

# 川北医学院2010级硕士研究生课程“体视学方法”第3讲

- 薄膜厚度估计
- 轮廓、粒子大小估计
- 星体积估计

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/>

**尺寸/大小 (sizes) : 通常指离散 (discrete) 结构——粒子 (particles) 的体积、直径等, 也指线形、薄膜或不规则结构的直径、厚度等局部大小 (local sizes)。**

**结构的 (局部) 大小与结构的总量无关, 其估计不必知道所测结构的总体积, 也不必知道包含所测结构的器官组织 (参照空间) 的总体积**

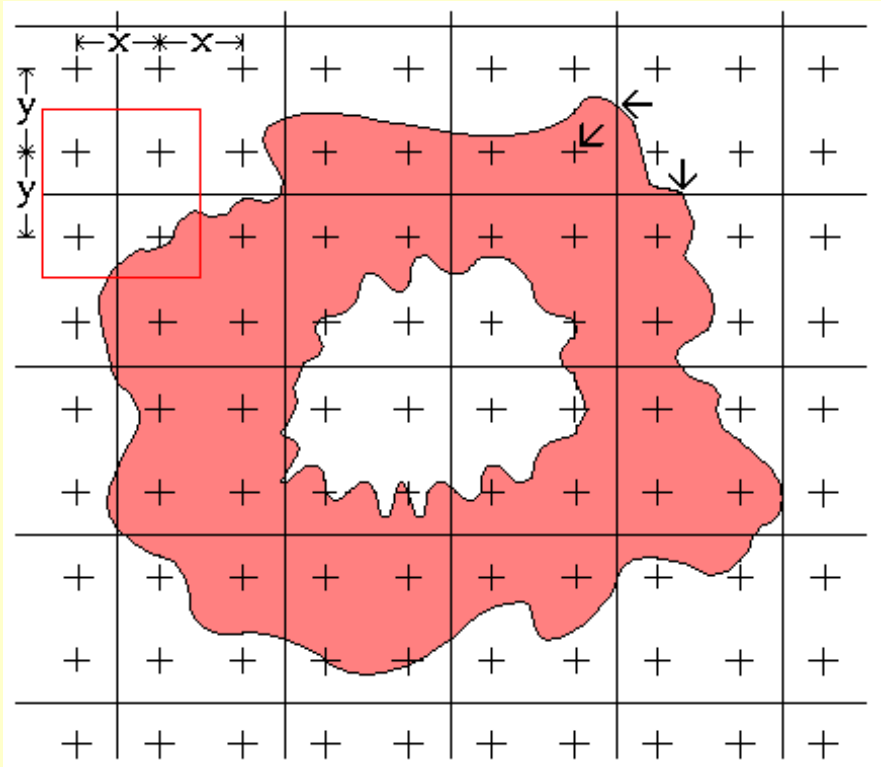
# 1、薄膜厚度

把所测结构 看作为一个平整的扁长方体形 薄膜，所测结构的 总表面积（ $S$ ）即薄膜两面的总面积，薄膜一面的面积（ $S/2$ ）乘以薄膜的厚度（ $t$ ）即薄膜的体积（ $V$ ）。因此：

$$t \approx 2 \times V / S = 2 \times V_v / S_v$$

• 粉红色结构平均宽度  
 $\approx 2 \times$  粉红色结构面积  
 $/$  (外边长+内边长)

