

# 川北医学院2010级硕士研究生课程“体视学方法”第1讲

- **体视学概况**
- **面积与体积估计**
- **边长与表面积估计**

**杨正伟**

**川北医学院 形态定量研究室（教授、主任）**

**电话：0817-2242778；E-mail：zwyang@nsmc.edu.cn**

**体视学网页：<http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology/>**

# 教学材料

## 1. 提供：

- **参考资料：**下列论文的单印本
  - 若干定量形态学问题, 2000
  - 睾丸组织结构的若干定量方法及其应用, 2001
  - 细胞数的体视学定量研究, 2003
  - 形态计量, 2003
  - 均匀随机方向上的体视学测试: 各向同性随机测试, 2006
- **测试材料：**模型/实际结构图像打印件
- **测试工具：**透明胶片测格 ( test grid )

## 2. 自备：计算器、笔记本、普通直尺或三角板

# 1、体视学概况

## ( Introduction to Stereology )

- 体视学概念\*：二维形态特征 ↔ 三维形态特征

---

\*杨正伟. 什么是体视学? [http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology/list\\_3.asp](http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology/list_3.asp), 2009-9-7.

---

- **1963**：国际体视学学会 / International Society for Stereology
- **1987**：中国体视学学会 / Chinese Society for Stereology
- **定量金相** / Quantitative Metallography
- **定量形态学**：形态定量  
Quantitative Morphology: Morphometry

# 2、任意轮廓的面积估计 (Area estimation of arbitrary profiles)

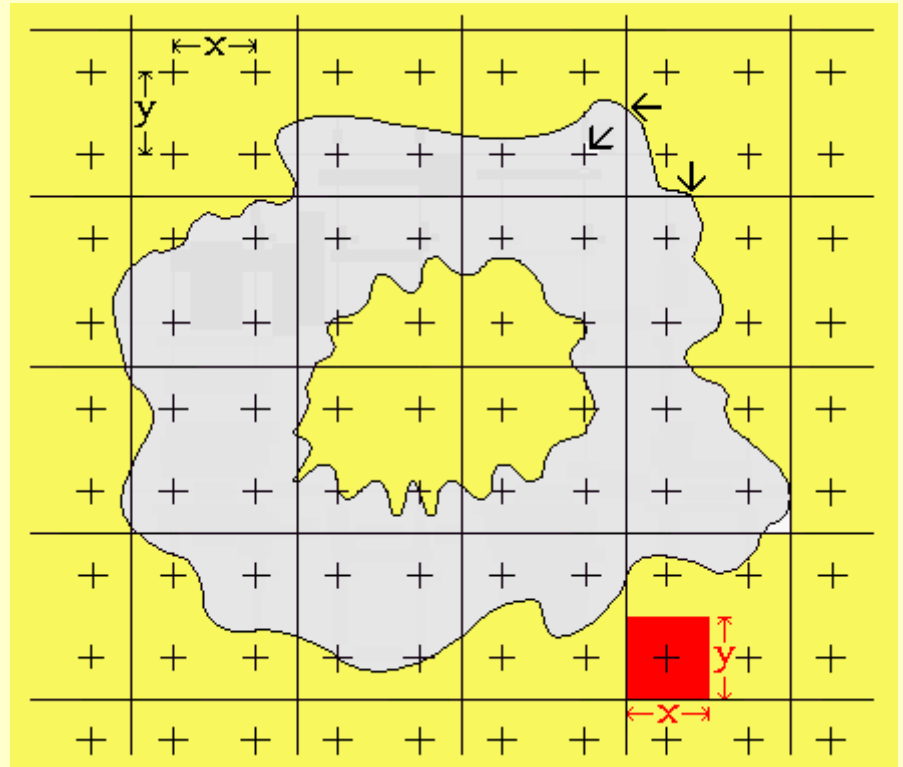
基本方法：点计数法 (point counting)

