类号, 文献标识码等)。

4、参考文献格式参照《文后参考文献著录规则(GB/T7714 - 2005) 》规范著录。

编辑部地址: 北京市海淀区清华大学工物系(刘卿楼) 211 室(100084); 电话: 01062776336