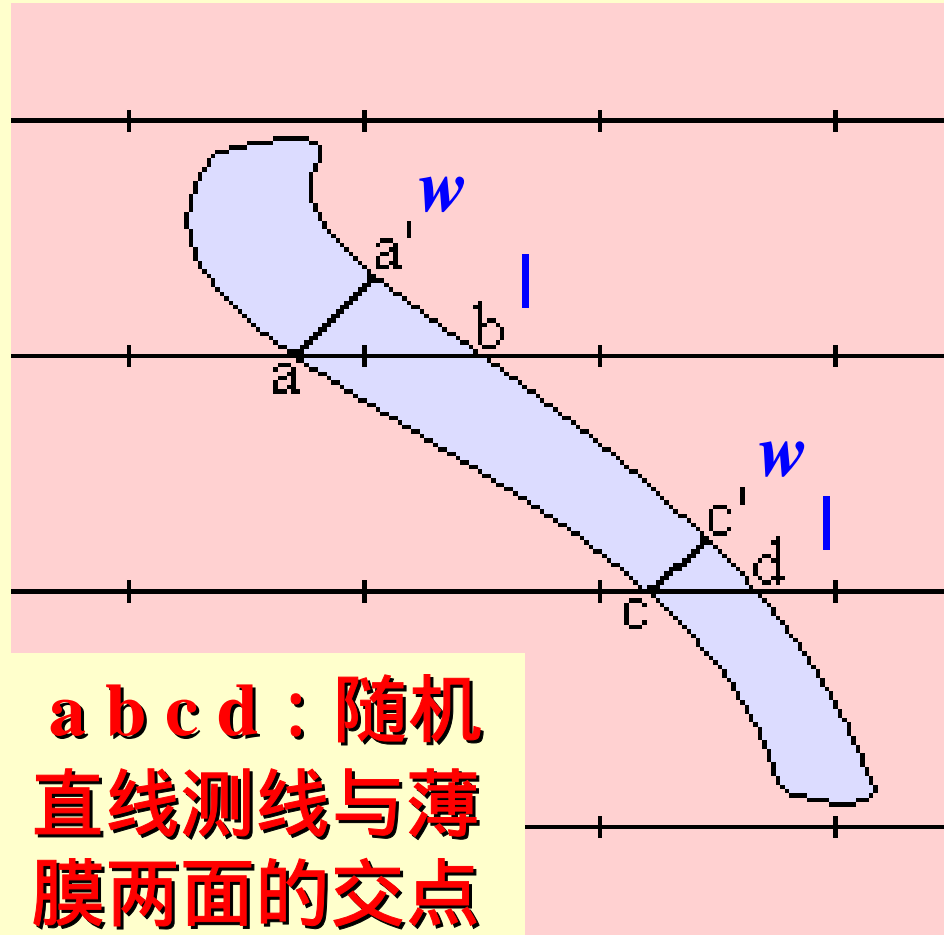
• 粉红色结构平均厚度  
 $\approx 2 \times$  粉红色结构  $V_V$   
 $/$  (内面+外面)  $S_V$



# 截距或宽度测量与厚度估计

- $\bar{t} = (\pi/4) \cdot \bar{w}$       $\bar{t}_h = [8/(3\pi)] \cdot \bar{w}_h$
- $\bar{t} = (1/2) \cdot \bar{l}$
- $\bar{t}_h = (2/3) \cdot \bar{l}_h$

$\bar{t}$ 、 $\bar{t}_h$ ：薄膜算术平均厚度、调和(harmonic)平均厚度(thickness)。  
 $w$ 、 $l$ ：薄膜随机截面上测量的宽度(width)、截距(intercept)



# 算术平均与调和平均

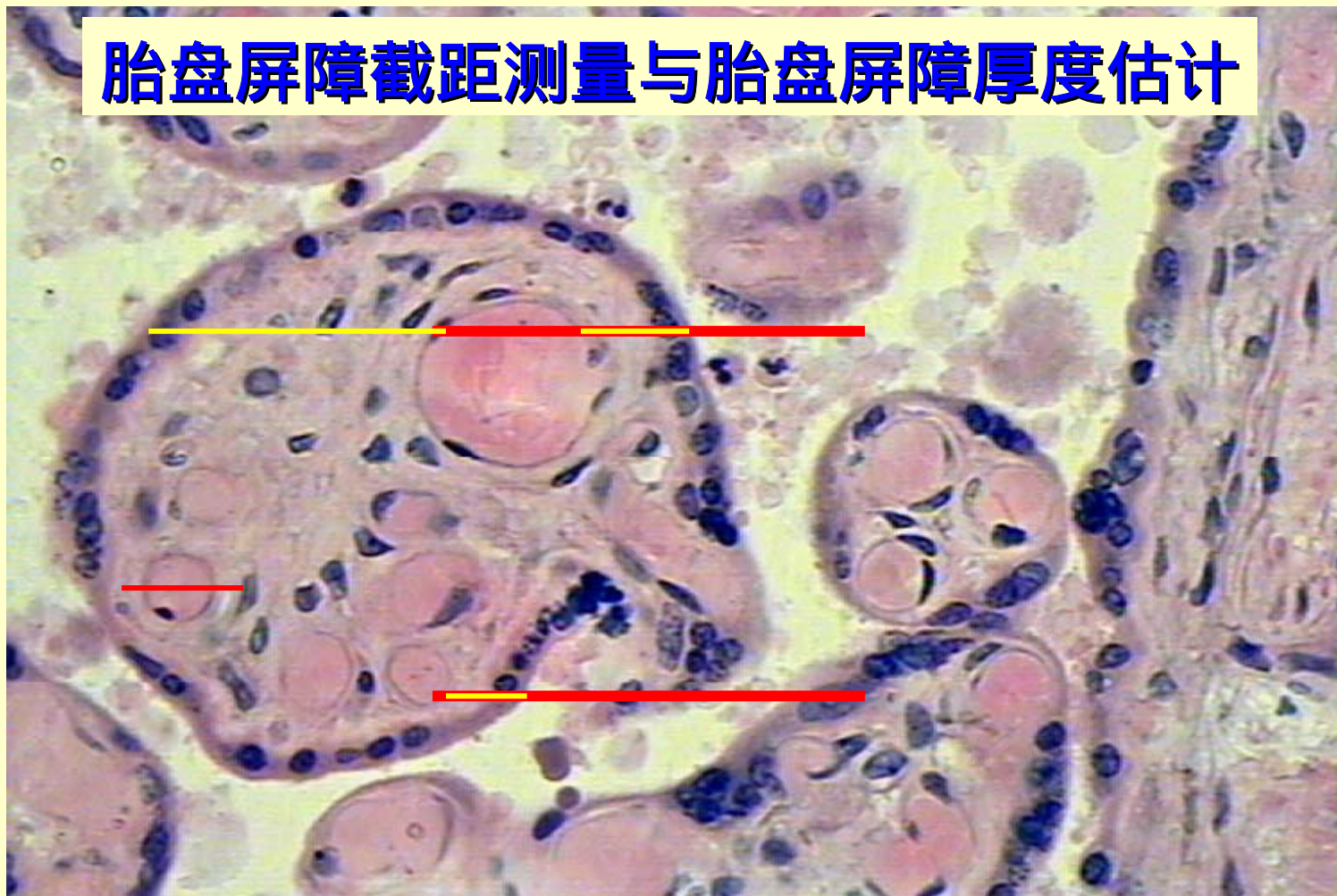
- 1  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$  的