重要公式：

轮廓面积  $A = P \times a_p$

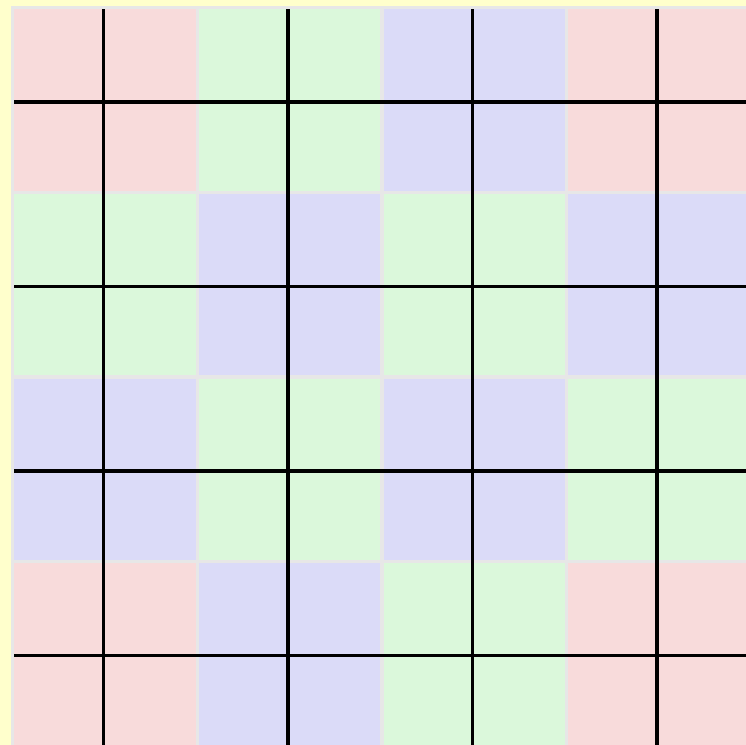
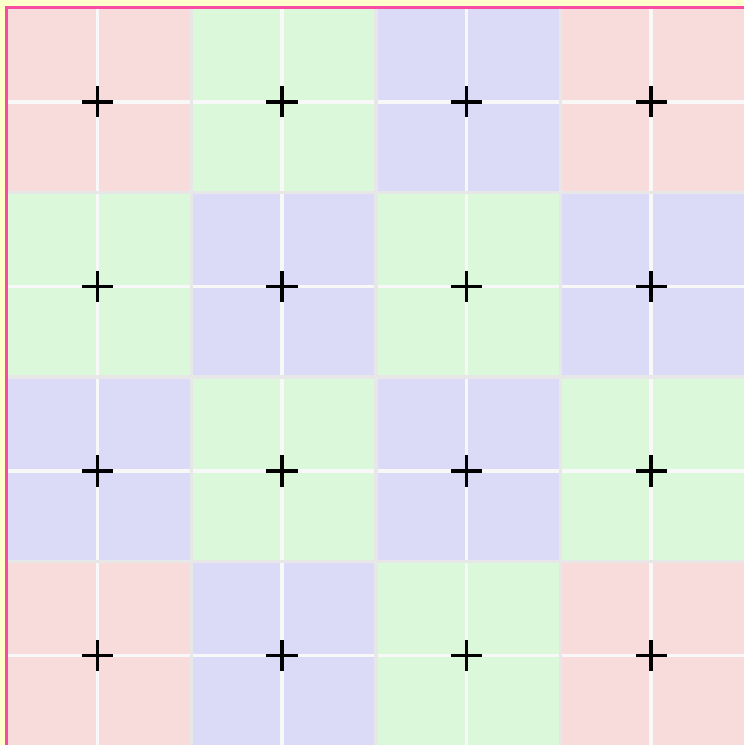
$P$  = 计数的测点总数

$a_p$  = 每个测点所关联  
(占有)的面积

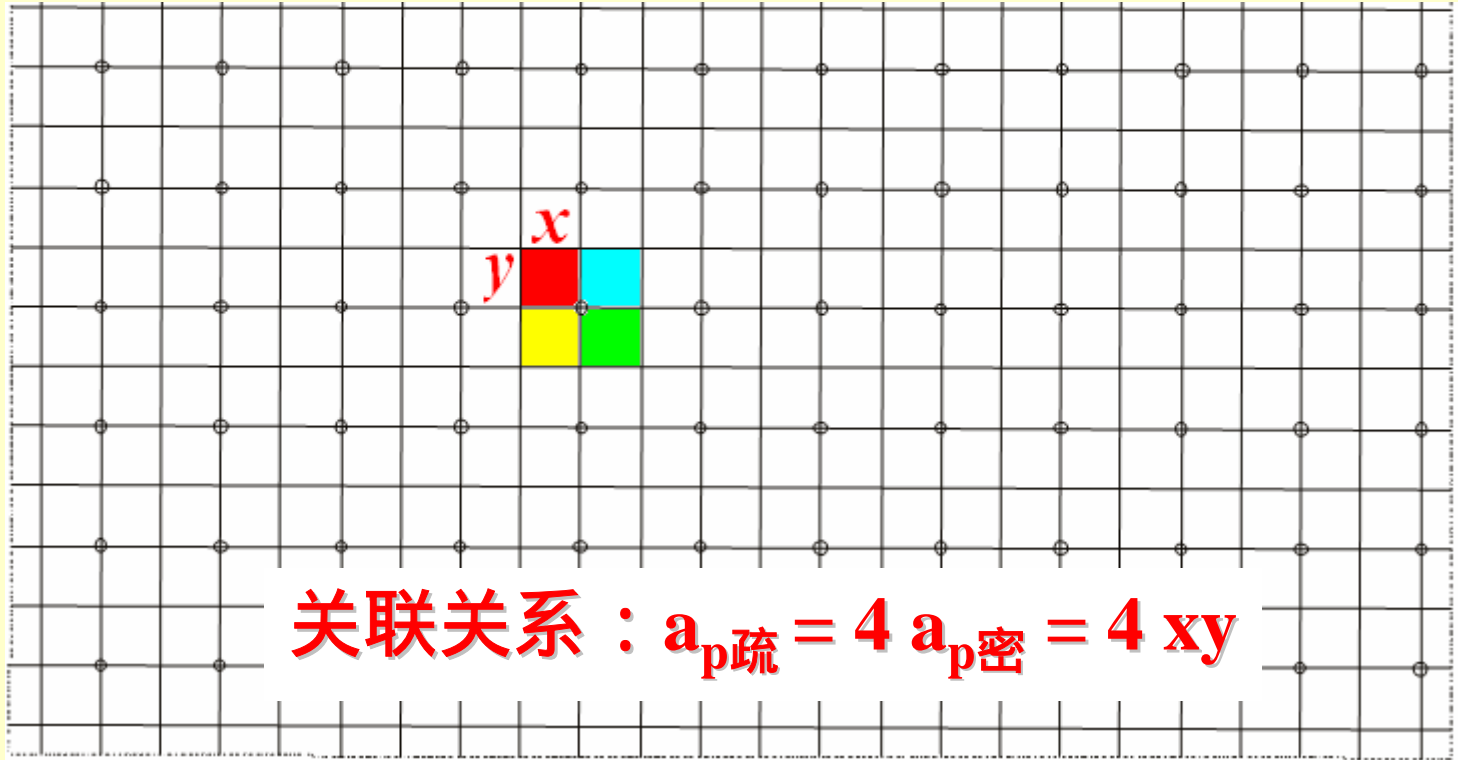


# 测点设计与 $a_p$

- 测点排列规则、均匀，各个测点所关联的测试面的形状、大小一样且完全镶嵌。
- $a_p = \text{整个测试面的面积} / \text{整个测试面内的测点总数}$

