

川北医学院2010级硕士研究生课程“体视学方法”第4讲

重要体视学问题

随机抽样、比值估计、抽样误差、
组织处理对体视学估计的影响、切片厚度
主观性问题、测格制备、图像分析

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/>

体视学（形态定量）研究的基本步骤

Essential procedures of stereological (morphometric) study

- 实验/试验设计与实施
- 获取器官组织并处理（...包埋、切片...）
- 观察与测试（点计数、直径测量...）
- 计算结果
 - 密度，总量（体积 / 表面积 / 长度 / 数量...）
 - 大小（平均体积 / 星体积 / 直径 / 厚度...）
 - 粒子总数（分合法）

1、随机抽样 / Random Sampling (= 体视学测试 / Stereological Test)

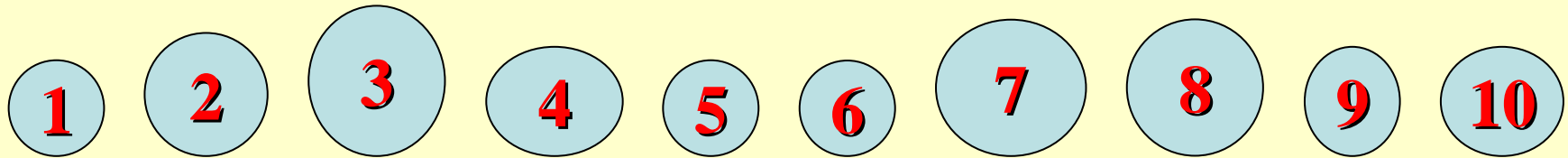
- 整个过程实质上都是在抽样
 - 个体 / 器官，切片 / 截面，视野，测试
- 体视学测试基本要求
 - 任何测试都需在均匀随机位置上进行：
均匀随机抽样 (Uniform Random Sampling)
 - 受测试方向影响的需同时在均匀随机方向上进行：
各向同性随机抽样 (Isotropic Random Sampling)

各向同性均匀随机：Isotropic Uniform Random (IUR)

均匀随机抽样：

每个部位都有相同的机会被抽选

Uniform random sampling: Each location has the same chance to be sampled



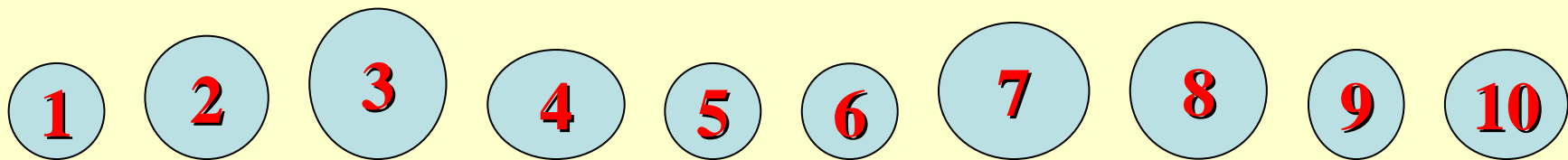
· 如选1个，选哪个？

选1个1~10的均匀随机数（编号）

- 用 Excel 确定： $=10*\text{RAND}()+0.5$

（注意：把小数位数设为0）

**Simple
Random
Sampling**



- 如选2个，选哪2个？

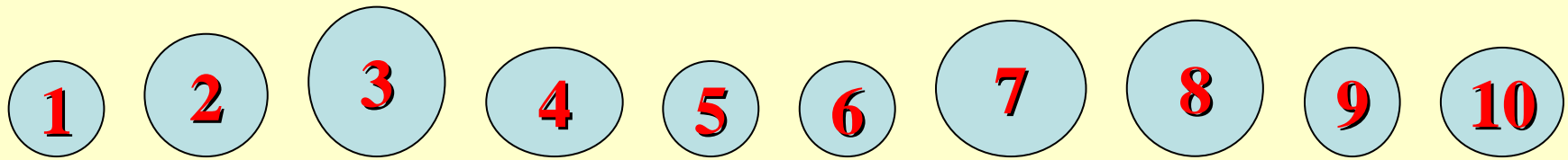
第1个：1~5的均匀随机数 r
第2个： $r+5$

**Systematic
Random
Sampling**

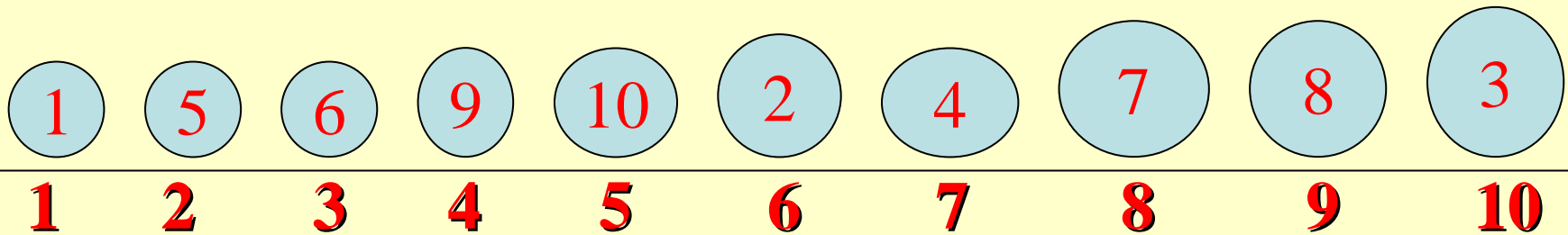
- 如选2~3个，选哪几个？

第1个：1~4的均匀随机数 r
第2个： $r+4$
第3个： $r+4+4$ (如有此编号)

**等 距
随机抽样**



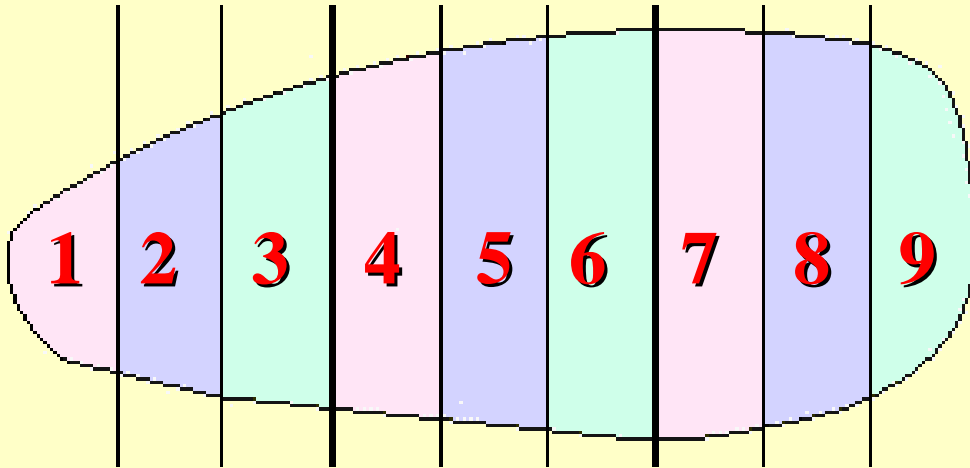
- 如“圆”的大小代表所测结构量或密度的大小，怎样抽选更有效（抽样误差较小）？
- 按“圆”的大小重新依次排序：小 → 大，或者，小 → 大 → 小；然后再等距随机抽样



组织块的基本抽样方法

- 游离整个器官
- 将整个器官切成若干“片”或“块”，然后等距随机抽取若干“片”或“块”。（从方便和效率的角度讲，各“片”或“块”的厚度相似较好。）
- 如所抽“片”或“块”太大（不适于进一步处理），将之切成较小的“小片”或“小块”，然后等距随机抽取若干“小片”或“小块”。（从方便和效率的角度讲，各“小片”或“小块”的大小相似较好。）...

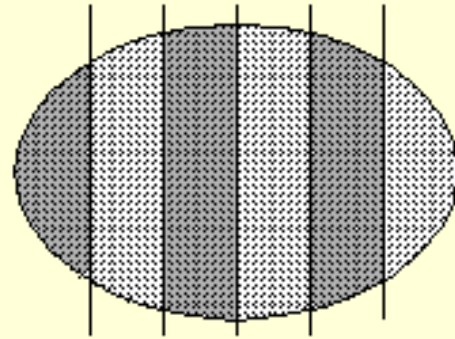
组织块抽样举例 - 1



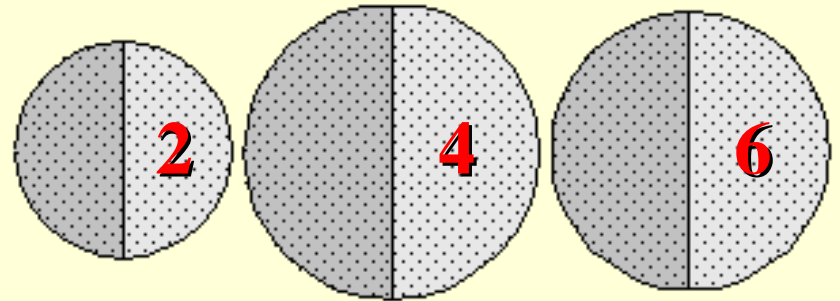
- 在一定位置沿一定方向，将器官切成 9 块，等距随机取 3 块。（假设拟取 3 个组织块，假设切成 9 块后的组织块大小合适。）
- 第 1 个器官取第 1、4、7 块，下 1 个器官取第 2、5、8 块，再下 1 个器官取第 3、6、9 块