$$\text{算术平均} = (\underline{1} + \underline{10} + \underline{100}) / 3 = 37.0 \mu\text{m}$$

$$\text{调和平均} = 1 / [(\underline{1/1} + \underline{1/10} + \underline{1/100}) / 3] = 2.7 \mu\text{m}$$

- 什么变量对调和平均的影响大？
- 气体交换、物质扩散常与什么成反比？
- 算术平均与调和平均的差异取决于什么？  
调和平均愈小说明什么？

## 胎盘屏障截距测量与胎盘屏障厚度估计



从...与...之间的交点测，穿过血管的截距不测

# 练习：肺泡隔厚度估计

- 在视野上叠加测线（每个小框的 2 条水平边线），每当测线与肺泡表面（边缘线）形成 1 个交点，就向右从该点沿测线方向测量 1 个截距（至肺泡隔的另一侧边缘）。如向右是肺泡空间，就不测。
- 计算肺泡隔的算术平均厚度、调和平均厚度。  
（注意考虑放大倍数）

$$\bar{t} = (1/2) \cdot \bar{\ell}$$

↑  
算术平均截距

$$\bar{t}_h = (2/3) \cdot \bar{\ell}_h$$

↑  
调和平均截距

截距倒数的  
平均的倒数

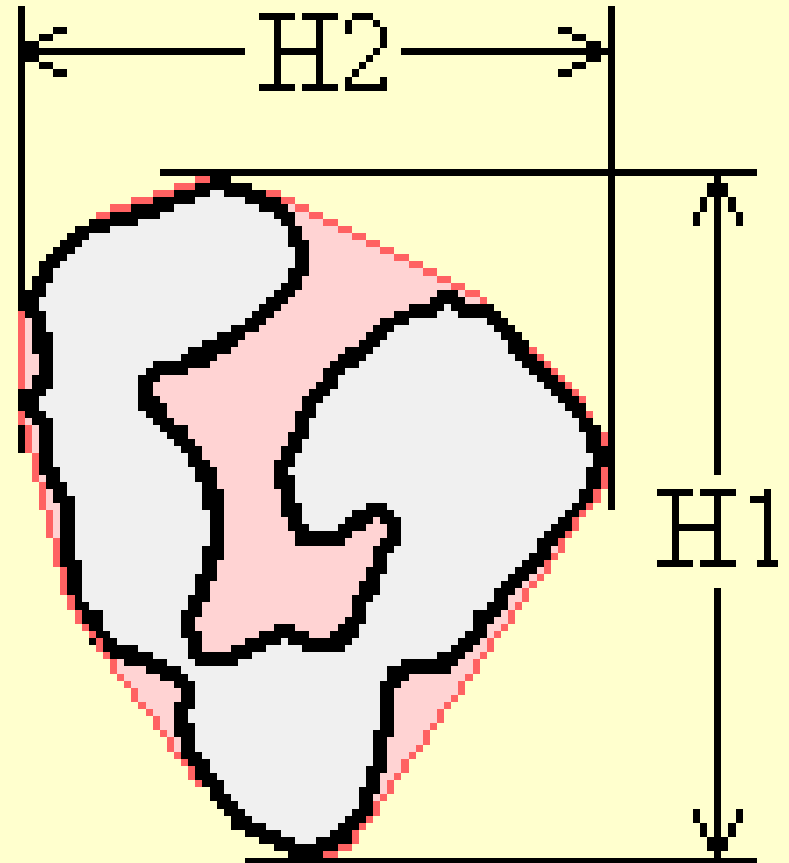


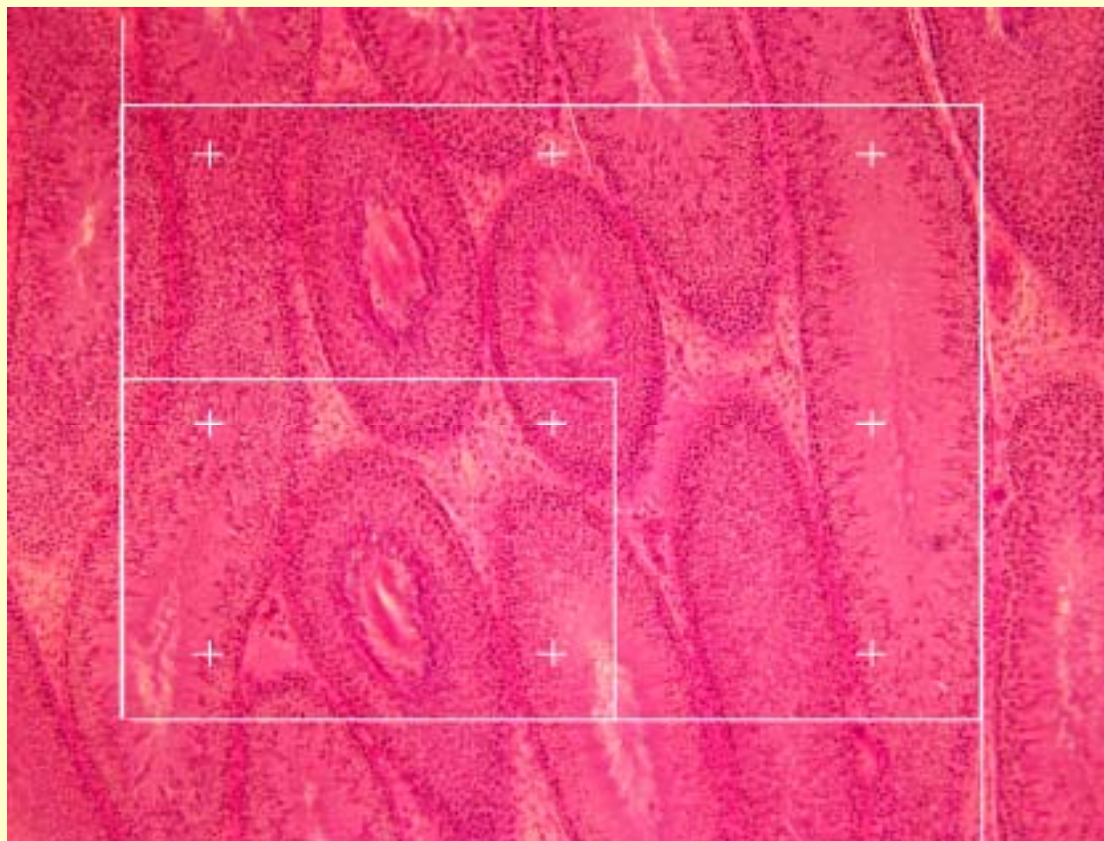
## 2、平面轮廓大小

- $\bar{a}$  = 轮廓总面积 $A$  / 轮廓总数量 $N = A_A / N_A$
- $\bar{b}$  = 轮廓总周长 $B$  / 轮廓总数量 $N = B_A / N_A$   
 $= (\pi/2) \times I_L / N_A$
- 可定义  $\bar{b} / \sqrt{\bar{a}}$  为形状因子，以反映轮廓的不规则程度（等大圆的该因子 = 3.54）

# Feret 直径

- Feret直径：某方向上的轮廓最大径或高度
- 椭圆形轮廓的常用平均直径：长短径及其平均
- 任一轮廓的凸包  
(convex hull)  
的周长 =  $\pi \times \bar{h}$   
 $\bar{h}$ ：所有方向上的Feret直径的平均





**测格：**

- 9 个测点  
(估计  $V_V$ )
- 小测试框  
(抽选有管腔的圆形或椭圆形小管，测量其直径)

视野	P-管壁	P-管腔	P-间质	直径 (短径)
1	8	0	1	
...	...	...	...	