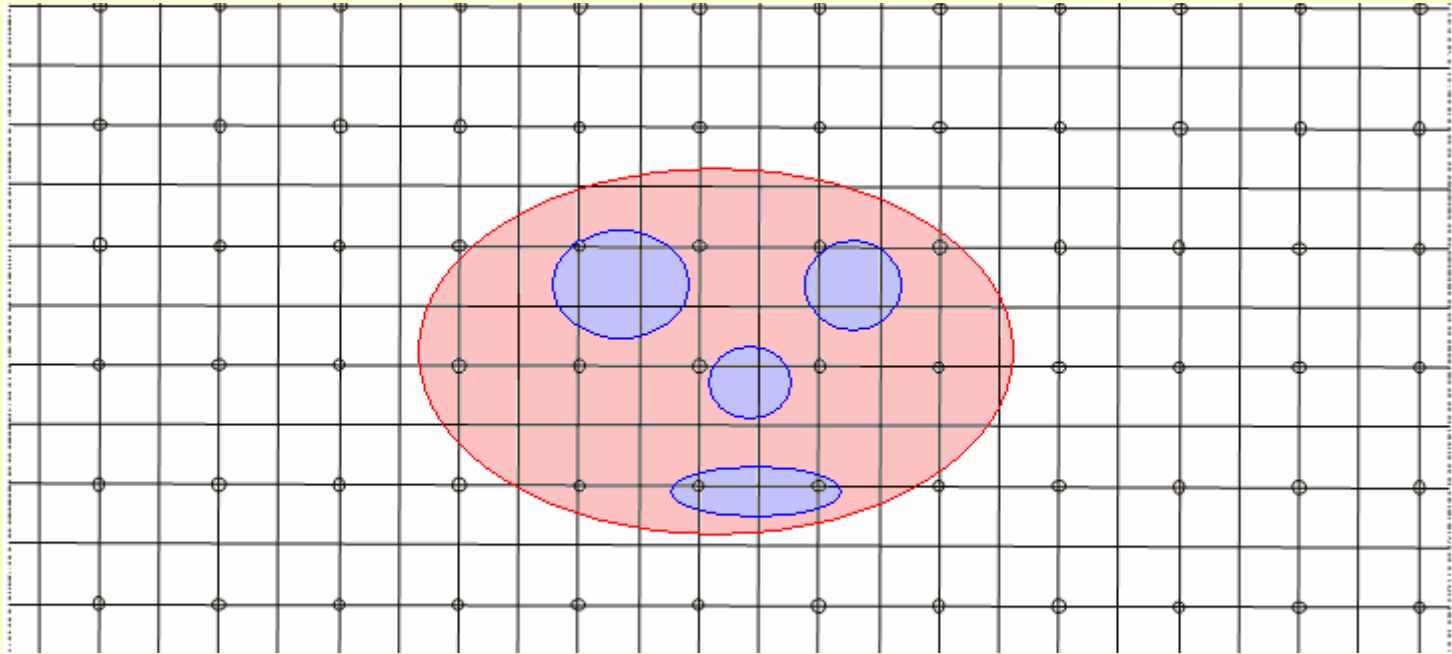


# 组合测试系统 (integral test system) : 有多个相关联测试元素的测格 (test grid)



共384个“密点” (实线交点), 96个“疏点” (小圆所圈)

# 组合测格/测试系统的用途：提高测试效率 ——不同密度的结构用不同密度的测点...



切片/参照面内数“疏点”，蓝色结构内数“密点”  
蓝色结构所占面积比例 =  $(10 + \dots) / [4 \times (12 + \dots)]$

# 练习：用测点计数估计圆的面积

1. 从测试材料中任意选择1个或多个邻近的圆，测量其直径，计算其总面积
2. 选择1种透明胶片测点测格（提供有3种），确定  $a_p$ （= 横向点间距  $\times$  纵向点间距）
3. 沿任一方向把测格随机叠加在圆上（要完全覆盖所测圆），计数位于圆内的测点总数  $P$ ，由此估计圆总面积： $A = P \times a_p$
4. 如上重复 3 次估计圆总面积，然后计算平均值、标准差、标准误、误差系数



- **平均值** ( mean, average,  $\bar{x}$  )  
=  $(x_1 + x_2 + x_3) / 3$
  - **标准差** ( standard deviation, SD )  
=  $\{[(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2] / 2\}^{1/2}$
  - **变异系数** ( coefficient of variation, CV )  
=  $SD / \bar{x}$
- 

