

川北医学院2010级硕士研究生课程“体视学方法”第2讲

- 轮廓数与长度估计
- 粒子数估计

杨正伟

川北医学院 形态定量研究室（教授、主任）

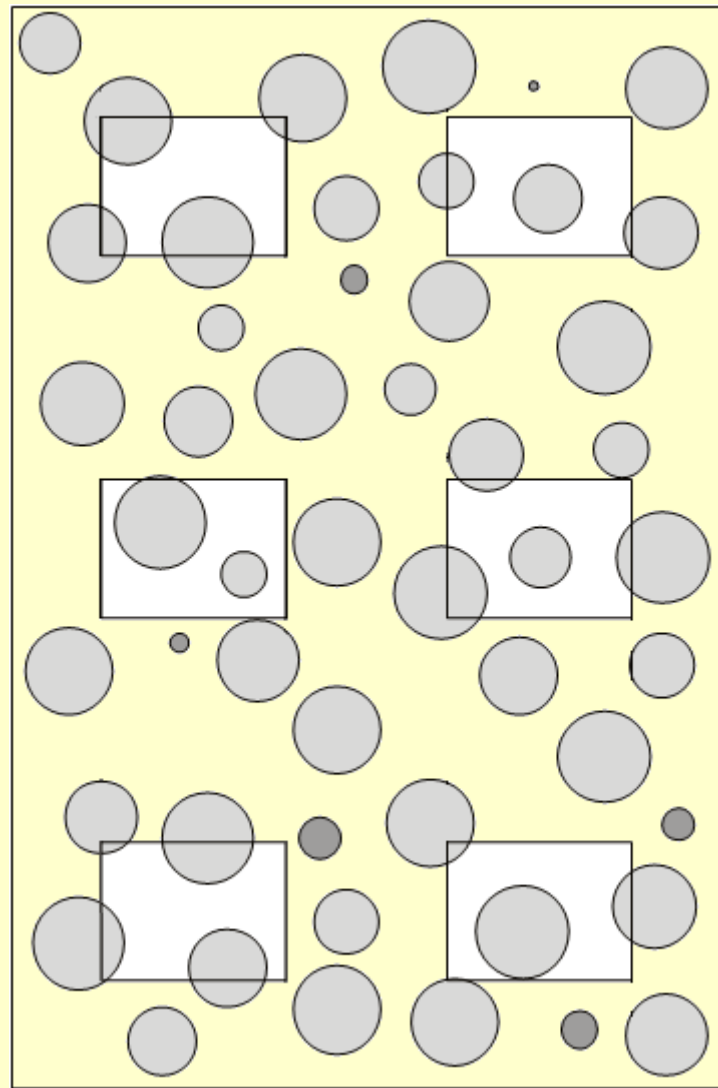
电话：0817-2242778；E-mail：zwyang@nsmc.edu.cn

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

1、轮廓数 (Profiles Number)

- 轮廓：平面结构，立体结构在平面上的投影，立体结构截面
- 轮廓数密度 Q_A (μ^{-2})

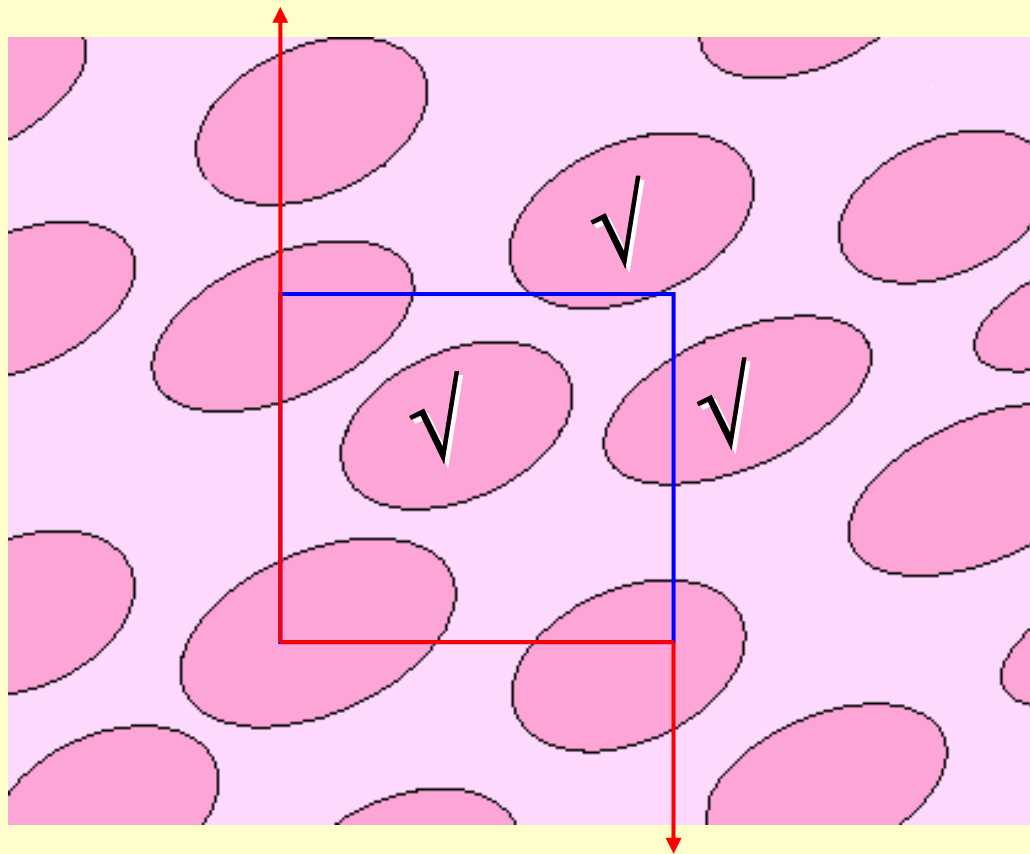
$$Q_A = \frac{\text{轮廓总数 } Q}{\text{测试框总面积 } P_{ref} \times a_p}$$