# 练习：轮廓的综合测量

- 第1步：选择测格，确定测点、测线和测试框，确定  $a_p / l_p$ （注，放大倍数 = 3000）
- 第2步：测量8个视野，8个视野总和起来计算点计数结果  $P_{ref}$   $P_{\text{圆}}$   $I$  轮廓数  $n$  轮廓直径  $d$
- 第3步：计算

$$A_A = P_{\text{圆}} / P_{ref}$$

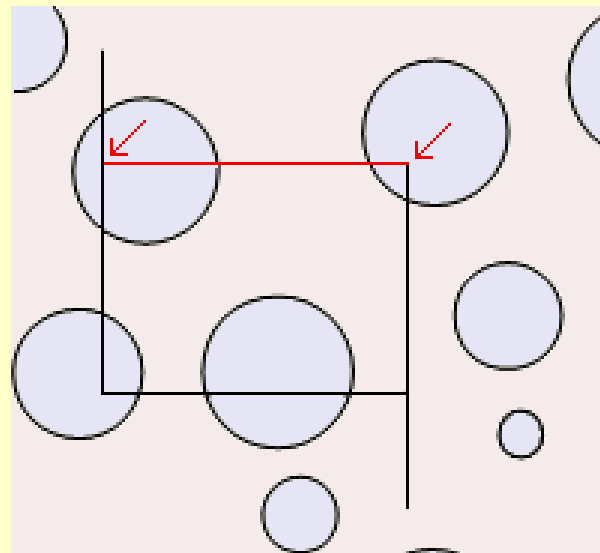
$$B_A = (\pi/2) \cdot I / (P_{ref} \cdot l_p)$$

$$N_A = n / (P_{ref} \cdot a_p)$$

$$\bar{a} = A_A / N_A$$

$$\bar{b} = B_A / N_A$$

$$\bar{d} \pm SD \quad \text{形状因子 } \bar{b} / \sqrt{\bar{a}}$$



	$P_{ref}$	$P_{\text{圆}}$	$I$	$n$	$d$		
<b>1</b>							
<b>2</b>							
<b>3</b>							
<b>4</b>							
<b>5</b>							
<b>6</b>							
<b>7</b>							
<b>8</b>							

### 3、粒子（近似球形）直径

- **结合光学体视框（较小粒子）。** 例如，对于几微米直径的细胞核，用  $25\ \mu\text{m}$  厚的切片，从切片上表面下面  $3\ \mu\text{m}$  的平面（光学切片）开始，连续向下聚焦  $5\ \mu\text{m}$ ，根据光学体视框抽选在这  $5\ \mu\text{m}$  内新出现的细胞核；然后分别观察各个新出现的细胞核的连续（断面）轮廓，在其最大轮廓平面上沿事先确定的方向（例如左右方向）测其最大轮廓的 Feret 直径，该直径即细胞核的直径。  
(已见习)

- **结合物理体视框（较大粒子）。** 例如，对于一二百微米直径的肾脏肾小球，切 30 张连续切片（每张厚  $7\ \mu\text{m}$ ），连续观察第 3~15 张切片上新出现的肾小球（根据体视框抽样法则）；然后在连续切片上分别观察这些肾小球的连续轮廓（断面），确定其最大轮廓并测量其直径。 然后“倒过来”（以充分利用连续切片），连续观察第 28~16 张切片上新出现的肾小球 .....

# 4、粒子体积

- 点取截距法 (任意粒子)  
point-sampled intercept

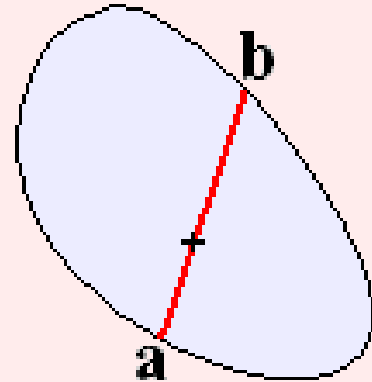
$$\text{粒子体积 } v = \frac{\pi}{3} \times \overline{l_0^3}$$