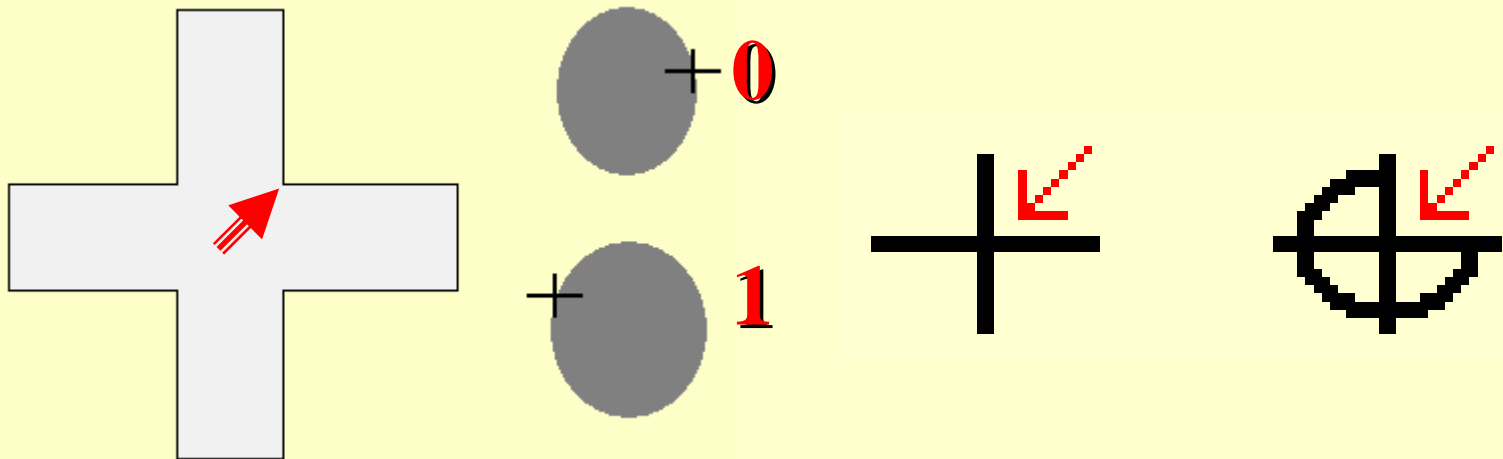
### **单纯随机抽样** ( simple random sampling ) :

- **标准误** ( standard error of the mean, SE )  
=  $SD / n^{1/2}$
- **误差系数** ( coefficient of error, CE )  
=  $SE / \bar{x}$

# 讨论：关于点计数估计面积

- 实际所用测点有一定大小 → “边缘效应”问题  
(在所测结构边缘的测点是否在所测结构内)

实用办法：所测结构是否“封闭”测点右上角



## • 误差问题

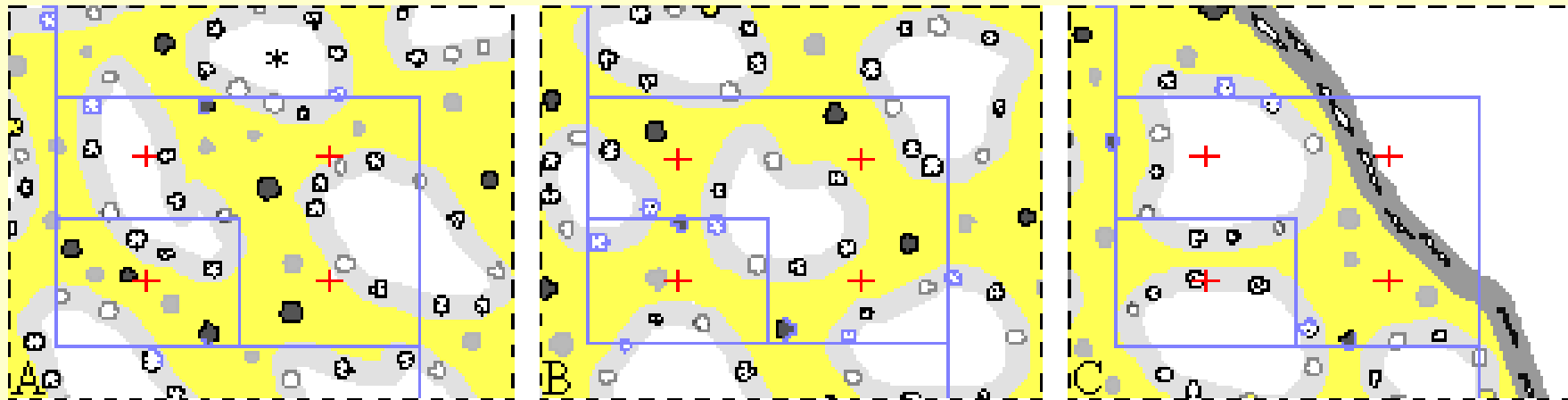
1. 抽样误差主要取决于：所测轮廓的形状与分布，测点的排列，计数的测点数
2. 用方阵测点估计1个圆的面积：如1次能数到22个测点，CE平均 $<0.05$ 。任意轮廓：CE一般 $\leq \sqrt{P}$   
[Gundersen & Jensen. *J Microsc* 1987;147:229-63.]
3. 一般经验原则：  
所测结构内总共计数100~200个测点
4. 实用分析：独立测量多次，估计误差系数

- 如果能在一个器官内随机“放”一个点，那么这个点位于该器官内的某种结构内的概率有多大？
- 如果在那个器官内随机“放”了  $P_{\text{器官}}$  个点，其中有  $P_{\text{结构}}$  个点位于那种结构内，那么那种结构在那个器官内所占体积比例的估计为多少？

### 3、面积分数与体积分数估计 ( Estimation of area/volume fraction )

**重要公式：**  $V_V = A_A = P_P$   
( 体积分数 = 面积分数 = 点分数 )

## 如何估计某器官内实质（小管）与间质结构的 $V_V$



$$\begin{aligned} V_V (\text{实质/器官}) &= \text{实质总体积} / \text{器官体积} \\ &= \text{随机视野内“击中”实质的总点数} / \text{视野内的总点数} \\ &= (1 + 0 + 2 + \dots) / (4 + 4 + 3 + \dots) \end{aligned}$$

$$V_V (\text{间质/器官}) = 1 - V_V (\text{实质/器官})$$

问：各视野的测量准确吗？ 答：...视野测试的CE...