边缘效应与禁线法则

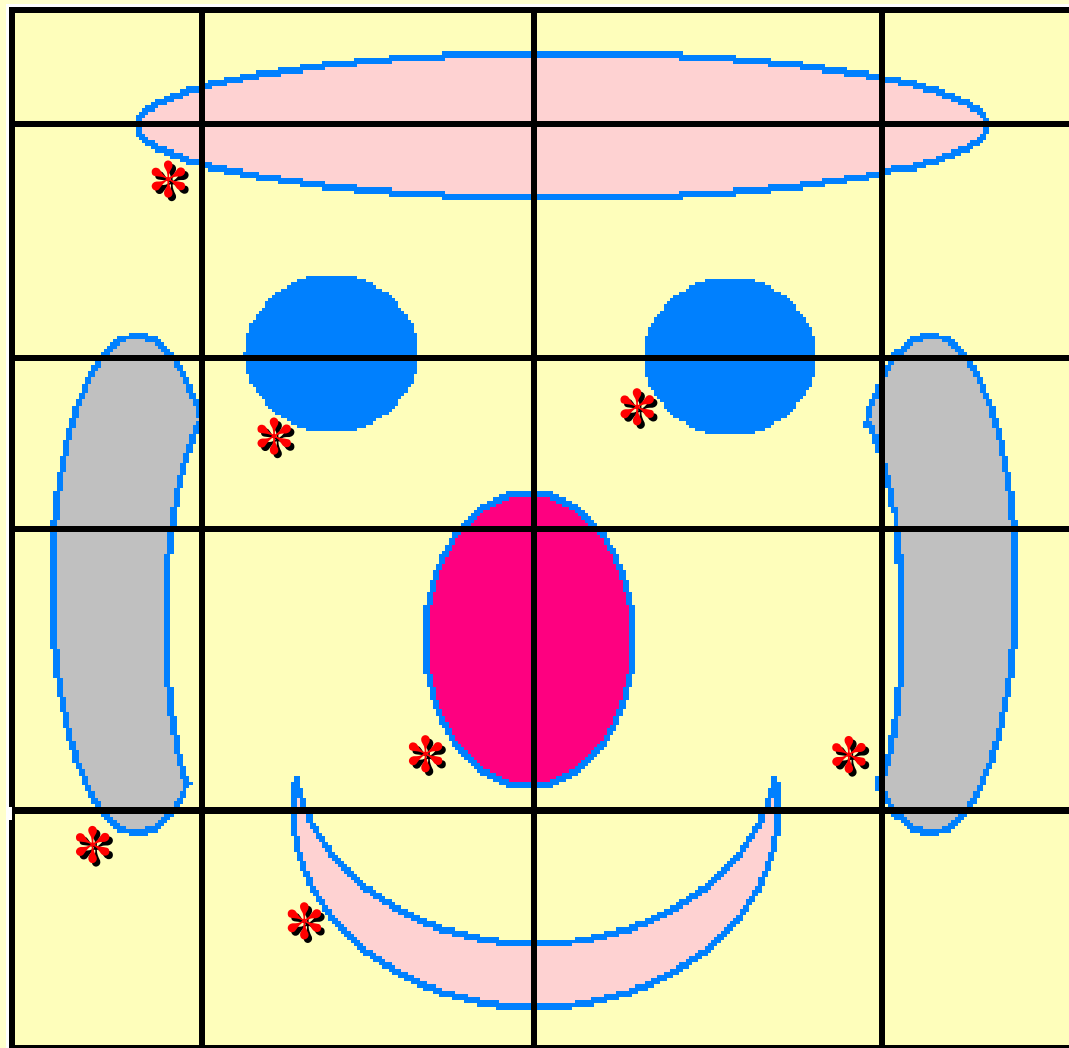
Edge Effect & Forbidden-line Rule

- 边缘效应：
与测试框边缘相交叉的
轮廓怎么办？
- 禁线法则：
与禁线相交
的不数



无偏法则：不论其大小、形状或分布，每个轮廓都有相同的机会被数到或抽选。

据禁线法则，20个小长方格“内”各“有”多少个轮廓？



练习：轮廓计数与 Q_A 估计

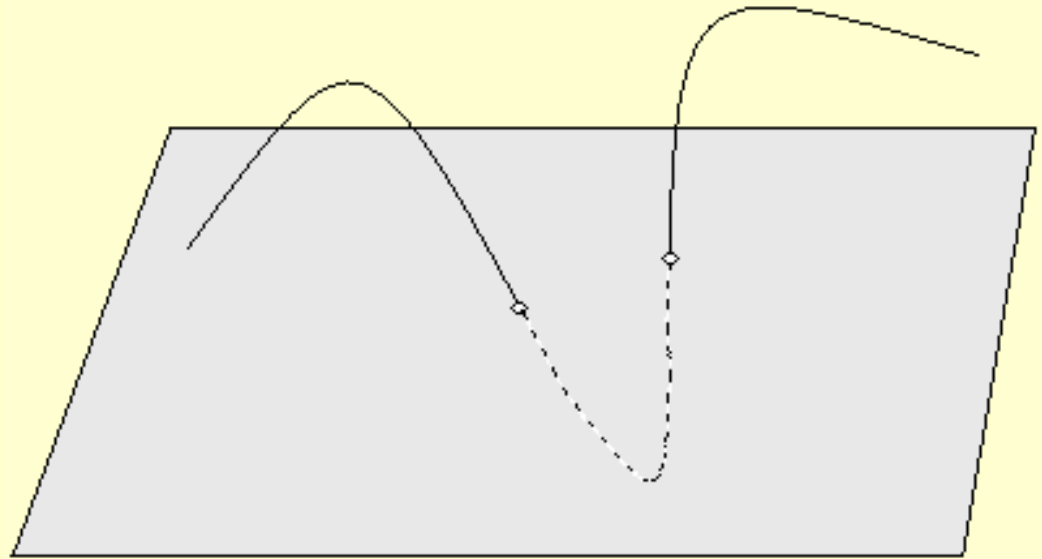
- 确定测试框的面积

(假设所测结构的放大倍数 = 1200)

- 叠加8个测试框在模型结构上，计数测试框“内”的圆形轮廓数（根据禁线法则）
- 计算（注意结果的单位）

$$Q_A = \text{计数的轮廓总数 } Q / \text{测试框总面积 } A$$

- 假如某器官内有一种线形结构（例如生精小管、肾小管、血管、神经纤维），那么通过器官的随机截面“切”到线形结构 [即在随机截面上有线形结构的断面（轮廓）形成] 的概率取决于什么？