组织块抽样举例 - 2

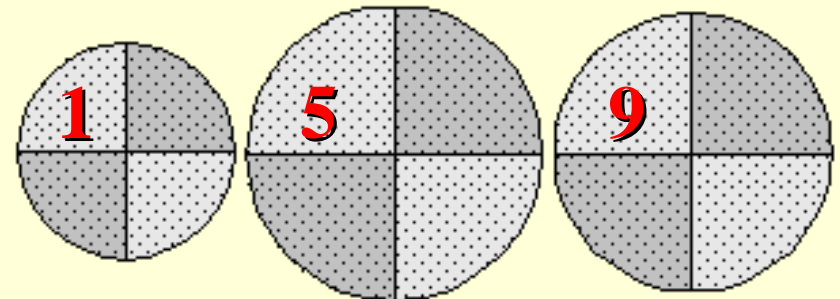
先把器官切成“片”——



把所抽“片”切成“块”——



或这样切成“块”——

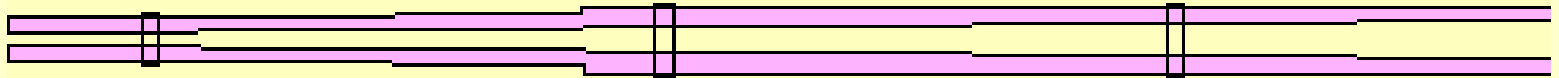


组织块抽样举例 - 3

某条形器官，长 48.4 cm，拟取3个组织块



- 平均 $48.4/3 = 16.1$ cm 取 1 块
- 用Excel确定1个0~16.1的均匀随机数： $=16.1*\text{rand}()$
- 假设确定为4.4，由此确定另2个等距随机数：
20.5 ($=4.4+16.1$)、 36.6 ($=4.4+16.1+16.1$)
- 在距左端4.4、 20.5、 36.6 cm 处 各切1个组织块

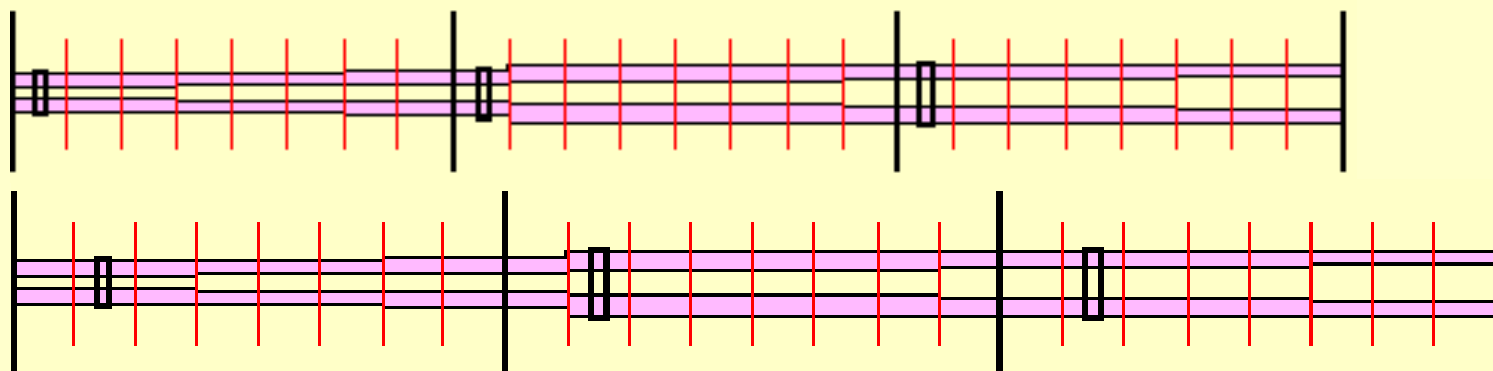


组织块抽样举例 - 4

某组有8个条形器官，拟从每个器官切取3个组织块

- 把每个器官平分成 3 段，每段平分成 8 小段
- 从第 1 个器官各段 抽选第 1 小段
- 从第 2 个器官各段 抽选第 2 小段

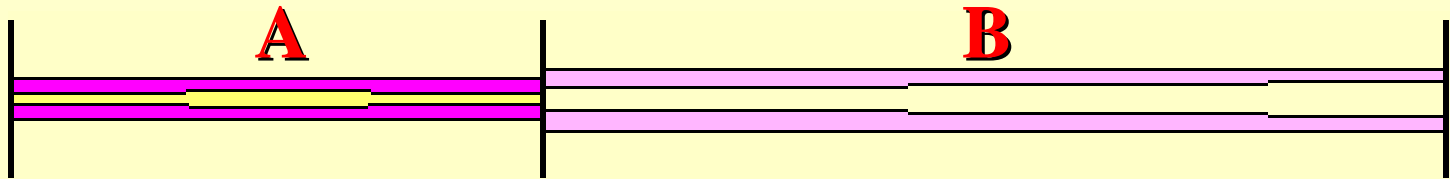
.....



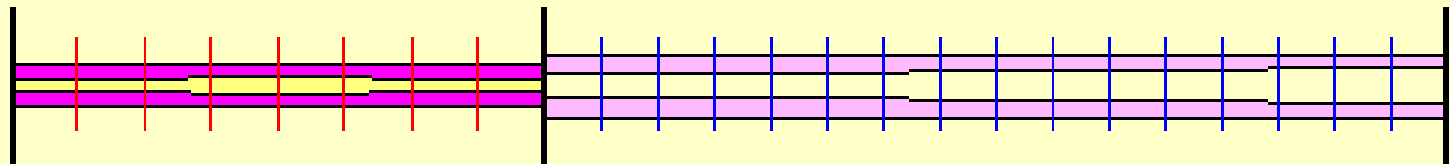
.....

组织块抽样举例 - 5

器官明显可分成 A、B 段，且对两段的区别感兴趣



- 把2段各当成1个器官对待 → 工作量翻倍



组织块抽样问题-1

固定从各组各器官的某端或某处切取组织块

- **不能真实或无偏反映各组各器官的情况，除非有证据表明所切组织块能真实反映整个器官**
- **所切组织块只能反映器官某端或某处的情况——为研究样本而研究样本。实际上，从各器官抽样的目的，是反映各器官的整体情况；抽选所测器官或动物的目的，是推论那一类动物的情况。**

组织块抽样问题 - 2

始终通过器官的中心切取组织块。 或者
始终通过器官的中心切取组织薄片，然后
从该薄片等距随机切取组织块

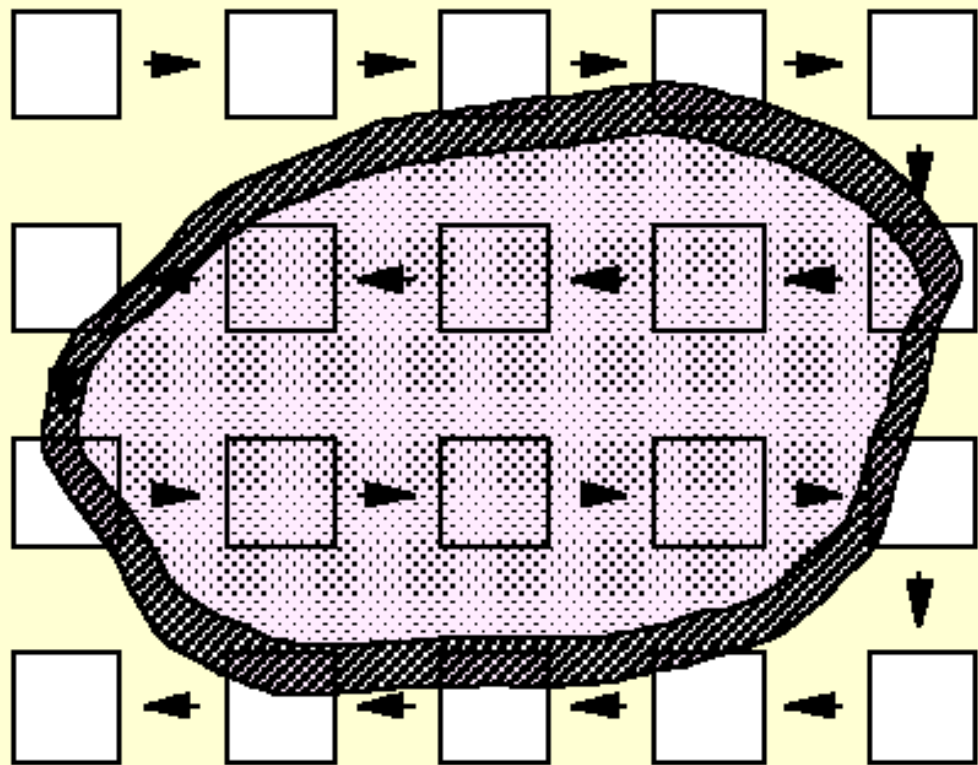
- 器官中心部位的结构被抽选的概率增加，而器官周边的结构被抽选的概率减少
- 例如，如果运用始终通过鸡蛋中心（蛋黄）的截面来估计鸡蛋内蛋黄的 V_V 、 S_V 等，或估计鸡蛋内的蛋黄内某种细胞或结构（假设有）的 V_V 、 S_V 、 L_V 、 N_V 等，那么这些指标将会被高估

切片的基本抽样方法

- 把整个器官包埋，并完全切成连续切片，从中等距随机抽选
- 把所选组织块完整包埋，完全切成连续切片，从中等距随机抽选
- 从实用和方便的角度考虑，如果组织块较小，组织块不同位置的切片没有明显差异，那么一般只从每个组织块切取一张切片来测试