# 如何有效减少 $V_V$ (或其他指标) 估计的误差?

- 增加每个视野内的测点数...

- 增加从每张切片内抽选的测试视野数

- 增加从整个器官切取的切片数

- 增加器官数

# 究竟要测多少.....?

## —— 统计学问题

- **一般经验：**
  - 每个视野只数几个测点...
  - 所测结构内计数的测点总数不超过100~200个...
- **基本要求：**
  - 不论是切片还是测试视野都要随机抽样（待讲）
- **一般分析：**
  - 计算器官估计值的误差系数（CE）

# 4、卡瓦列里原理与体积估计 ( Cavalieri principle & volume estimation )

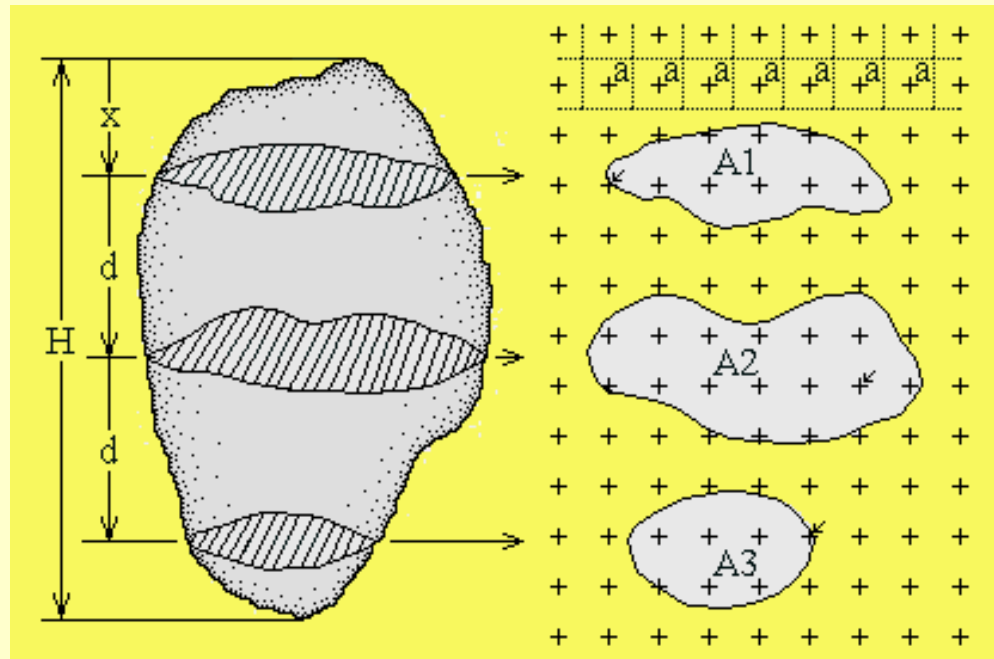
重要公式：粒子（结构）体积  $V = A \times d$

**A** = 等距随机

截面总面积

**d** = 等距随机

截面间距



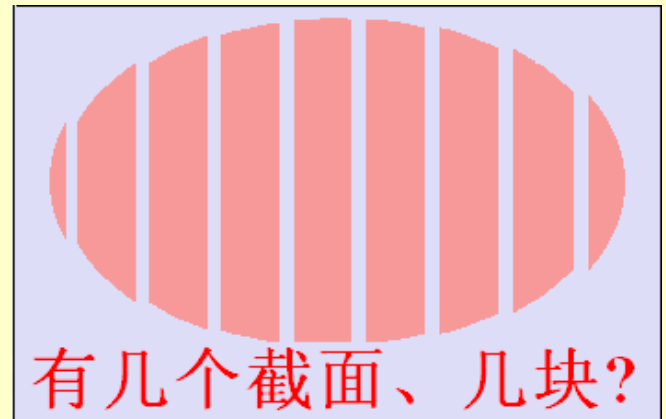
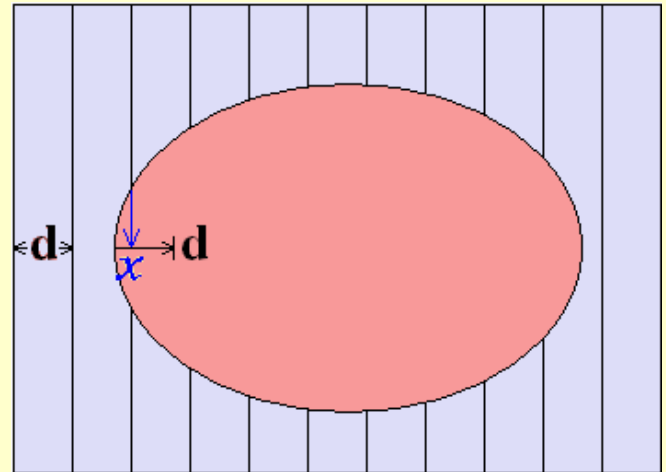
Cavalieri: 意大利, 1598-1647; 祖暅: 祖冲之(429-500)之子