2、轮廓数与长度估计

重要公式： $L_V = 2 \times Q_A$

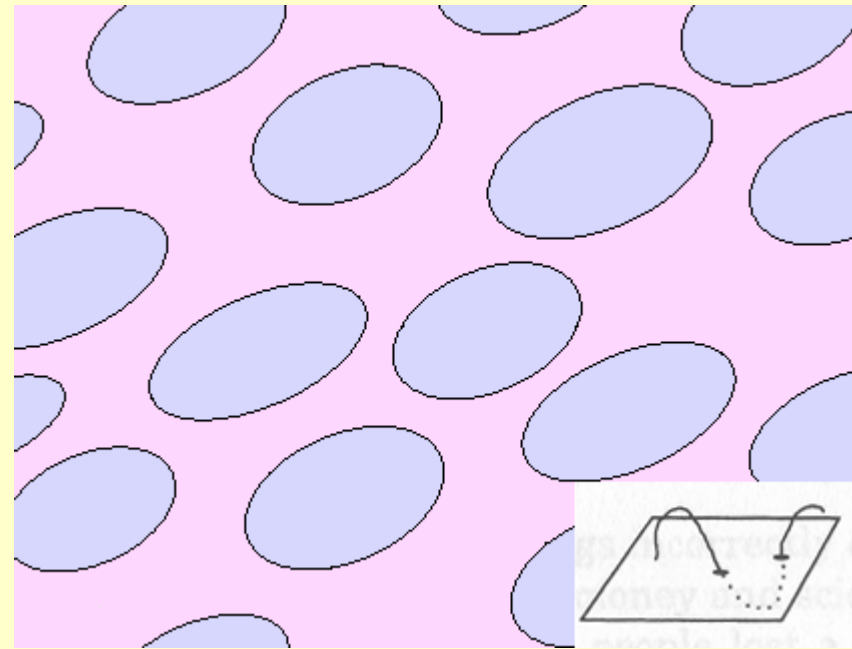
L_V = 长度密度 ($u/u^3, u^{-2}$)

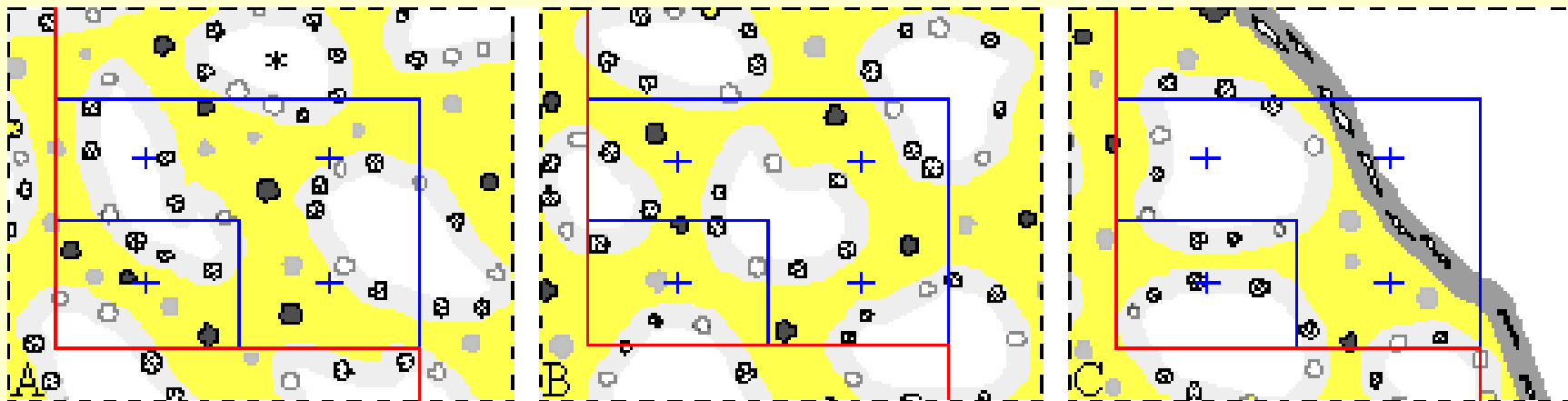
Length Density

Q_A = 轮廓数密度 (u^{-2})

轮廓总数 Q

$$= \frac{\text{轮廓总数 } Q}{\text{测面总面积 } P_{ref} \times a_p}$$





视野	测点数			轮廓数*		
	管腔	管壁	间质	小管	小管+细胞	小管-细胞
1	1	0	3	3	3	3
2	0	0	4	2	3	2
3	1	1	1	1	6	3
...

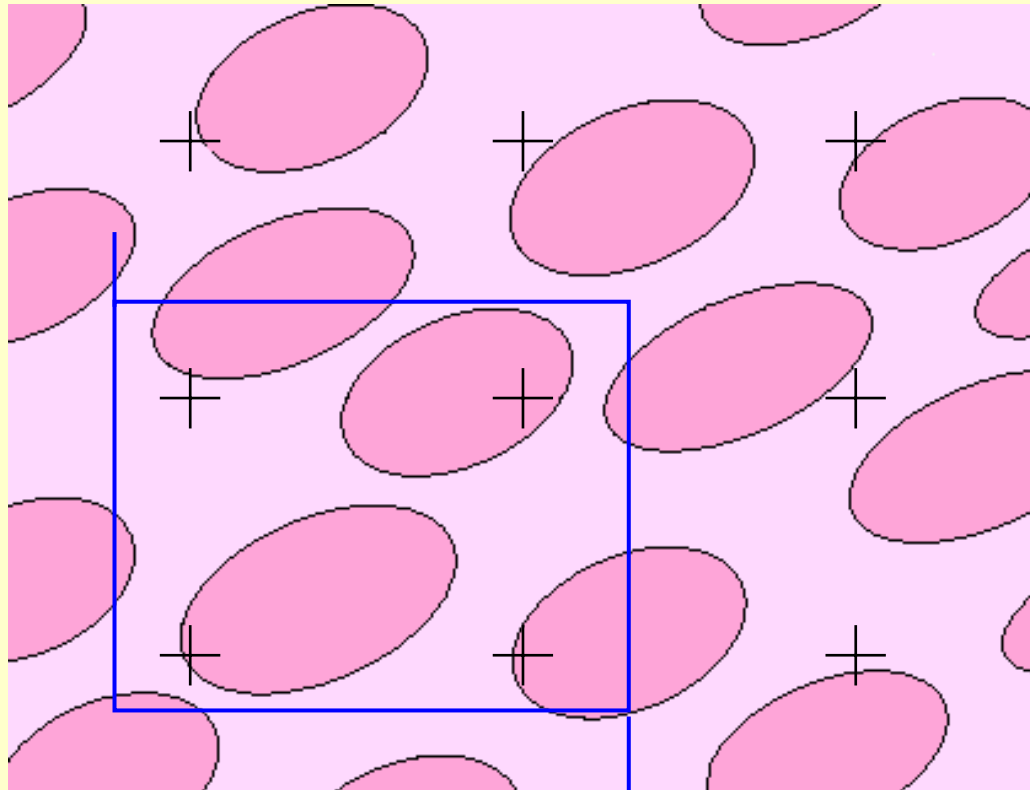
* 大框、小框分别用于计数 小管、小管壁细胞 轮廓

- **如何在切片上测量圆柱状结构的直径？**
 - **测量（贯穿了圆柱结构的）圆形切面的直径，椭圆形切面的短径**
 - **先根据禁线法则抽选（贯穿了圆柱结构的）圆形或椭圆形切面（轮廓）**
- **如果测得1/3切面的直径（短径）缩小，这个结果说明什么？**
- **这2个公式说明什么？**