测试视野的基本抽样方法

在切片上等距随机选择测试视野



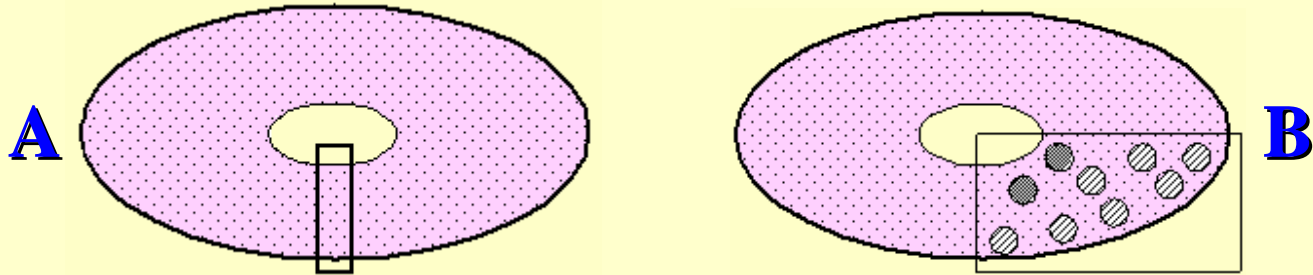
1. 手动：借助载物台上的刻度尺...
2. 机动：借助（电脑辅助）机动载物台

测试视野抽样问题

选择具有某些特征的视野或结构

- 染色效果不好的视野不测
可以接受，如果染色效果与所测结构特征无关
- 有大血管等（因此所测结构很少）的视野不测
不可接受，因为这将高估所测结构的 V_V 等.....
- 没有所测结构的视野不测
不可接受，除非（1）所测的是所测结构的局部大小；（2）例如，估计肾内肾小球毛细血管的 V_V 时，如果已在低倍镜下估计肾内肾小球的 V_V ，那么在高倍镜下只需抽选有肾小球的视野

- 例如，先抽有管腔的圆或椭圆形生精小管轮廓，然后在轮廓短轴的位置叠加1个测试视野（A）



可否用于估计睾丸内生精小管（内结构）的 V_v

可否用于分析生精小管壁内生精细胞的层数

可否用于估计壁内细胞的数量或其比例（B）

可否用于抽选 Sertoli 细胞核并测量其体积

各向同性随机抽样： 每个方向都有相同的机会被抽选

Isotropic random sampling: Each direction has the same chance to be sampled

受测试方向影响的体视学测试 (需要各向同性抽样):

- 交点计数 (估计边长、表面积)
- 轮廓计数 (估计线形结构的长度)
- 截距/宽度测量 (估计薄膜或屏障结构的厚度)
- 点取截距等的测量 (估计粒子体积、星体积)

不受测试方向影响的体视学测试 (不必各向同性抽样):

- 测点计数 (估计面积、体积)
- 粒子计数 (估计粒子数)
- 轮廓计数 (估计轮廓数)
- 卡瓦列里原理 (估计体积)

**用各向同性切片（isotropic sections）：
IUR (isotropic uniform random) test
（各向同性均匀随机测试）**

- **从所测器官组织获取均匀随机组织块**
- **从所取组织块切各向同性切片**
- **在各向同性切片上进行均匀随机测试**

三维空间内的各向同性随机方向

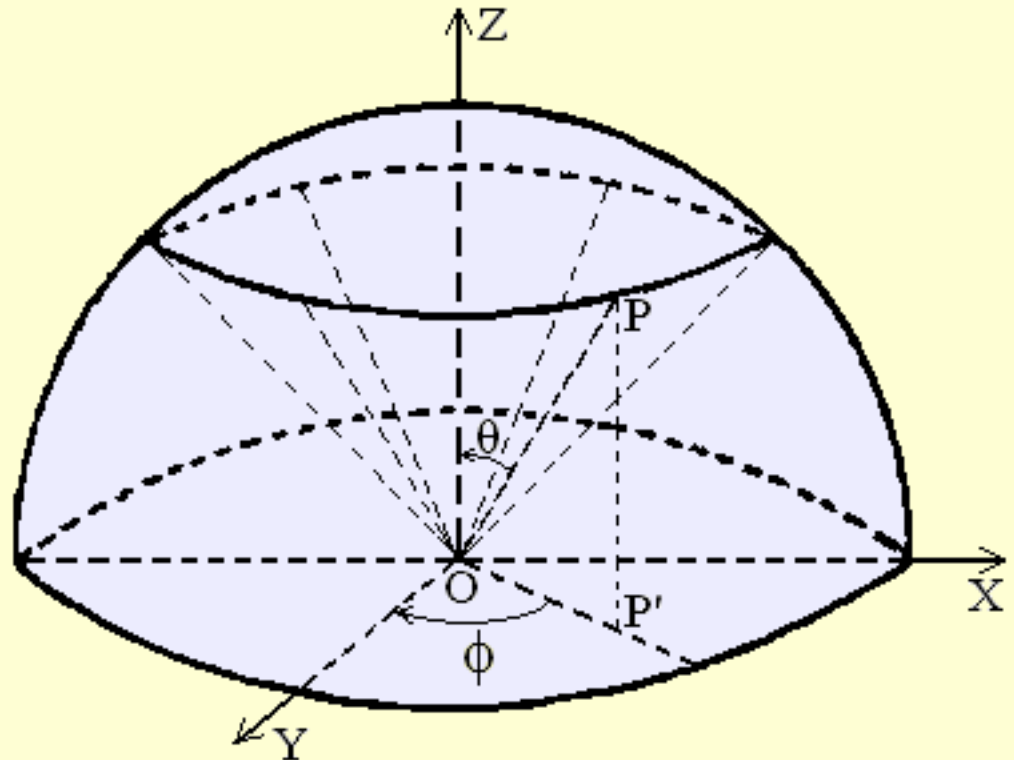
Isotropic Random Directions in 3D Space

- $\phi = 360 \cdot r_1$
- $\theta = \arccos r_2$
[r_1/r_2 : 0-1之间的均匀随机数字]

用Excel软件确定：

$$\phi := 360 * \text{RAND}()$$

$$\theta := \text{ACOS}(\text{RAND}()) * 180 / \text{PI}()$$



各向同性切片：定向法

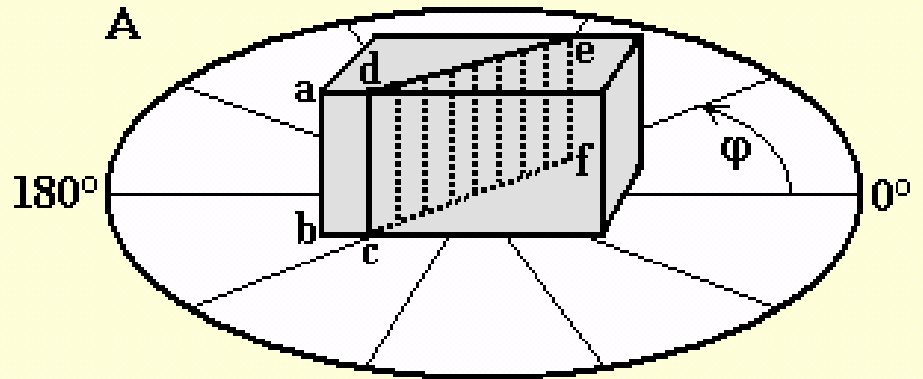
Isotropic Sectioning: Orientator

1、作垂直切片

$$\varphi = 180r_1$$

用Excel确定：

$$=180*\text{RAND}()$$

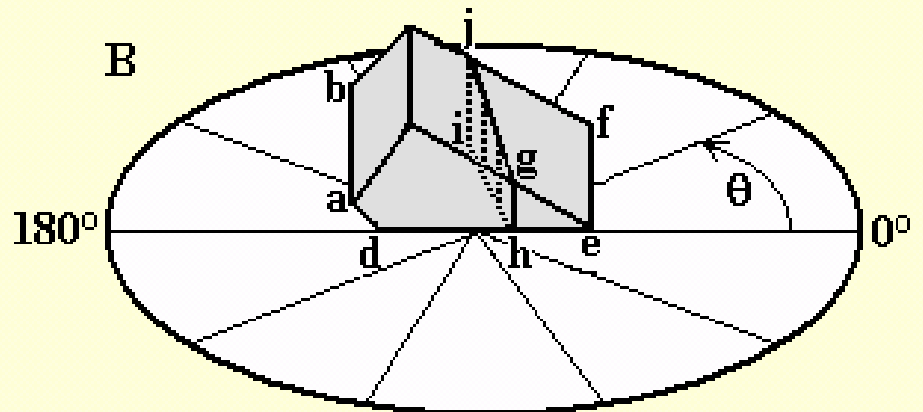


2、作各向同性切片

$$\theta = \arccos(1-2r_2)$$

用Excel确定：

$$=\text{ACOS}(1-2*\text{RAND}())*180/\text{PI}()$$



各向同性切片：球切法

Isotropic sectioning: Isector

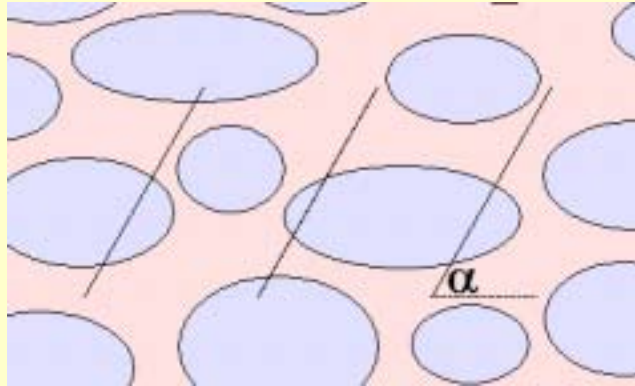
例如：

- 1、先将组织块包埋成球形块
- 2、然后常规包埋球形块并切片

(球形块的位置独立于组织块的位置与方向)