# 等距 / 系统 / 机械 随机 抽样 ( Systematic random sampling )

1. 任意确定间距
2. 随机抽选第1个元素 ( $\leq$  间距)
3. 等距确定其余

包埋器官（组织块）纵径约 3 mm，完全切成连续切片（厚 25  $\mu\text{m}$ ），拟随机抽 10 张切片。怎么抽？



# 练习：估计胡萝卜（心）的体积

- 测量胡萝卜的长（拟垂直于长轴获取截面）
- 任意确定截面间距  $d$ （拟获取5-10个截面）
- 等距横切胡萝卜（垂直于同一长轴方向）
- 叠加测点测格（已知  $a_p$ ），计数位于整个胡萝卜截面以及仅位于胡萝卜心截面内的测点数，把从各截面所得结果总和起来计算： $P_{\text{胡}}$ 、 $P_{\text{心}}$
- 计算：  
胡萝卜体积 =  $P_{\text{胡}} \times a_p \times d$   
胡萝卜心体积 =  $P_{\text{心}} \times a_p \times d$

# 讨论：卡瓦列里原理的误差问题

- 抽样误差主要取决于：形状，截面数，测点数
- 对于1个球体或椭球：等距截面数不小于3，CE就不大于5%

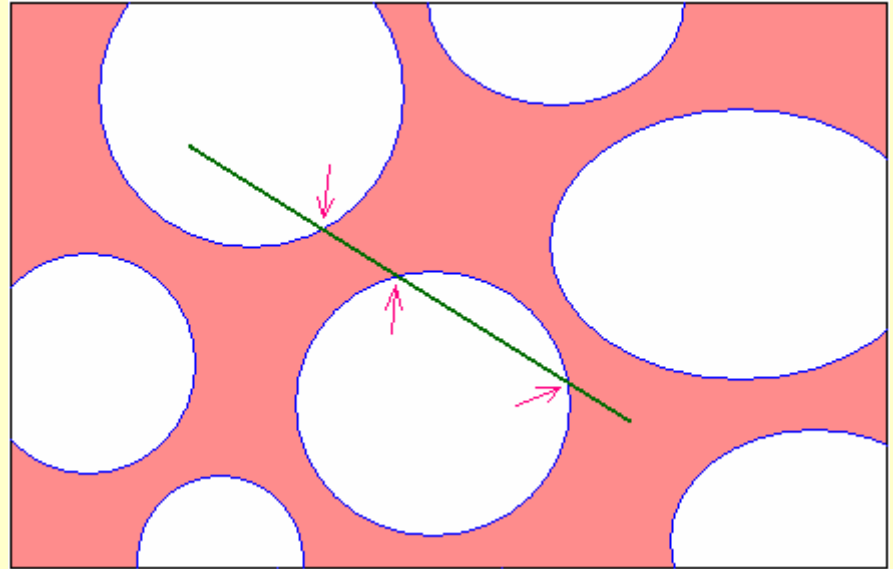
*[Cruz-Orive LM. J Microsc 1989; 153: 315-33.]*

- 一般经验原则：获取10个等距随机截面，物体高度为截面间距的整倍数，数100~200个测点

- 图中红色直线与长方框内“笔画”形成交叉点的概率取决于什么？

体视学 stereology  
形态定量 morphometry

- 如能在某器官内“随机”置放一根针（测线），那么针穿过该器官内的某种“泡状”结构 [即测线与“泡状”结构的表面（界面）形成交叉点] 的概率取决于什么？



# 5、交点计数与边长、表面积估计

(Intersection counting and boundary length & surface area estimation)

$$\text{重要公式： } S_V = (4/\pi) \times B_A = 2 \times I_L$$

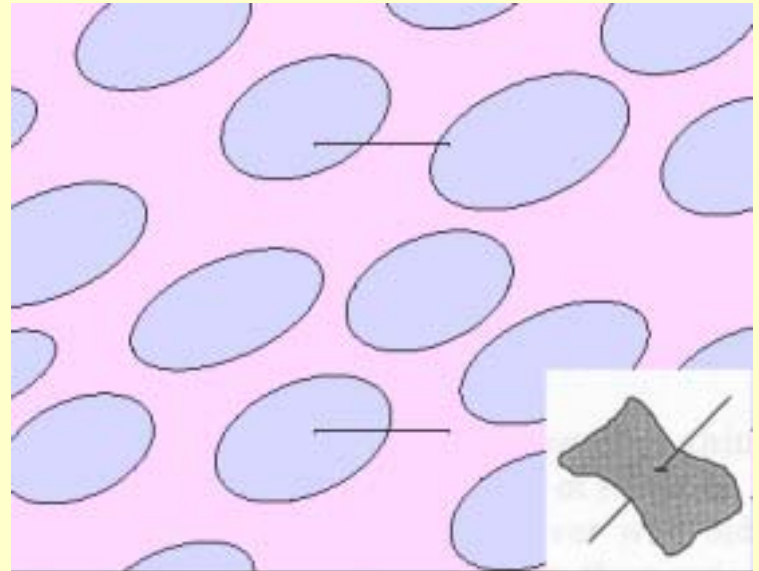
$S_V$  (surface density, 表面积密度,  $u^2/u^3, u^{-1}$ )