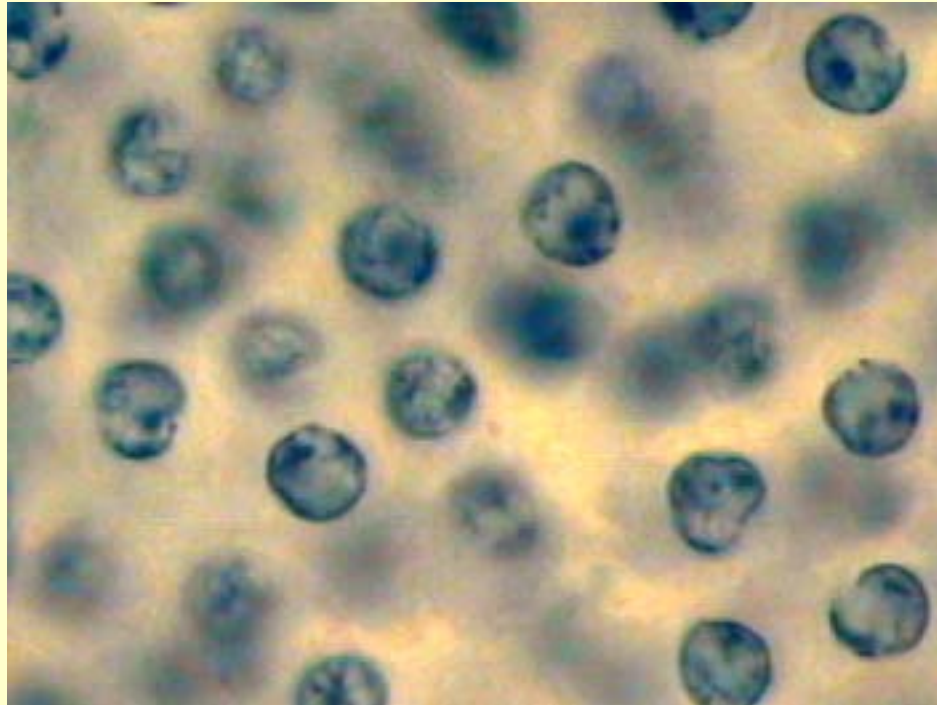
$$L \approx V / [\pi \times \overline{(D/2)^2}]$$

$$L_V \approx 4 \times V_V / (\pi \times \overline{D^2})$$

$$L_V \approx 4 \times V_V / (\pi \times \overline{D}^2)$$



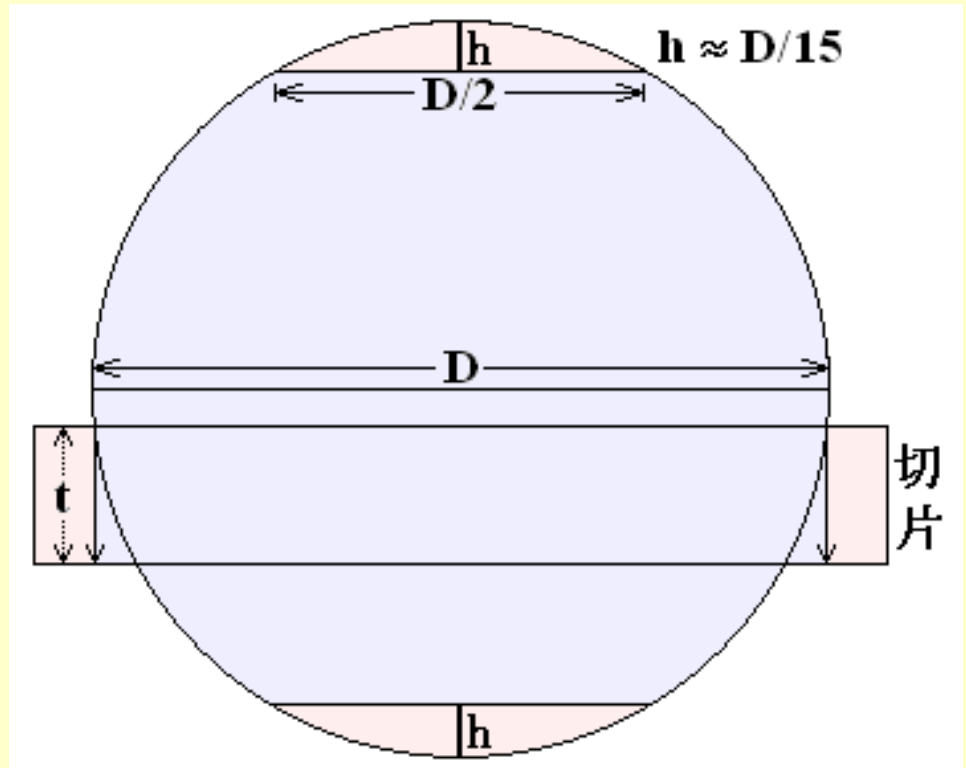
3、粒子数与轮廓数 (No. particles vs. No. of profiles)