适于较小组织块，需要特制包埋模具，能先包成球形块

在三维空间的各向同性切片/截面（二维平面）上进行各向同性测试，即三维空间内的各向同性测试



α : 0~180间的均匀随机角度
【用Excel: =180*RAND()】

二维平面上的各向同性测试 \neq
三维空间内的各向同性测试

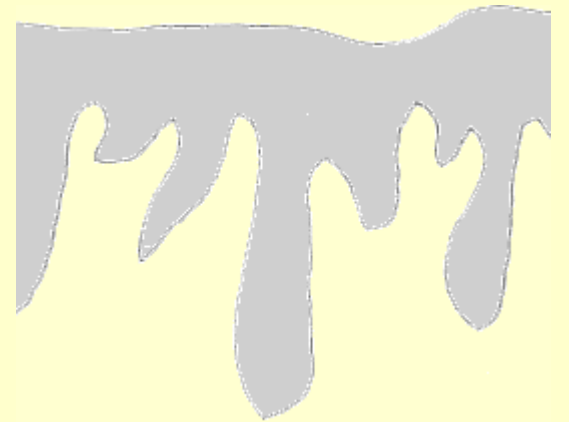


各向同性切片的问题：

假如要估计皮肤表皮基底面的表面积，

或者肠壁绒毛的表面积，

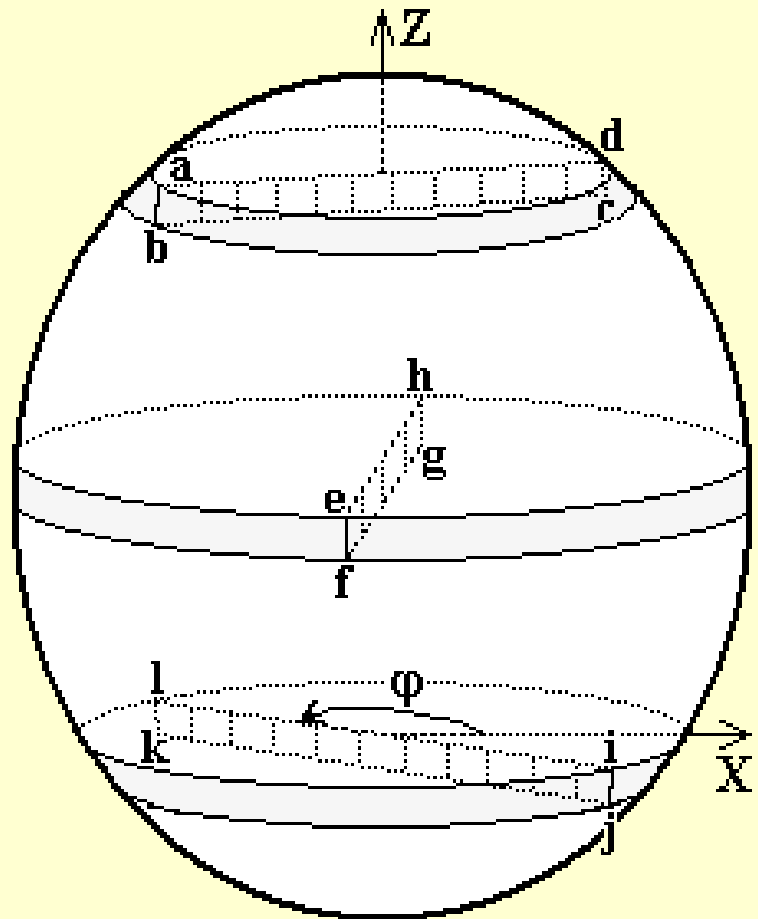
切各向同性切片会怎样？



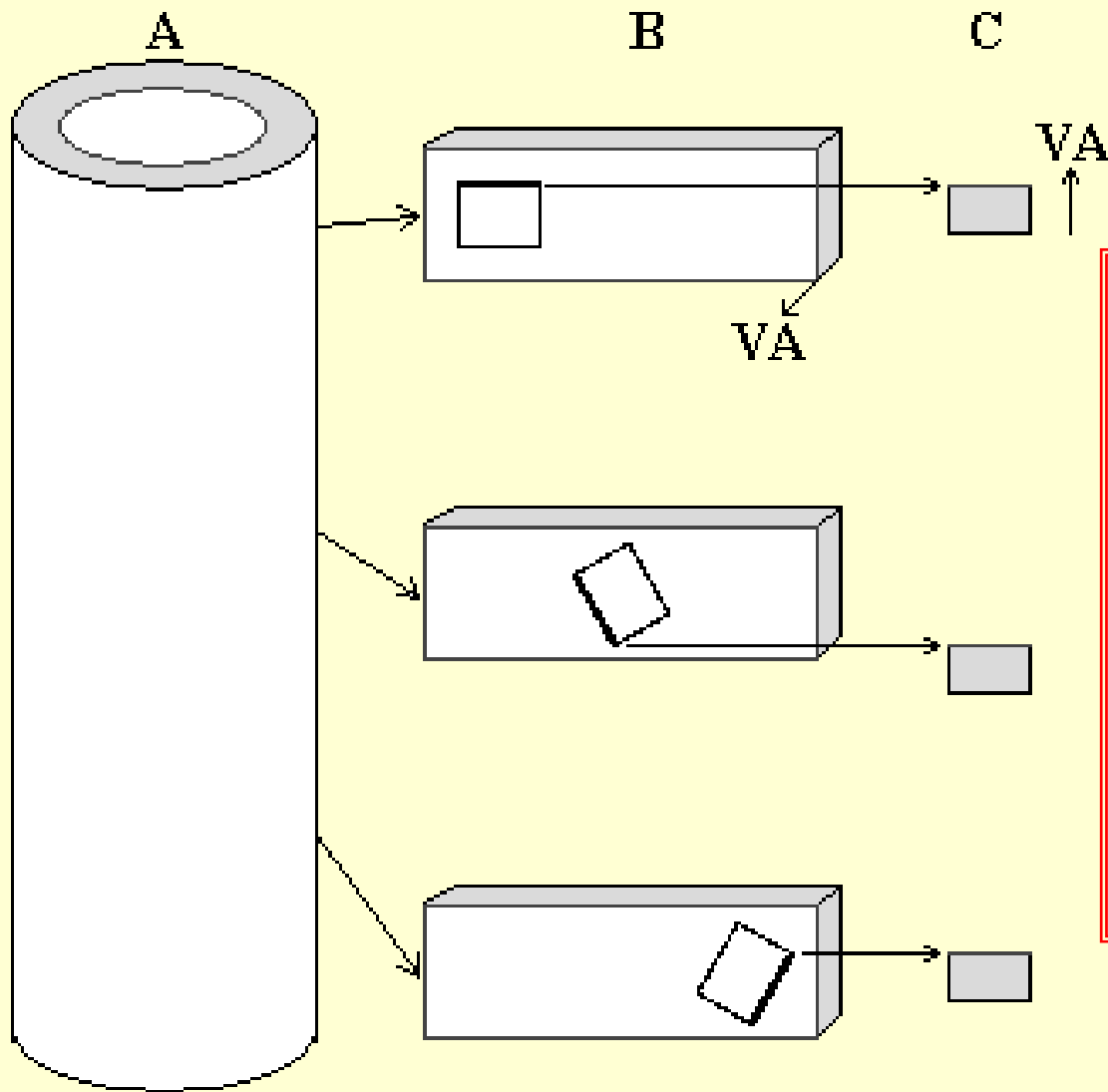
**用垂直切片/截面 (vertical sections) :
VUR (vertical uniform random) test
(垂直均匀随机测试)**

- **从所测器官组织获取均匀随机组织块**
- **从所取组织块切垂直切片**
- **在垂直切片上进行正弦加权随机测试**

- 垂直切片/截面：
与一个平面（水平面）
垂直 [或与一个方向
（垂直轴向）平行]
的随机切片/截面
- 垂直切片/截面上要
能辨认确定垂直轴向
- 最好能有利于对所测
结构的辨认



$$\phi = 180 * \text{RAND}()$$

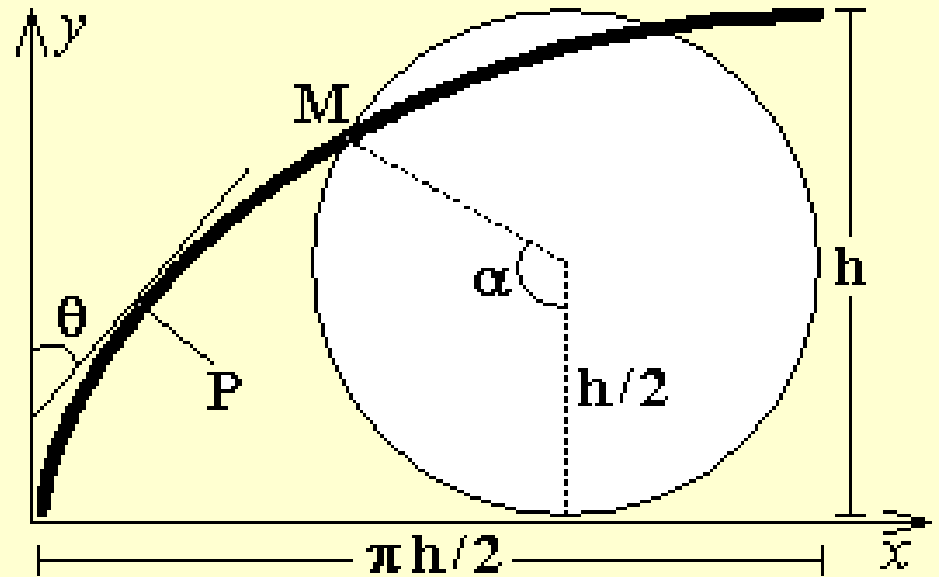


**浆膜面=
水平面**

**垂直于浆膜
面的方向=
垂直轴向**

摆线 (Cycloid) 的特征

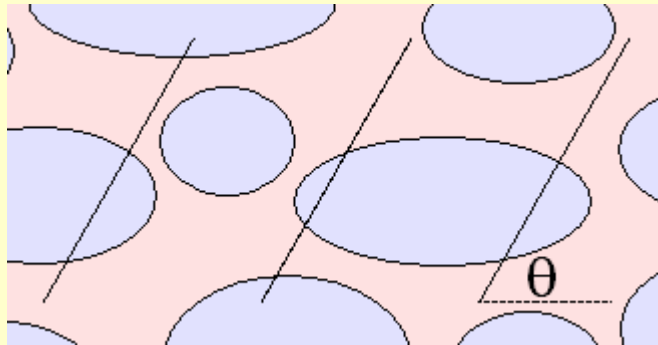
- 垂直切片/截面上的正弦加权 (sine-weighted) 方向 (与垂直轴方向的夹角), 就是三维空间内的各向同性方向