= 总表面积 / 器官体积

$B_A$  = 边长密度 ( $u/u^2, u^{-1}$ )

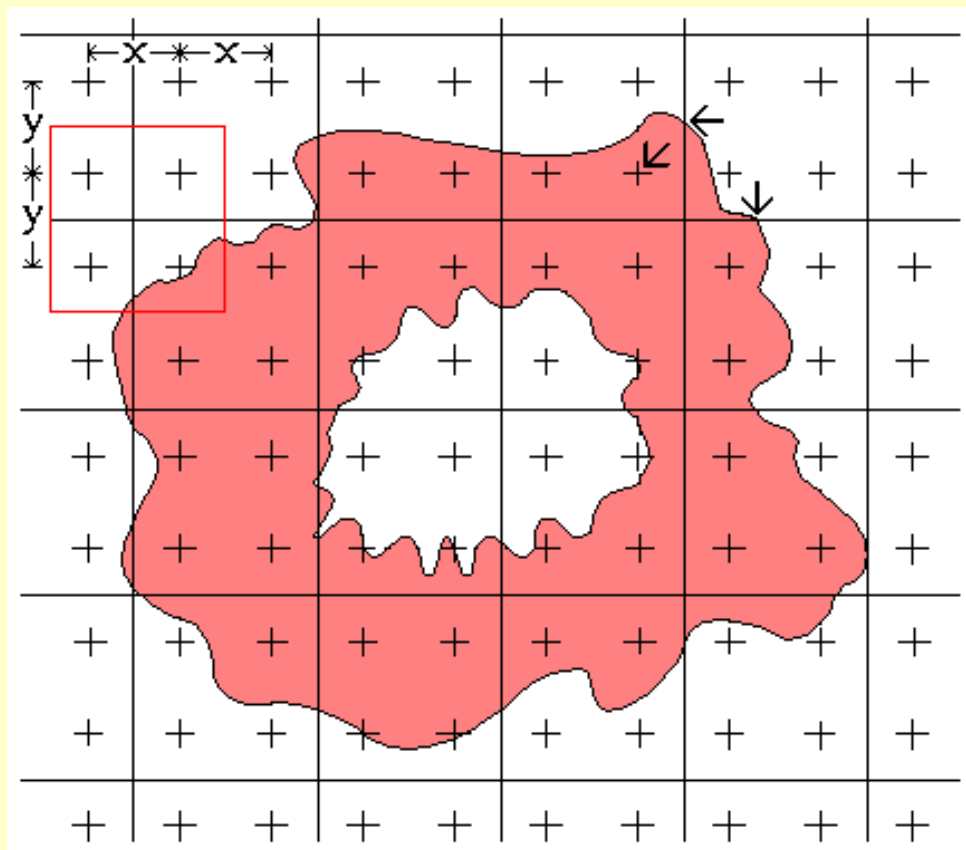
$I_L$  = 交点密度 ( $1/u, u^{-1}$ )

$$= \frac{\text{交点总数 } I}{\text{测线总长 } L}$$



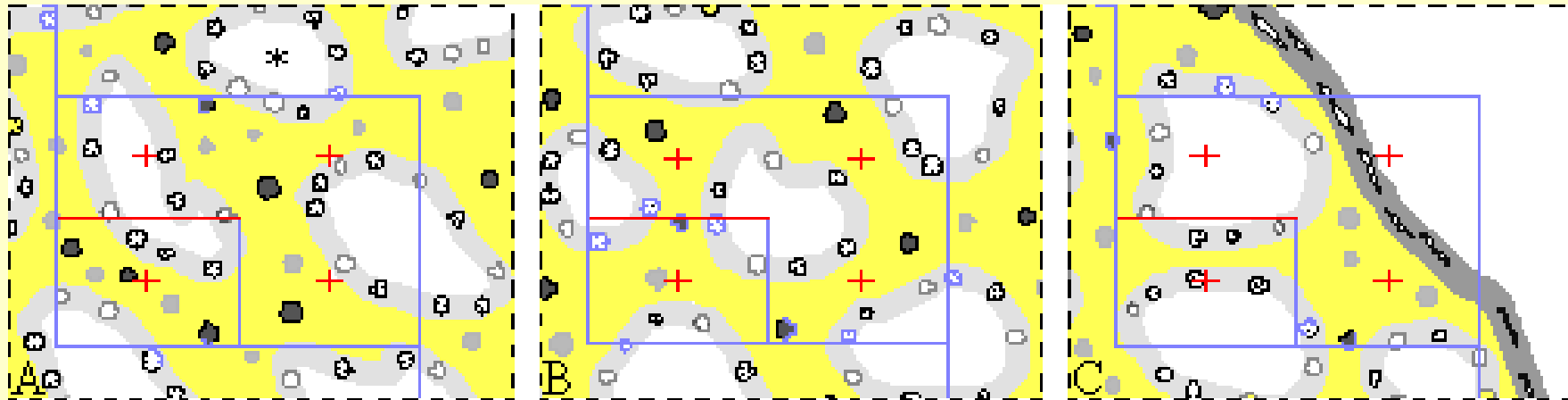
# 测点计数、交点计数与长度估计

- $a_p = xy$
- $l_p = (x+y) / 2$
- 测线总长  $L$   
= 测点数  $\times l_p$
- $B_A = (\pi/2) \times I_L$
- $B = B_A \times A$



外边线长度 = 粉红色结构外边长密度 · 粉红色结构的面积  
 =  $\{(\pi/2) \cdot 16 / [30 \cdot (x+y) / 2]\} \cdot (30 \cdot x \cdot y) = 16\pi xy / (x+y)$

# 如何估计“小管”内、外界面的表面积密度？



视野	测点			交点	
	管腔	管壁	间质	内面	外面
1	1	0	3	2	2
2	0	0	4	2	2
3	1	1	1	2	1
...	...	...	...	...	...