$$l_0^3 = ab^3$$

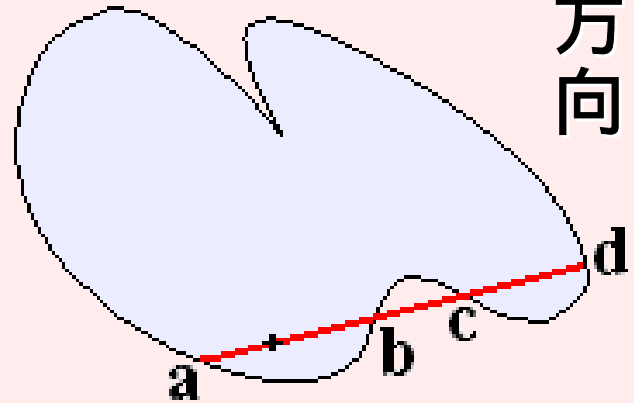
$$l_0^3 = ab^3 + (ad^3 - ac^3)$$

*Gundersen HJ, Jensen EB.  
J Microsc 1985;138:127-42.*

先确定随机点



然后确定随机方向





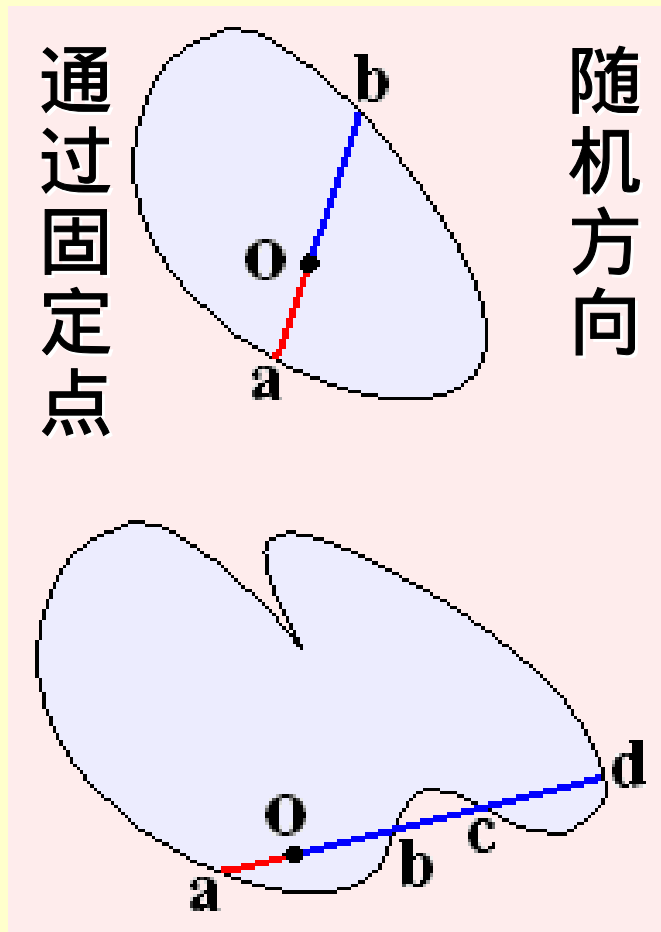
- **核距法 (nucleator)**  
(所测粒子有一固定点)

粒子体积  $v = \frac{4\pi}{3} \times \overline{l^3}$

$l^3 = oa^3, ob^3$

$oa^3, (ob^3 + od^3 - oc^3)$

*Gundersen HJ.  
J Microsc 1988;151:3-21.*



- **转距法 (rotator)**  
(所测粒子有一固定点)

*Jensen EB, Gundersen HJ.  
J Microsc 1993;170:35-44.*

(1) 运用通过固定点的垂直截面

$$v = \pi t \sum_i \ell_i^2$$

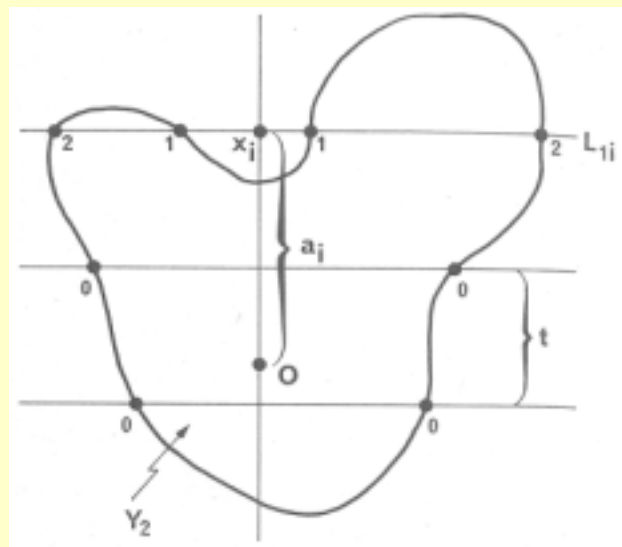
$$\ell_i^2 = \frac{1}{2} (\ell_{i+}^2 + \ell_{i-}^2)$$

$$\ell_{i+}^2 = \sum_{j \text{ even}} \ell_{i,j+}^2 - \sum_{j \text{ odd}} \ell_{i,j+}^2$$

(2) 运用通过固定点的  
各向同性截面

$$v = 2t \sum_i g_i$$

$$g_i(\ell) = \ell \sqrt{\ell^2 + a_i^2} + a_i^2 \ln \left[ \frac{\ell}{a_i} + \sqrt{\left(\frac{\ell}{a_i}\right)^2 + 1} \right]$$