$$A: x = (h/2)(\alpha - \sin\alpha), y = (h/2)(1 - \cos\alpha)$$

$$B: f(\theta) = \sin\theta$$

$$C: E(\theta) = 1 \approx 57.3^\circ$$

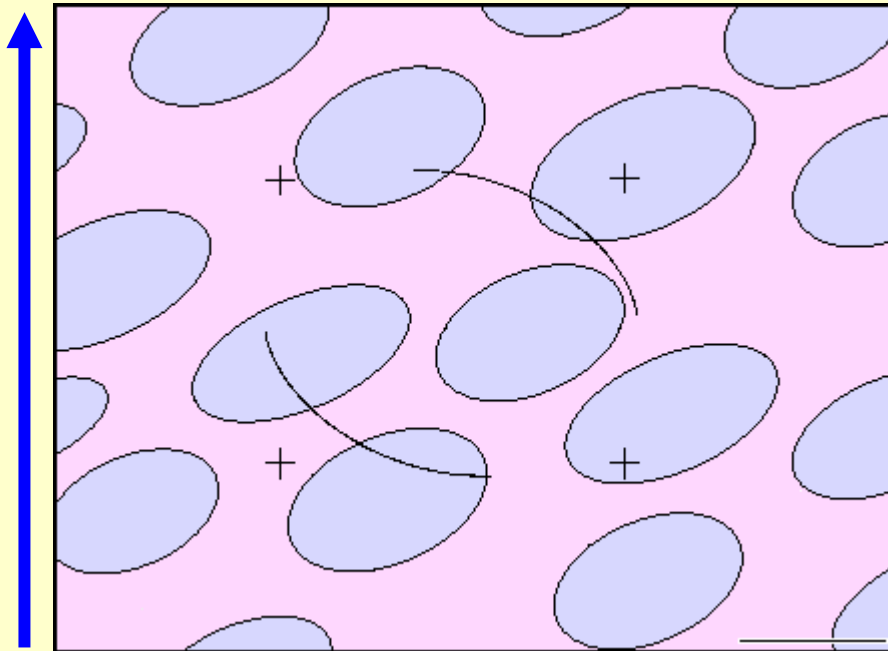


$$\theta = \arccos r$$

用Excel: **`=ACOS(RAND()*180/PI())`**

用摆线测线

在垂直切片测试视野上叠加
一定方向的摆线：摆线Y轴与垂直轴平行



箭头：
垂直轴

4 个测点
2 条摆线
 $l_p =$ 标尺

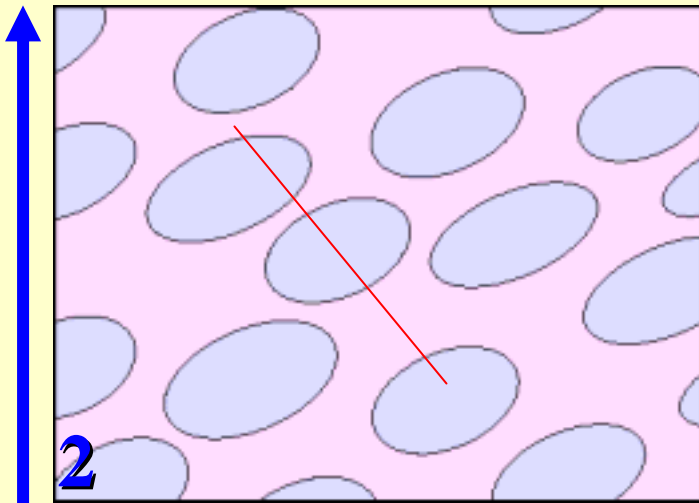
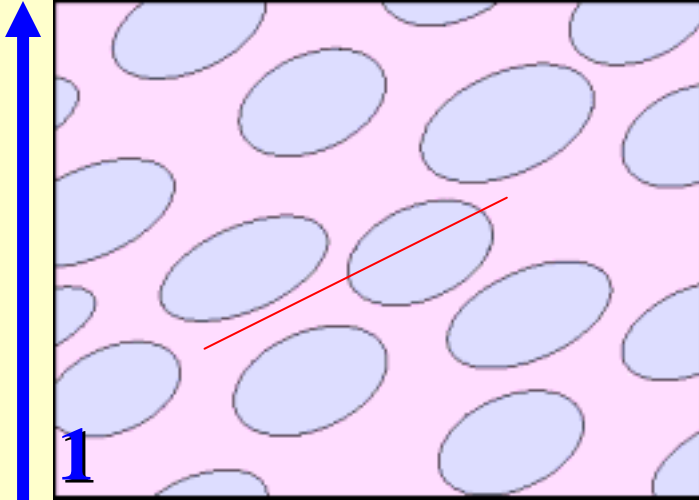
用直线测线

(测线两端可当做测点)

1. 在第1个视野上叠加一条从右上至左下的直线测线，其与垂直轴的夹角用 Excel 随机确定：

$$=ACOS(RAND()*180/PI())$$

2. 在第2个视野上叠加从左上至右下的等长直线测线，其与垂直轴的夹角同上确定



.....

常见体视学概念

Commonly seen stereological concepts

- **Design-based / 设计依赖** : 随机抽样
- **Model-based / 模型依赖** : 假设所测结构随机分布
- **Classical stereology / 经典体视学** : 模型依赖 ?
- **Modern stereology / 现代体视学** : 设计依赖 ?
- **Unbiased / 无偏** : 统计方法无偏 , 设计依赖...
- **Biased / 有偏** : 统计方法有偏 , 模型依赖...

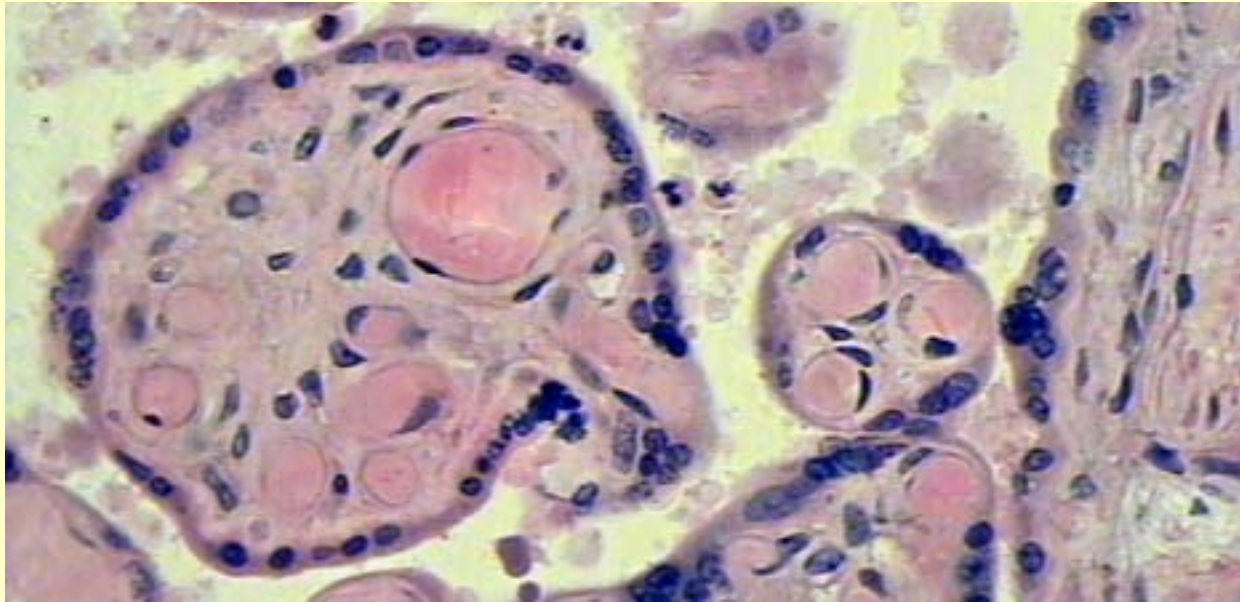
2、比值估计 / Ratio Estimates

- 计算比值（相对值、密度）时，应以个体/器官为单位，把测试结果的总和与总和相比：

$$V_v = \frac{\Sigma P}{\Sigma P_{ref}} \quad S_v = \frac{2\Sigma I}{\Sigma L_{ref}} \quad L_v = \frac{2\Sigma Q}{\Sigma A_{ref}} \quad N_v = \frac{\Sigma Q}{\Sigma V_{ref}}$$

- 比值 = 所测结构的相对量 \neq 所测结构的总量
- 参照空间的陷阱（The Reference Trap）：
 - 只有比值没有参照空间的体积不能估计总量（科研常常更需总量，不能把比值当总量）

体视学测得：胎盘内绒毛间隙的体积比例



- **胎盘内有多大体积的绒毛间隙？**
- **该项测量有什么意义？！（病理诊断除外）**

**体视学测得胎盘内绒毛间隙的体积比例：
非妊娠贫血组与妊娠贫血组，均约为30%**

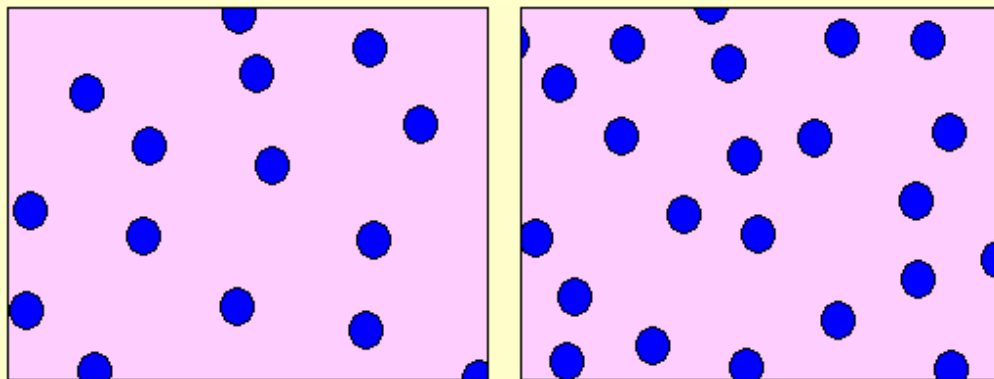
妊娠贫血未改变绒毛间隙的体积？

无法回答，除非获得结构总量

(总体积=胎盘内绒毛间隙体积比例×胎盘体积)

事实：妊娠贫血胎盘的体积增加约30%

相应地，胎盘内绒毛间隙的总体积增加约30%



对照组 细胞

实验组 细胞

实验组所测器官内所测细胞较密集.