轮廓数密度 N_A \rightarrow 粒子直径密度 D_V \rightarrow 数密度 N_V

$$N_V = N_A / \bar{D}$$

$$N_V = \frac{N_A}{\bar{D} + t - 2h}$$

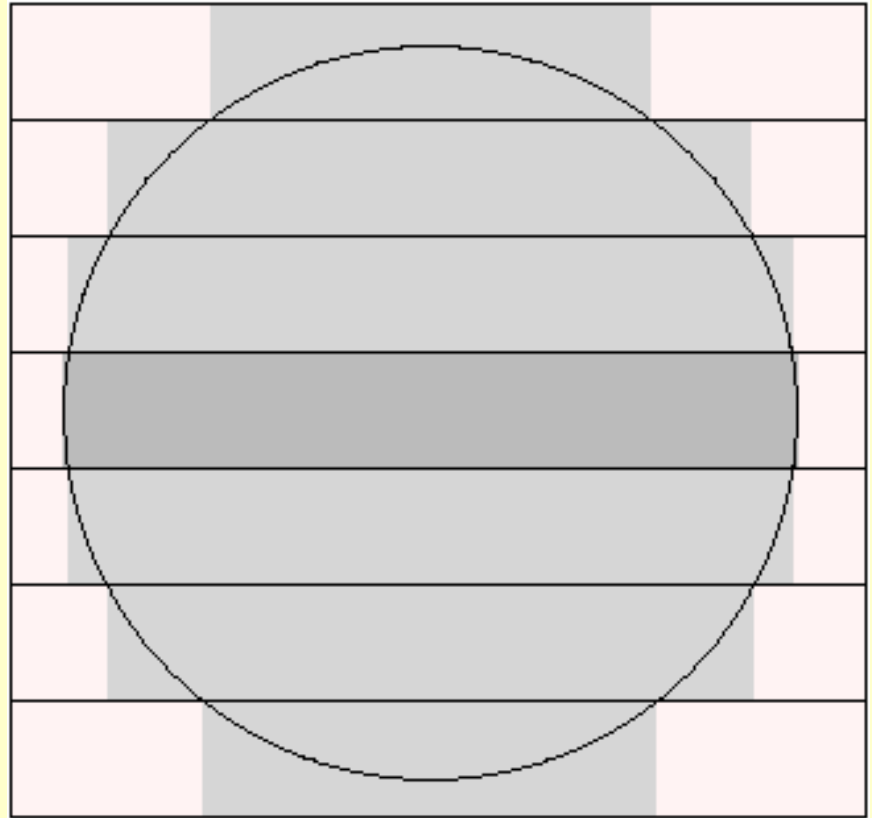


- 适用：近似球形且近似等大的粒子；薄切片
- 问题：切片厚度（例如投影过多 overprojection）、遗漏帽缘（lost caps）、不均匀粒子抽样

- 球形粒子直径 D 与其随机截面直径 d

$$D = \frac{4}{\pi} \times \bar{d}$$

D : 连续切片上的
最大截面
直径 (假设
投影过多)

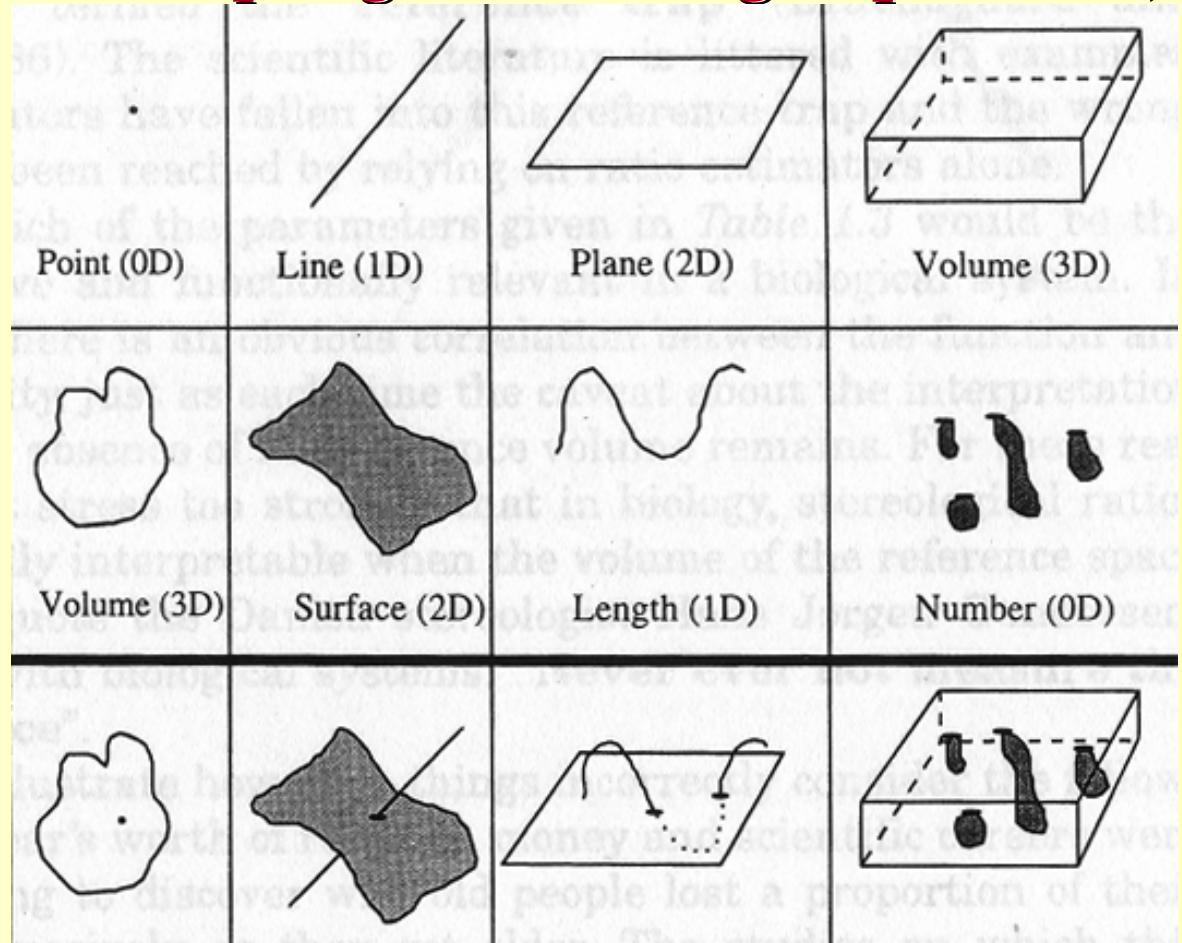


4、体视框：粒子的均匀抽样和计数

(Disector: Uniform sampling & counting of particles)

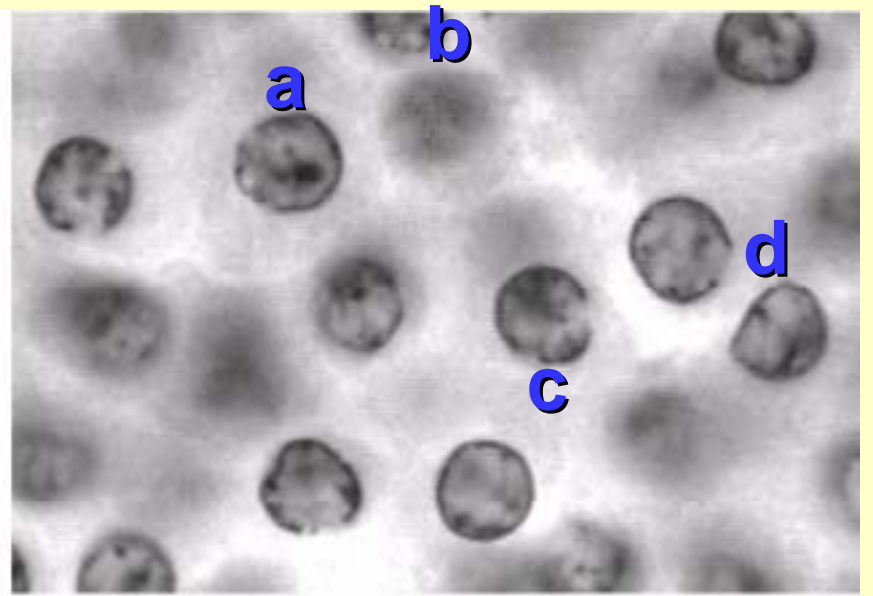
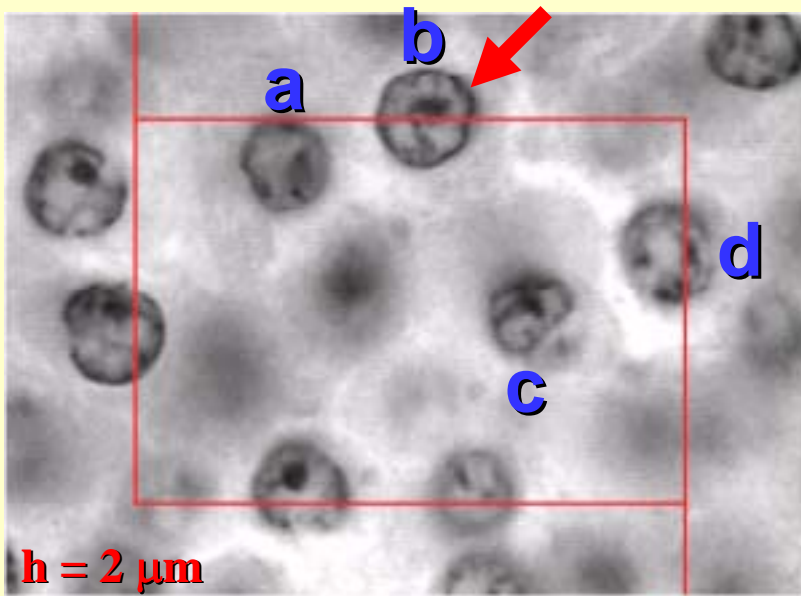
• 单一切片上，
不能均匀抽选
或计数粒子