## 粒子平均体积的估计步骤：

1. 利用至少2张连续切片（对于细胞核等粒子，最好是光学切片），用体视框抽选粒子
2. 分别测量所抽各个粒子的体积，计算其平均

**数目加权平均体积 / number-weighted mean volume**

$$\bar{v}_N = \frac{x_1 \cdot l + x_2 \cdot l + x_3 \cdot l + \dots}{l + l + l + \dots}$$

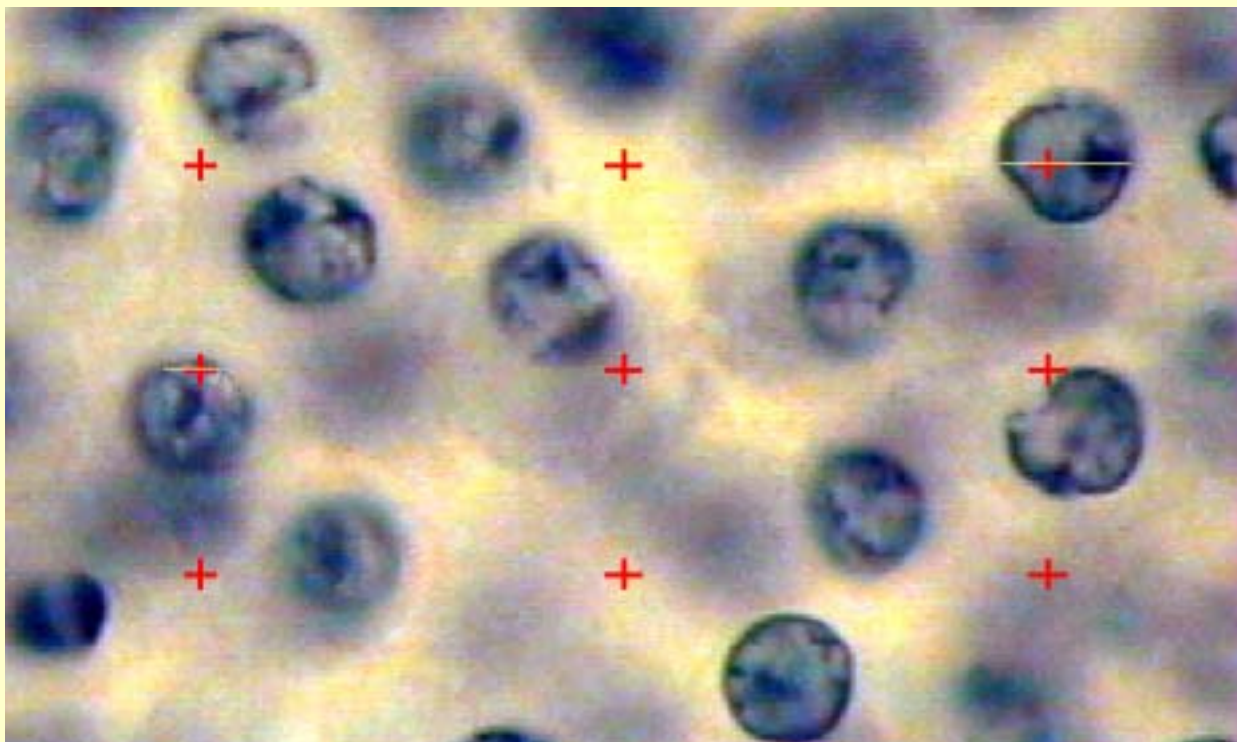
# 粒子体积测量：

- **卡瓦列里原理（适用于任意粒子）**
  - 测量所测粒子的所有截面，已知截面间距；受截尾效应（truncation）或遗漏帽缘（lost caps）影响；误差小，可用任意方向切片
- **点取截距（适用于任意粒子）**
  - 在所抽粒子的所有截面上测量点取截距；要在3D空间内的随机方向上测量（用IUR或VUR切片）；受截尾效应（truncation）影响较小

- **核距（适用于“有且只有1个核仁的细胞”等）**
  - 选择通过固定点（如核仁）的截面；要在 3D 空间内的随机方向上测量（用 IUR 或 VUR 切片）；误差通常较点取截距法小
- **转距（适用于“有且只有1个核仁的细胞”等）**
  - 选择通过固定点（如核仁）的截面；要在 3D 空间内的随机方向上测量（用 IUR 或 VUR 切片）；误差较核距法小

# 这样估计的是什么？

利用（单一）随机切片（IUR或VUR），在测试视野上叠加测点，从“击中”所测粒子的测点，测量点取截距。最后计算：所有截距的立方的平均  $\times (\pi/3)$



## 体积加权平均体积 / volume-weighted mean volume

$$\bar{v}_V = \frac{x_1 \cdot x_1 + x_2 \cdot x_2 + x_3 \cdot x_3 + \dots}{x_1 + x_2 + x_3 + \dots}$$