- 实验组所测细胞的数量 增加/不变/减少? 不知道

白天 胞质分泌颗粒 | 夜晚 胞质分泌颗粒

胞质内的分泌颗粒, 在夜晚较密集.

- 胞质内的分泌颗粒, 在夜晚合成白天释放? 不知道

粒子总数 = 数密度 × 参照空间的体积

面部 x 的

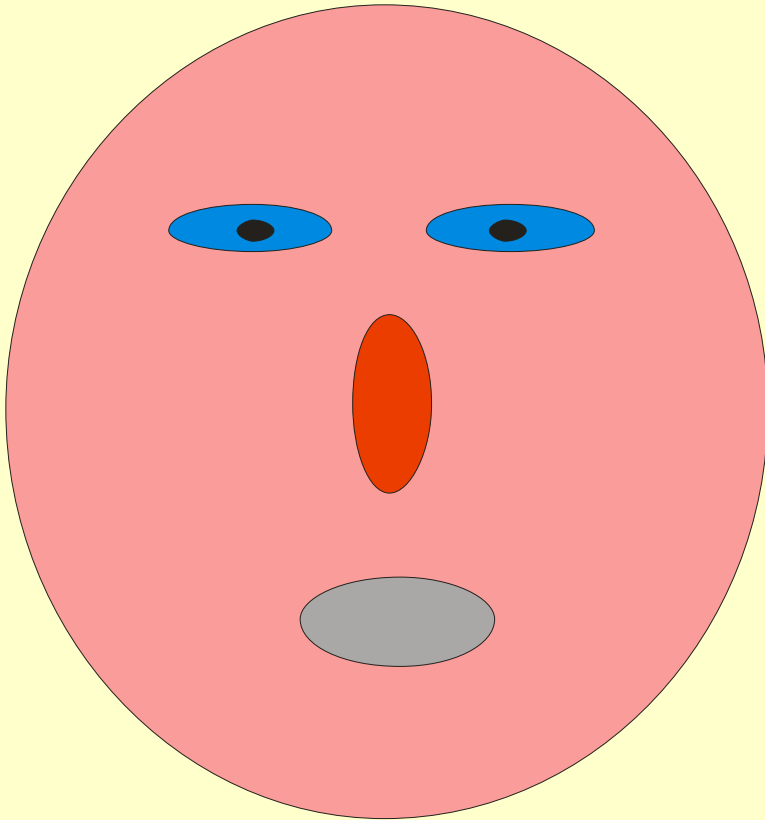
鼻子数

$$N_A = 1 (u^{-2})$$

面部 y 的

鼻子数

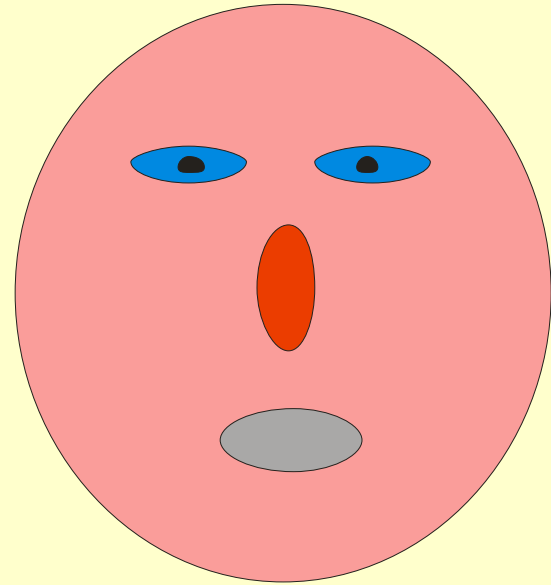
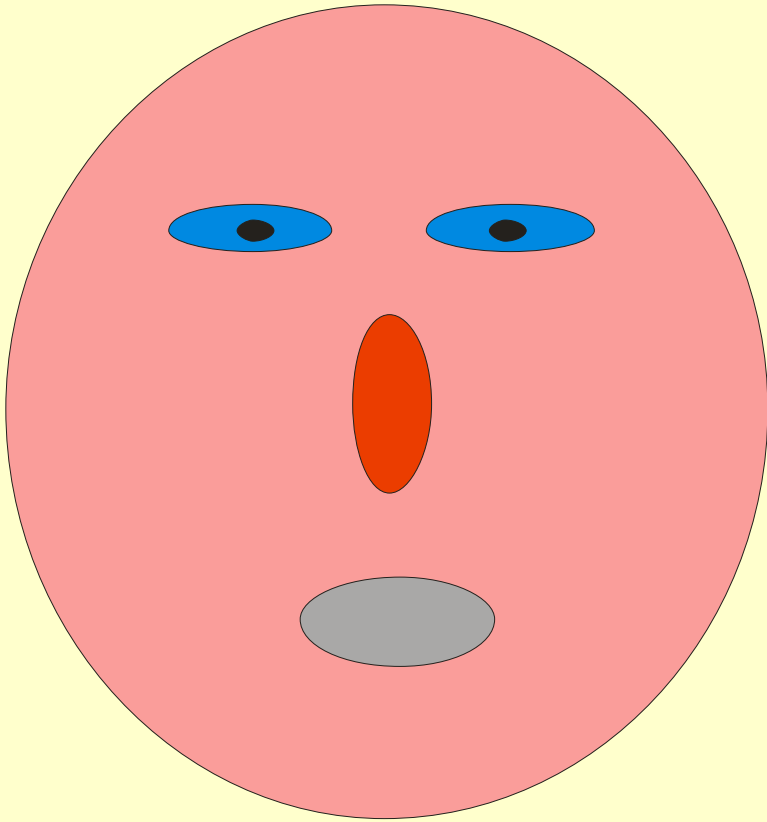
$$N_A = 2 (u^{-2})$$



面部 y 的

鼻子数

$$N_A = 2 (u^{-2})$$



显微观察的“固有缺陷”：

- 只能观察局部
- 通常只能直接测量“密度”

- 如只测得“密度”，又不知道所测器官组织的体积，就不能获得所测结构在所测器官组织内的总量

米坛里有多少粒米？

米坛

- 怎么数？ 抓一把米出来数
- 数得什么？ “数密度”（粒数/kg）
- 怎么算米粒总数？ 数密度 \times 米粒总重

参照空间的陷阱问题

The reference trap：事先未“探明”参照空间（包含所测结构的器官组织）的大小，贸然“钻进”参照空间去测量，结果无法测得所测结构的总量

——测量所测器官的体积（称重...）

——获得参照空间（器官、胞质...）的体积
（事先界定“参照空间”并在其中随机取材）

针对生物组织的

所有体视学研究

所有形态定量研究

所有形态学研究

都要注意 The Reference Trap !

任何研究都尽可能获得所测器官的体积：

- 体积 = 质量 / 密度**
- 不能游离的器官：卡瓦列里原理**
- 肺、骨等：排水法 或 浮力定律**

3、抽样误差 / Sampling Error

- 误差：抽样误差 + 系统误差
- 系统误差：仪器问题、标本问题
- 抽样误差决定因素：
 - 所测结构/指标的变异
 - 抽样方法
 - 样本含量 (sample size)

抽样误差
分析前提：
随机抽样

• 抽样总误差：SE、CE（个体水平）

	附睾体积 (cm ³)	附睾内精子总数 (百万)
动物1	0.75	906
动物2	0.66	662
动物3	0.68	578
动物4	0.66	462
动物5	0.62	603
动物6	0.55	625
平均	0.653	639
标准误	0.027	60
误差系数	4.1%	9.4%

• 抽样误差分析

多级抽样（套抽样）中各级抽样方差 s^2 、样本含量 n 与抽样总误差（ Os_i^2 ：总方差）之间的关系：

$$\frac{Os_i^2}{n_i} = \frac{s_i^2}{n_i} + \frac{s_{ii}^2}{n_i \times n_{ii}} + \frac{s_{iii}^2}{n_i \times n_{ii} \times n_{iii}} + \frac{s_{iv}^2}{n_i \times n_{ii} \times n_{iii} \times n_{iv}}$$

1、个体差异（ s_i^2 ）和个体数（ n_i ）对总误差的影响较大；为减少总误差，增加 n_i 或 n_{ii} 比增加 n_{iii} 或 n_{iv} 会更有效，减少 s_i^2 或 s_{ii}^2 比减少 s_{iii}^2 或 s_{iv}^2 会更有效

2、广延样本的粗略测试优于局限样本的精确测试

体视学测试思想：Do more less well / 多而粗

- **样本含量**

- **前提：** 随机抽样
- **因素：** 误差容许范围、抽样方法

“理想”误差： 总 CE ， 器官/个体测量 $CE < 0.05$

- **基本：** 各级抽样 $n > 1$
显微 M 小（清晰观察所测结构）
抽样间距适当大，例如：
 - 每个视野只测“几个”.....
 - 测点间距大于所测粒子直径

- **一般经验：**

-- **体视学测试量：**在均匀抽样及适当抽样间距的前提下，从每个器官获得的各项基本测试结果，如测点（所测结构内的测点）、交点、轮廓、粒子、直径测量总数，一般不必超过100 ~ 200