均匀：每个粒
子都有相同的
机会被抽选或
计数，不论其
大小、形状

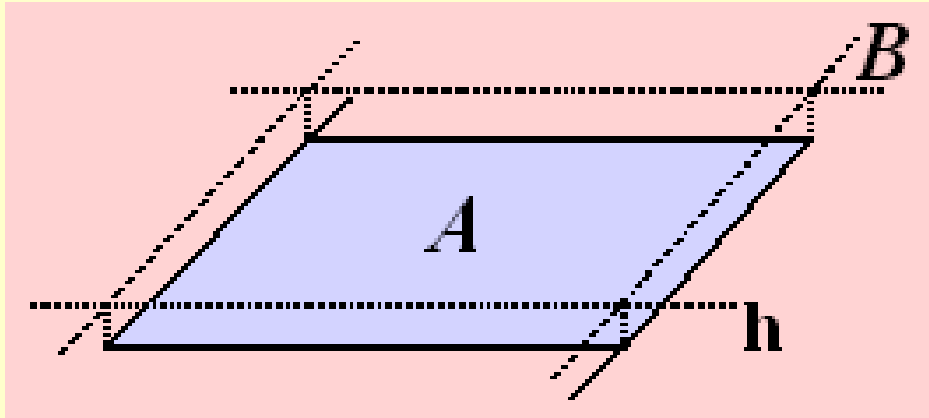


(该示意图扫描自：Howard & Reed, 1998)

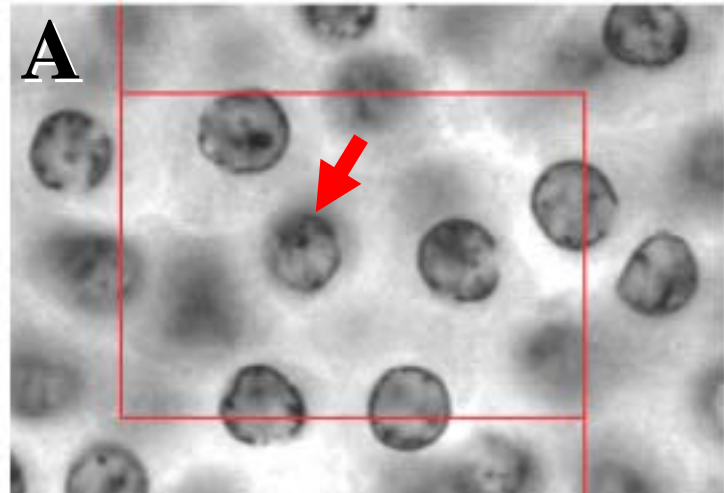
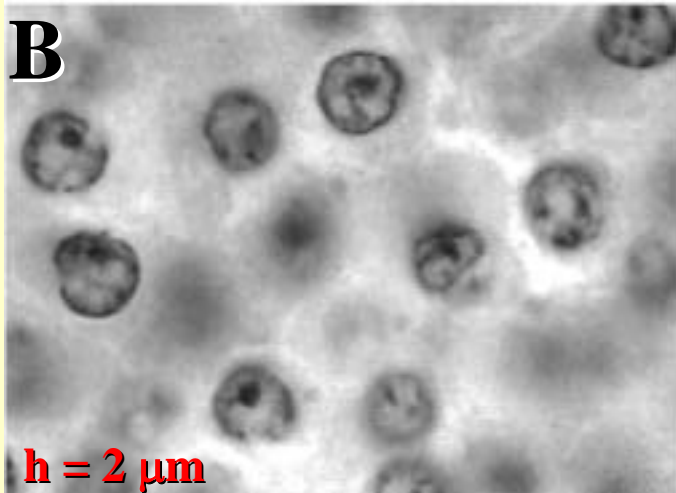
体视框技术：至少用2个相距一定距离的截面，在一截面上叠加计数框，计数被该计数框所“切”（根据禁线法则：粒子轮廓完全在框内或仅与框的右、上边相交）而不被另一截面（参照截面）所“切”（即在参照截面上未形成轮廓）的粒子。