- 测点计数：
  - 各种结构的  $V_V$
  - 测线长度
- 交点计数：
  - 内外面的  $S_V$
- 管壁  $V_V +$  内外面  $S_V$   
 → 管壁厚度

# 练习：用点计数估计肺泡表面积

- 测试图像：

- 6 幅

- ( 假设是从一肺脏获得的随机切片的随机视野 )

- 是用20倍物镜摄取的图像

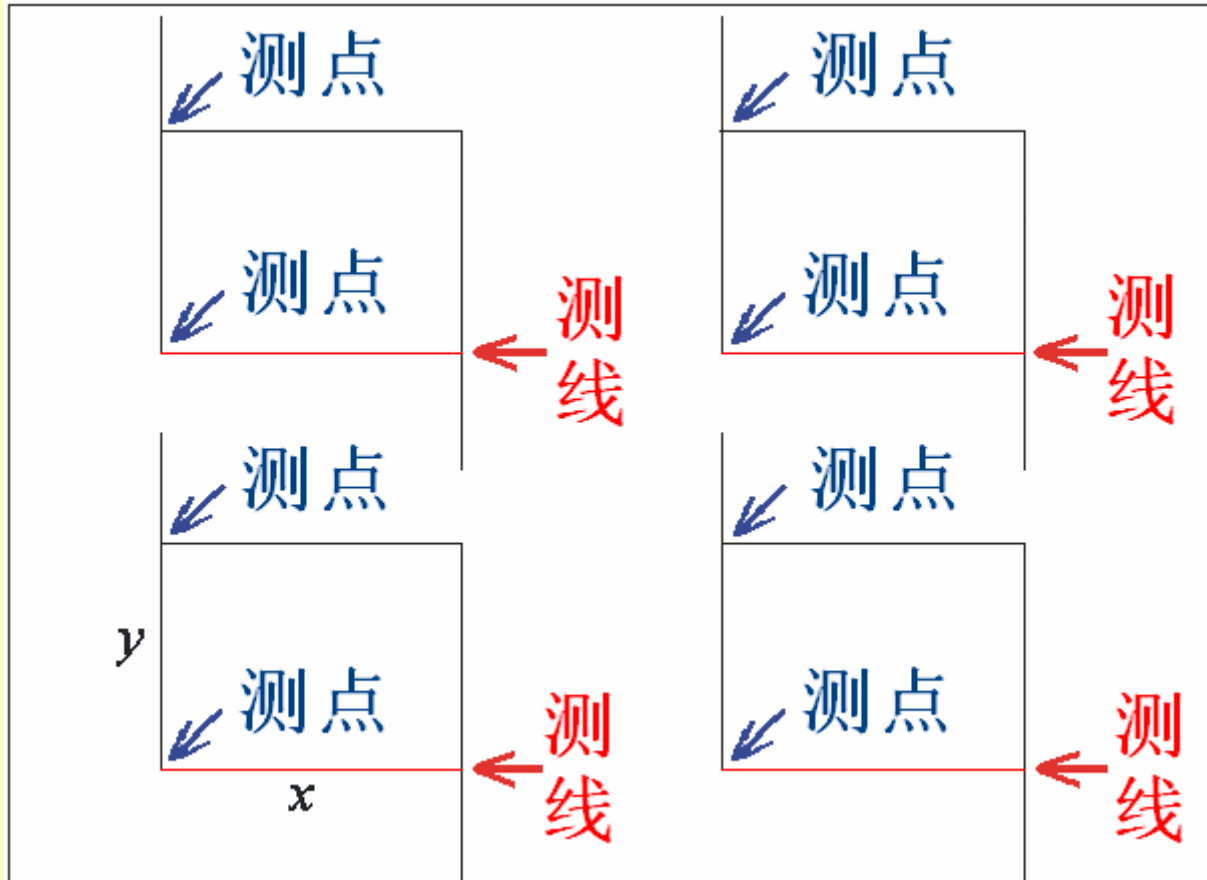
- 台微尺图象是用同一显微镜的100倍物镜摄取的。

- 已知两条刻度线之间的真实间距为10微米。用直尺测量台微尺图象上两条刻度线之间的间距 ( D 微米 ) ， 由此得台微尺图象的放大倍数： $D/10$

- 计算所测肺脏图像的放大倍数： $(D/10)/(100/20)$



# 测 格



共8个测点，4条测线； $l_p = x / 2$

- 计算每条测线的真实长度  
(直尺测量长度/放大倍数)
- 叠加测格，进行点计数
  - 肺泡及整个肺组织内的测点数
  - 测线与肺泡表面之间的交点数
- 计算
  - 肺泡在肺内的体积分数  $V_V$
  - 肺泡在肺内的表面积密度  $S_V$
  - 肺泡的表面积体积比  $S/V = S_V / V_V$
  - 假设肺体积为  $4.0 \text{ cm}^3$ ，计算肺内肺泡总表面积  
(表面积结果用  $\text{m}^2$  表示)

视野	P 泡	P 肺	I
1			
2			
3			
4			
5			
6			