-- **动物/器官数：**5 ~ 10 个

$$(0.5)^5 < 0.05$$

--- **所测指标变异小, 皆升或皆降：**n = 5 无妨

--- **所测指标变异大：**增大样本含量、再分组
重选指标、重新设计

4、组织处理对体视学估计的影响

Effects of Tissue Processing on Stereological Estimates

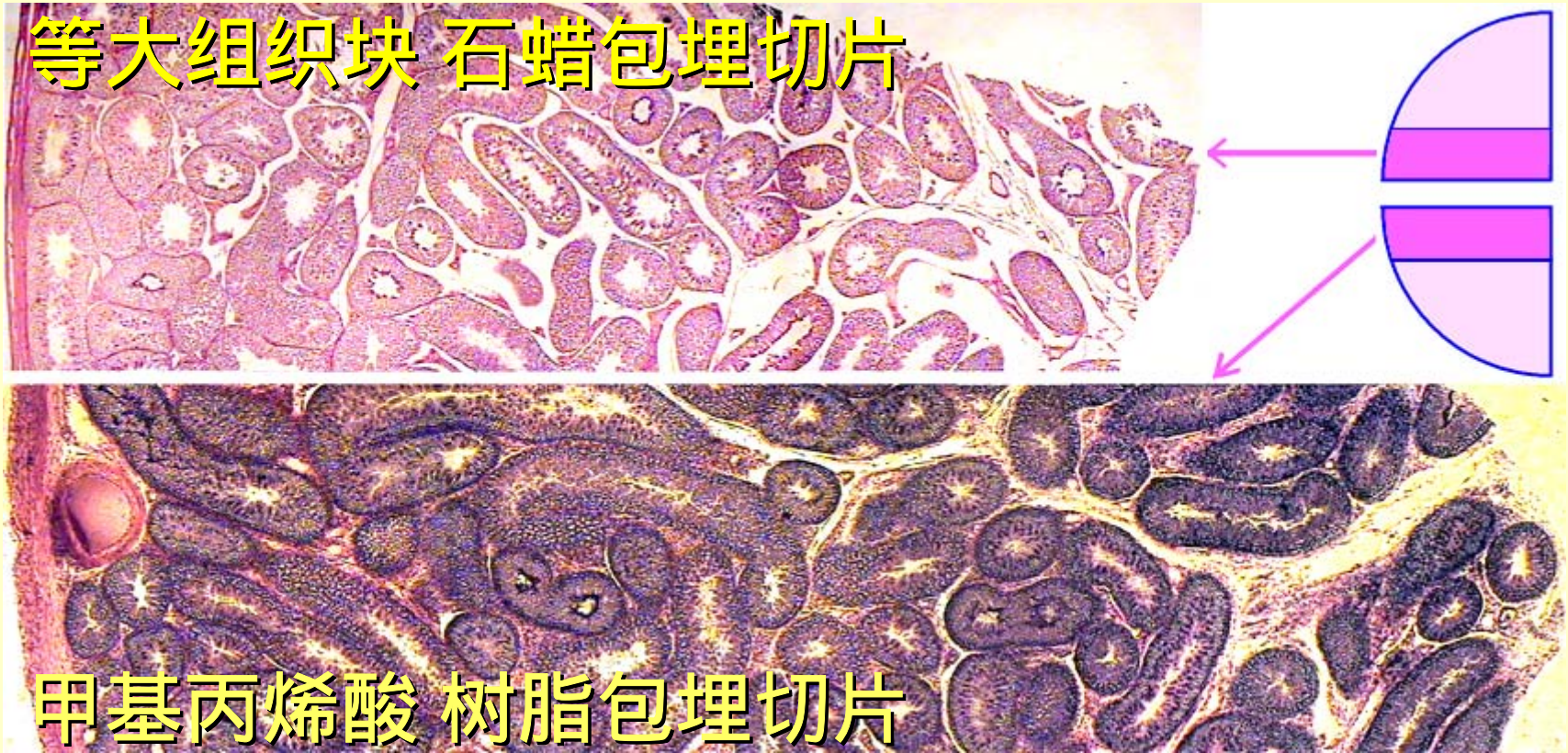
- 所测图像是金相磨面：？
 - 所测图像是CT断层等医学影像学图像：？
-
-

- 所测图像是组织切片图像：问题多

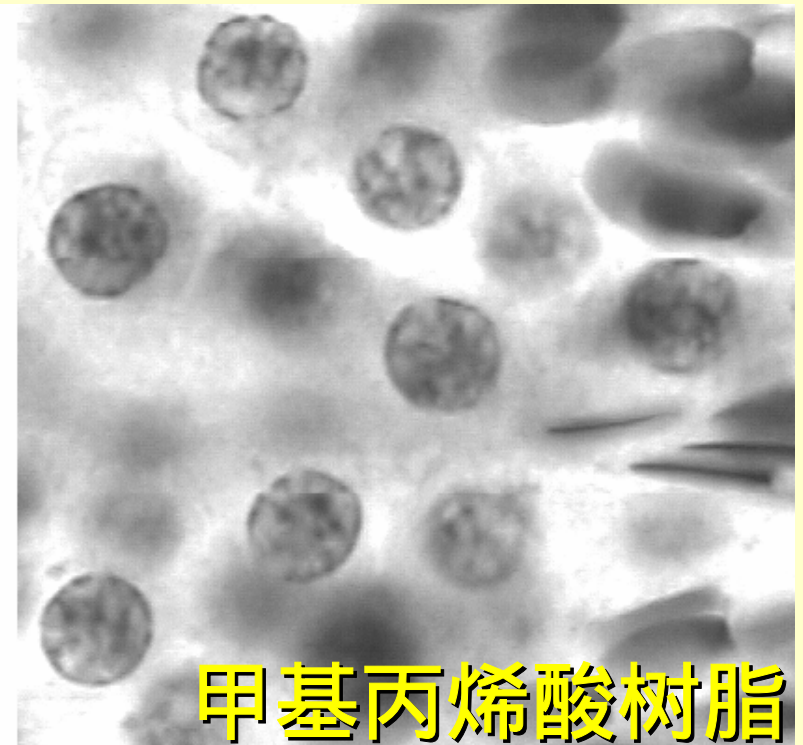
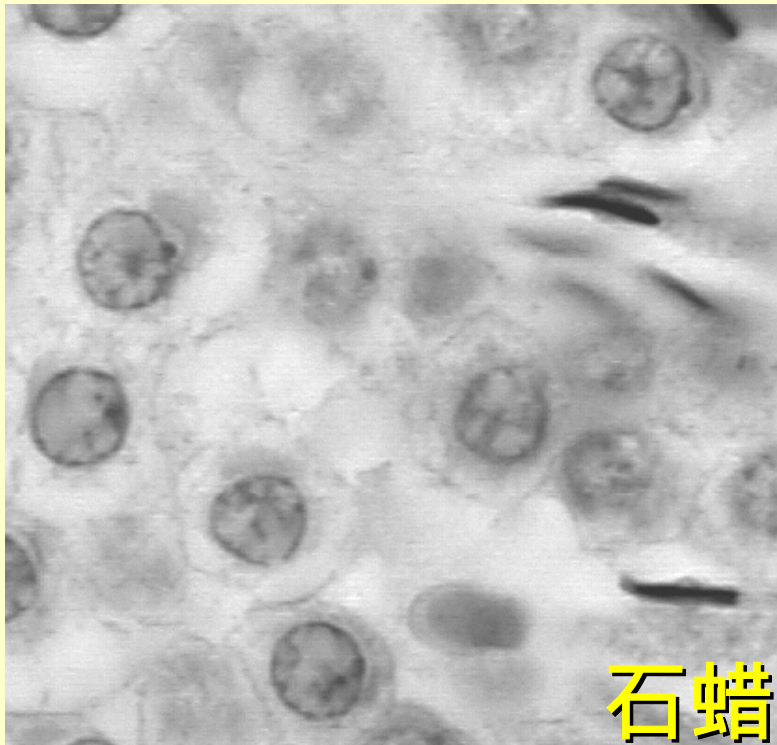
主要问题：组织处理（固定、脱水、包埋、切片、染色等）过程中所测组织结构及其他组织结构尺寸的变化

组织处理过程中的一般变化：

总的来讲，最终是皱缩，甚至不均匀皱缩



- **器官组织固定 → 组织皱缩**
- **固定后脱水或保存（乙醇） → 组织肿胀**
- **包埋 → 较严重组织皱缩（尤其是石蜡包埋）**
- **石蜡切片染色 → 组织压缩（切片厚度变薄）**