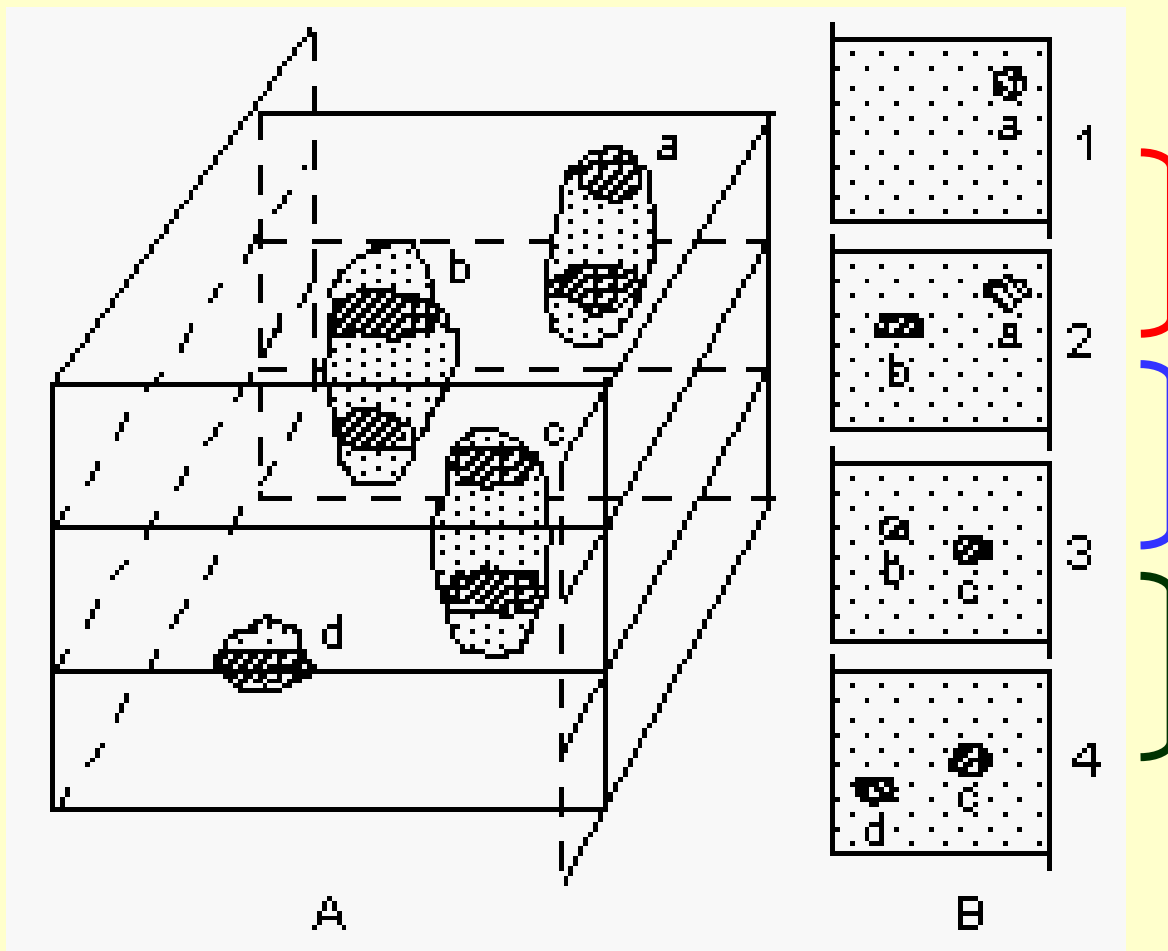
体视框粒子计数（或抽选）法则：计数（或抽选）被截面A上的计数框所“切”而不被截面B所切的粒子（重要：是否被计数框所“切”根据禁线法则确定）



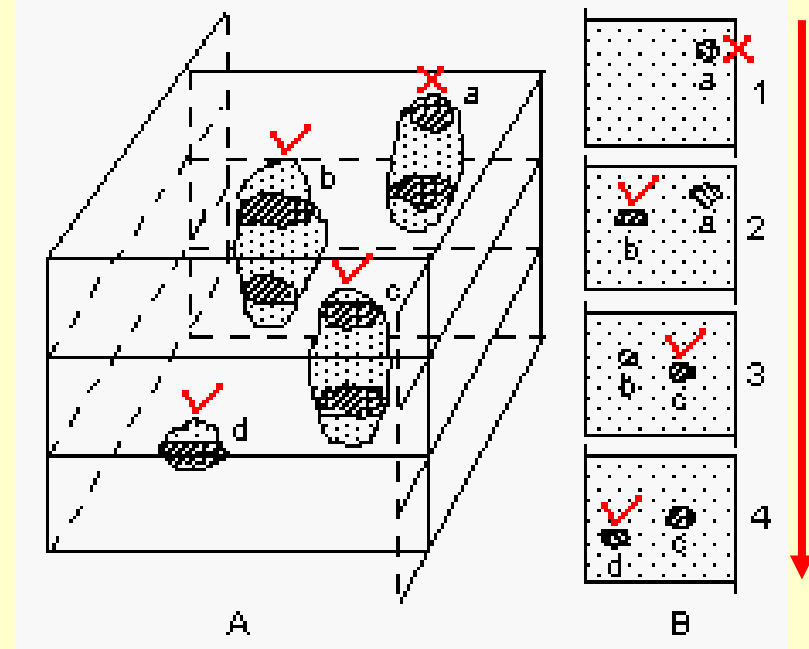
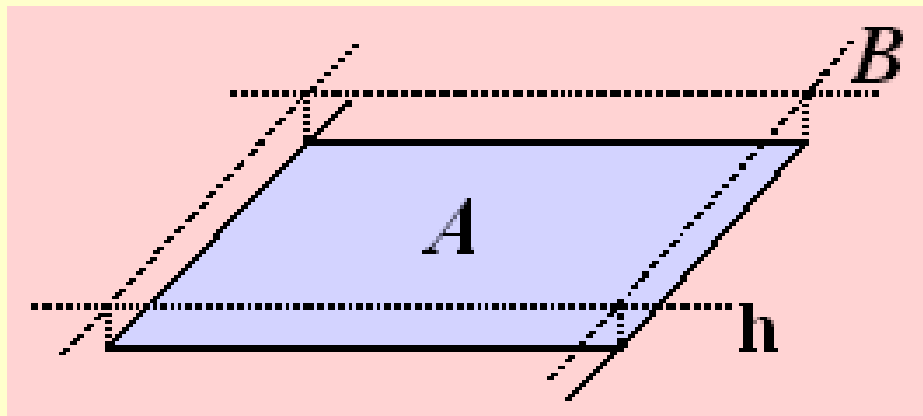
基本要求：体视框的高度 h 小于粒子的最小直径/高度