体积加权与数目加权平均体积的关系：

粒子体积的变异系数  $CV = \sqrt{\frac{\bar{v}_V}{\bar{v}_N} - 1}$

**为什么这样估计的是体积加权平均体积？**

- 因为测点 击中 各个粒子的概率与各个粒子的体积成正比

**如下估计的是什么？这种方法有无实用价值？**

- 用连续切片，在中间的切片上叠加测点；对于测点击中的粒子，观察其连续轮廓，根据卡瓦列里原理估计其体积；计算各个所测粒子体积的平均

**癌细胞核的体积加权平均体积可反映什么？**

- 细胞核体积的变异或异型性（恶性程度）

**体积加权平均体积 vs 轮廓平均面积/直径？**

- 前者可反映粒子本身的大小，且可无偏估计



# 5、星体积 ( Star Volume )

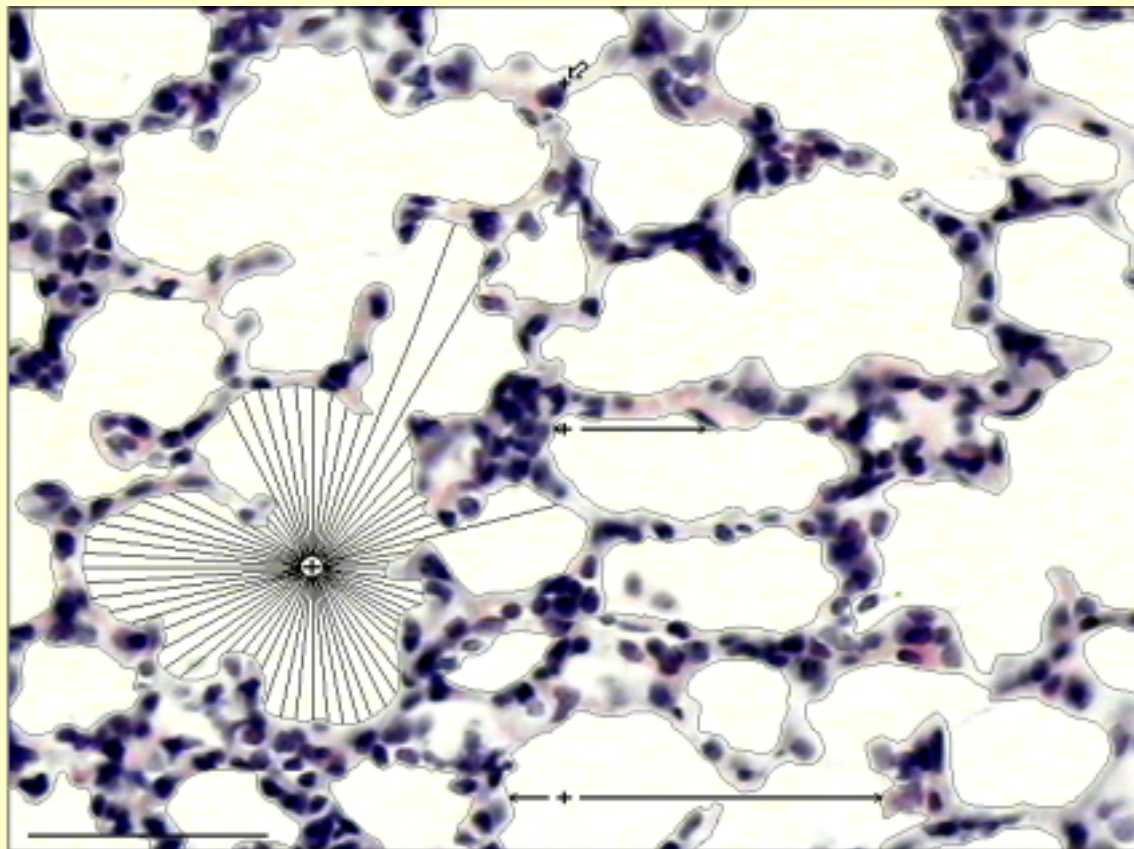
$$v^* = \frac{\pi}{3} \times \overline{l_0^3}$$

## 定义

...点状光源直接  
照亮的那部分空  
间的体积...

## 用途

反映不规则结构  
的平均局部大小



# 练习：体积加权平均体积估计

- 在 a-e (5幅) 细胞核图像上叠加测点 (每个小框的 4 个顶点)，每当 1 个测点“击”中清晰聚焦的细胞核轮廓 (即测点位于轮廓内)，就通过该测点沿测线方向测量 1 个截距——点取截距。把测量结果分组记为：... 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5 ... (mm)
- 计算体积加权平均体积 (要考虑放大倍数)