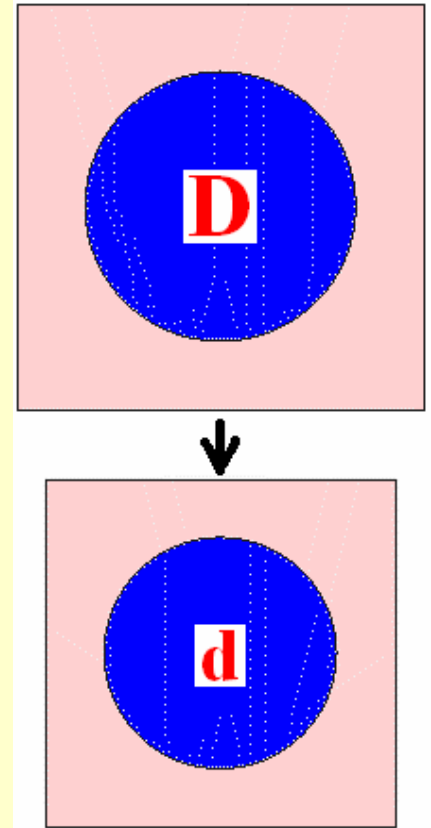
- **组织处理对结构形态定量特征的影响**

- **拓扑特征 topological property**

- (粒子数等) : **不受影响**

- **度量特征 metric property**

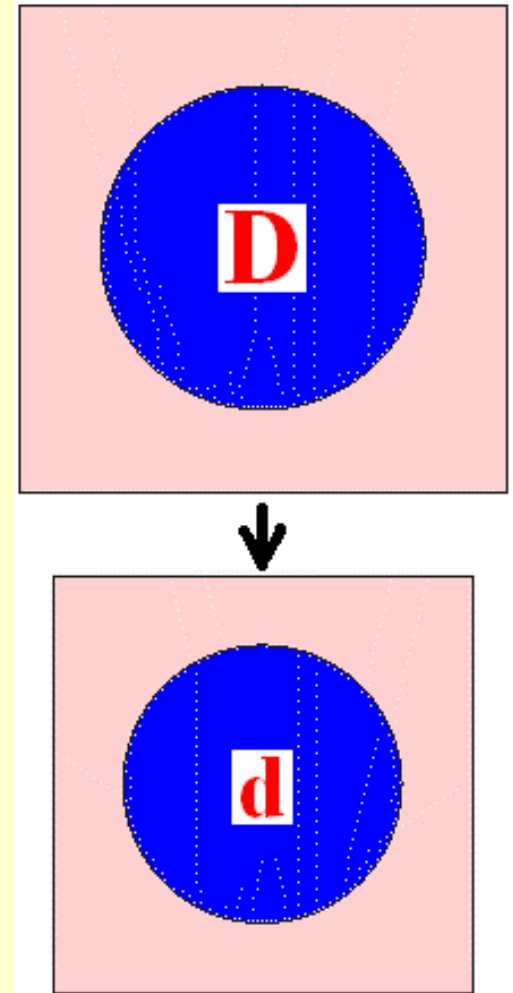
- (体积、表面积、长度/厚度
/直径、曲率等) : **受影响**



组织皱缩 / Tissue shrinkage

假设： $d^3 = 0.6 D^3$

- 体积 缩小：
 $= 1 - (d^3/D^3) = 40.0\%$
- 表面积 缩小：
 $= 1 - (d^2/D^2) = 28.9\%$
- 直径/高度 缩小
 $= 1 - (d/D) = 15.7\%$



怎么办？

1. 严格对照

- 实验组与对照组对比
- 忽略组织处理过程中组织变化的影响，
假设对实验组与对照组的影响一致



将就！

2. 减少影响

- 采用较薄的切片，光学效果较好的切片
- 用树脂包埋切片（如不做免疫组化染色）

3. 了解皱缩，校正影响

校正前提

- 假设所测结构及其周围结构的尺寸变化是均匀的，成比例的。（实际情况未必如此！）
- 假设器官组织处理前的（真实的或新鲜状态的）体积为 V_b （下标 b 表示before），处理后的体积为 V_a （下标 a 表示after，即假想把器官组织完全切成连续切片后，由连续切片重建的器官组织的体积），由此定义并获得组织体积的变化系数 C_v （coefficient of volume change）：

$$C_v = V_a / V_b$$

校正公式

$$- V \approx V_v \times V_b \times C_v^{0/3} = V_v \times V_b$$

$$- S \approx S_v \times V_b \times C_v^{1/3}$$

$$- L \approx L_v \times V_b \times C_v^{2/3}$$

对于线形结构，假设组织处理过程中其直径
缩小但长度不变，则： $L \approx L_v \times V_a$

对于粒子数：

$$- N = N_v \times V_b \times C_v^{3/3} = N_v \times V_a$$

怎么办？

4. 避免影响

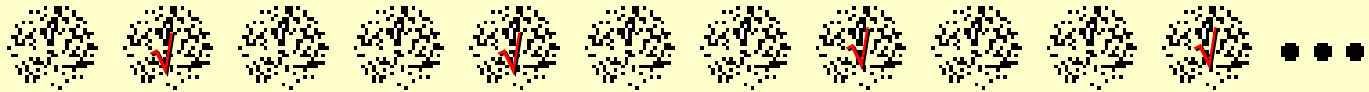
唯一：采用分合法（结合体视框）估计粒子数

分合法（fractionator）：根据等距随机抽样及其抽样间距估计总量的统计方法

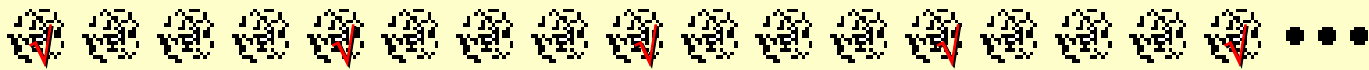
“已知”：从米坛里抓了万分之一粒米出来，抓出来共500粒。请问米坛里共有多少粒米？

分合法与米粒总数

- 把米分成若干“大堆”，等距随机抽取 $1/a$ 堆



- 把所抽米分成“中堆”，等距随机抽取 $1/b$ 堆



- 把所抽米分成“小堆”，等距随机抽取 $1/c$ 堆



.....

- 计数最后所抽米的米粒数 n
- 计算（无偏估计）米粒总数： $a \times b \times c \times \dots \times n$

光学分合法（分合法+光学体视框）与细胞核总数

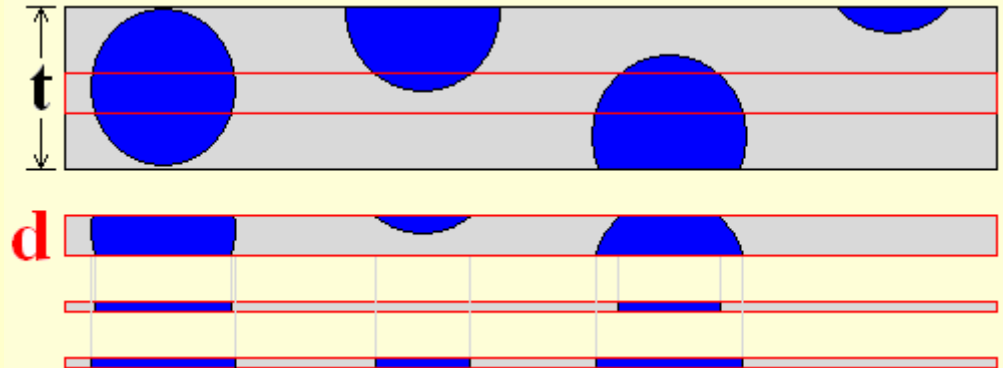
- 先把器官完全切成组织块（blocks），然后等距随机抽取 $1/b$ （ b 为正整数）个组织块
- 把所抽组织块完全切成较厚的连续切片（sections），等距随机抽取 $1/s$ （ s 为正整数）张切片
- 在所抽切片上等距随机抽选 $1/f$ （ f 未必是正整数）面积的测试视野（fields）
- 用油镜在所抽视野上测量 $1/d$ （ d 未必是正整数）厚度或景深（depth）的切片，即在厚切片内连续观察光学切片，用光学体视框计数一定光学切片厚度内所测细胞核的数量
- 假如这样计数的细胞核总数为 n ，那么该器官内细胞核总数的无偏估计为： $b \times s \times f \times d \times n$

5、切片厚度 / Section Thickness

投影过多 / Overprojection : 直径、体积等 高估
投影过少 / Underprojection : 直径、体积等 低估

物镜	NA	d (μm)
x4	0.13	32.27
x10	0.30	5.83
x20	0.50	1.91
x40	0.75	0.65
x100	1.30	0.25

$$\text{景深 } d = \lambda (n^2 - \text{NA}^2)^{1/2} / \text{NA}^2$$



**用25 μm 厚甲基丙烯酸树脂包埋切片估计的
睾丸内生精小管的体积分数**

用 $\times 10$ 物镜估计结果：71.1%

用 $\times 40$ 物镜估计结果：71.5%

用 $\times 100$ 油镜估计结果：72.1%

赵圆宇等. 中国体视学与图像分析 2010;15(2):191-4

6、主观性问题

Problem of Subjectivity

抽样问题 —— **随机**

结构辨认问题 —— **标准统一**
—— **交替测量各组各动物切片...**

测量问题 —— **标准统一**
—— **盲法测量各组各动物切片...**

7、测格制备

Preparation of Test Grids

- 显微照片：透明胶片测格（打印或复印）
- 投影图像：纸测格（绘制、打印或复印）
（固定于墙/桌面上，注意图像勿变形）
- 显微镜下图像：目镜测格
（刻于透明玻璃片上，置于目镜光阑处）
- 显示器上图像：软件测格

8、图像分析 / Image Analysis

- 数字图像：像素（颜色、灰度、坐标）
- 自动图像分析：
 - 面积、长度/距离、轮廓数量、灰度...测量
 - 每幅图像（视野）的测量精确（测量误差小）
 - 可作为体视学测试的辅助工具
- 体视学系统：
 - 电脑监视器上观察组织图像
 - 视野的等距随机抽样
 - 测格定义（包括测格样式、大小、方向...）
 - 测试面积测量、距离测量（包括自动计算...）
 - 光学切片间距测量（以实现光学体视框...）

关于考试

- 考试时间

- 考试方式：(1) 开卷。(2) 提供叠加有测格的模型结构图像，按要求进行体视学测试和计算

- 考试内容

基本测试：测点计数 交点计数 轮廓计数

粒子计数 直径测量 (点取) 截距测量

密度估计： V_V S_V L_V N_V (注意其单位)

总量估计：器官内所测结构总量 = 密度 \times 器官体积

大小估计：Feret直径 平均厚度 星体积

体积加权平均体积

考题举例

1. 根据禁线法则，测试框“内”应计数的所测结构轮廓（见图1）共有多少个？请在应计数的轮廓里打勾（√）。
2. 假如所测结构为线形结构，根据体视学原理，器官内所测线形结构的长度密度的估计为多少（写出计算步骤，注意单位）？
3. 假设器官体积为 5 cm^3 ，那么器官内所测线形结构的总长度为多少（结合上述结果写出计算步骤，注意单位）？