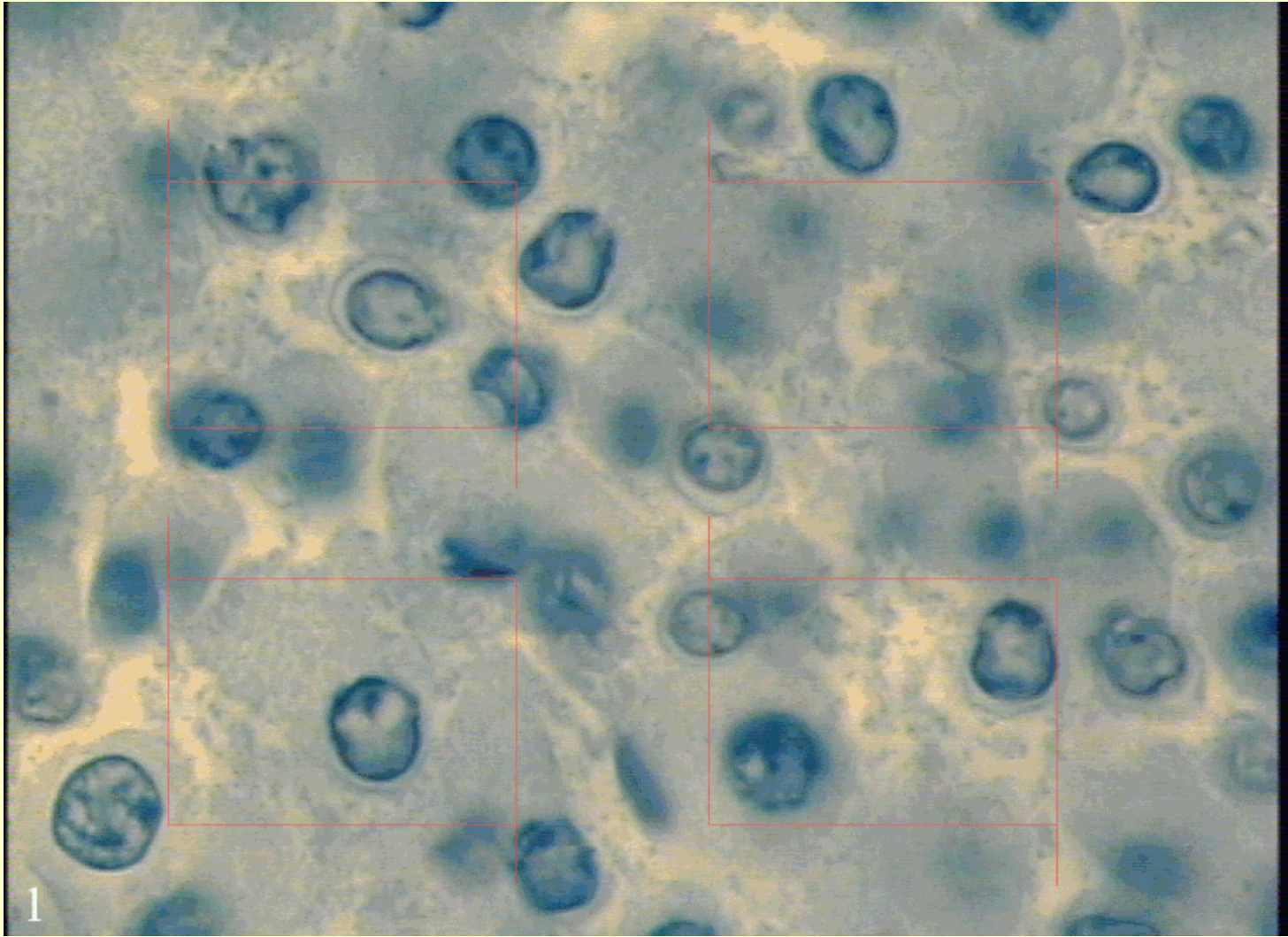
- 物理 (physical) 体视框：用两张 (物理) 切片



- **光学 (optical) 体视框**：利用一张厚切片，连续观察不同聚焦平面——光学切片，直接在三维空间内计数粒子。例如，从切片上表面开始连续向下聚焦，在上表面出现的粒子不计数，计数新出现的粒子（“头”部）。



光学体视框演示



动画幻灯下载：http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology/list_8.asp

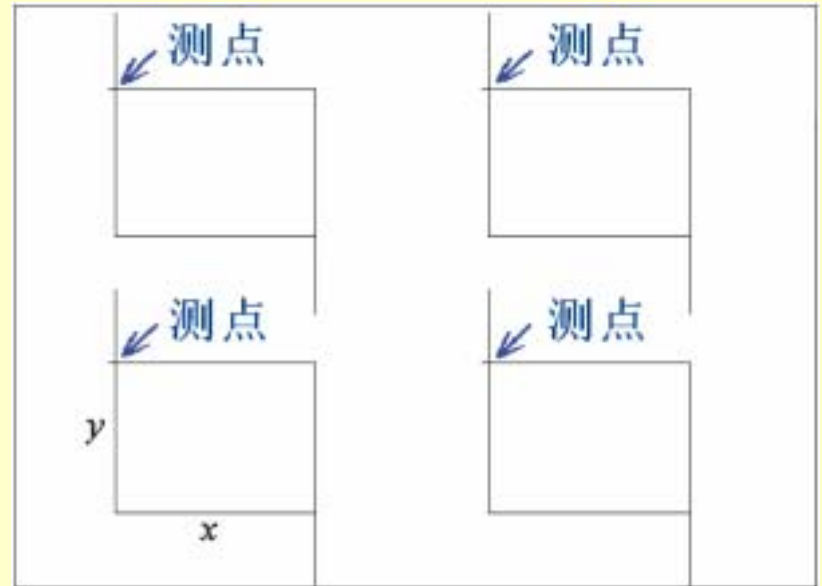
练习：用物理体视框计数细胞核

- 把图 a-b、 b-c、 c-d、 d-e 分别看作为相距 $1\ \mu\text{m}$ (体视框高度) 的 2 张连续切片平面。 先分别在图 a、 b、 c、 d 上叠加 4 个测试框， 分别以图 b、 c、 d、 e 作为参照平面， 根据体视框计数法则计数细胞核。 然后分别在图 b、 c、 d、 e 上叠加 4 个测试框， 分别以图 a、 b、 c、 d 作为参照平面， 根据体视框法则计数细胞核。 即计数 8 个体视框“内”的细胞核。
- 根据所用体视框总体积 (体视框个数 \times 测试框面积 \times 体视框高度) 以及数到的细胞核总数， 计算所测组织内细胞核的数密度 (numerical density: N_V) : = 细胞核总数 / 体视框总体积
- 假设所测 (器官) 组织的体积为 $1.2\ \text{cm}^3$ ， 计算所测组织内的细胞核总数 (N) : = 所测组织内细胞核数密度 \times 所测组织体积

测试框及其面积

- 计数位于切片组织（参照空间）内的测点数（P）以估计所用测试框总面积

- 台微尺图像与所测细胞图像是在同样条件下拍摄的（相同显微镜相同油镜）。已知台微尺（stage micrometer）上两条刻度线之间的真实间距为 $10\mu\text{m}$ 。计算放大倍数，然后确定每个测试框的真实面积（ a_p ）



- 4个测试框 4个测点
- 每个测试框的面积
 $a_p = x y / M^2$

见习（体视学系统演示）

- 显微照相，台微尺与放大倍数
- 测试视野的等距随机抽样
- 测点计数，交点计数
- 轮廓抽样，直径测量
- 轮廓计数，细胞核计数（光学体视框）
- 细胞核抽样（光学体视框），直径测量