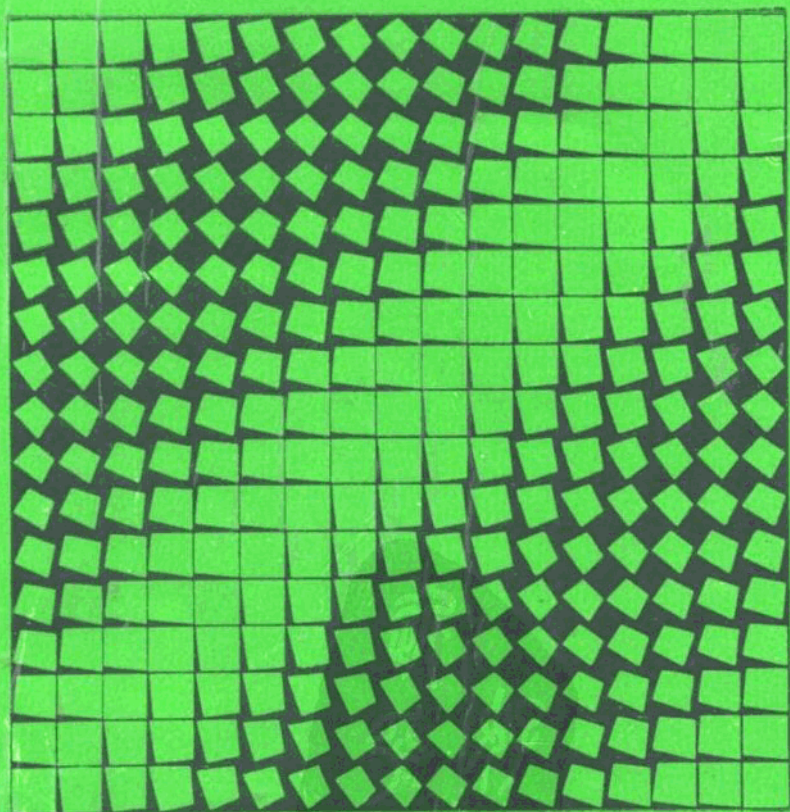


实用生物体视学技术

申 洪 沈忠英 编著



中山大学出版社

R379
S1

125825

内 容 简 介

本书从实用性出发,概括地阐述了体视学的基本原理,着重介绍了体视学基本测试方法,系统地论述了各类体视学参数的测算方法,并就体视学中的样本含量、抽样方法和数据处理等作了详细介绍。此外本书还介绍了图像分析系统性能、原理及其在生物医学上的应用,并就平面图像常用定量指标作了介绍。

本书适合所有从事生物形态学(解剖学、组织学、病理学、生物学、寄生虫学、超微结构和医学影像学等)定量研究和教学的科研人员、教师及研究生、大学生参阅,也可供材料、地质、图像分析等所有从事与组织形态结构有关的专业人员参考,对从事生物机能及生物数学研究的人员也有一定的参考作用。

序

体视学 (Stereology) 一词是1961年在德国Feldfery由Hens Elias召集的一个11人 (两位数学家、九位生物学家) 聚会上研讨后拟定的。该词能显示其自身内涵的形态定义, 所以很快被大家接受下来, 形成一门新的方法学科。体视学是关于固体组织的截面的空间解释观点和估算方法。

追溯历史, 从1847年法国地质学家Delesse先生提出把三维的测量量用二维的测量量来代替, 并证明 $V_v = A_v(V_v)$ (——体积密度百分数, A_v ——面积密度百分数) 的结论后, 就开肇了体视学的发展史。一百多年来, 体视学从地质矿物领域开始, 很快扩展到金属材料结构与性能的形态定量研究, 确定材料显微组织微观尺寸与材料性能之间的定量关系。由于它在金属材料工程、质量控制中有突出的作用, 形成了今天的“体视金相学”分支。现在, 生物学、医学、冶金、矿物、电子、能源、环保、气象及核工业等学科都越来越广泛地应用体视学理论来解释各自的实际问题。并且, 随着自然科学、新技术的飞跃发展, 体视学的新模型, 新的关系式也在不断产生。如拐点学的立体关系式、断层分析式等等, 使应用领域更广泛和深入。

我国1964年出版了《定量组织学实验技术》, 但十年动乱影响了该学科的发展。1978年显微组织结构分析与形态测量工作爆炸性地开展起来, 各个学科领域都注视到体视学理论和图像分析技术的应用价值和意义, 特别是材料界较广泛地开展了形态定量工作, 并引进了先进的图像分析系统。1981年军事医学科学院在生物、医学界第一家引进图像分析仪, 在形态学的基础学科如

病理、解剖、组胚和生物等领域系统地开展了形态定量工作。经过八届全国性的生物医学体视学及图像分析学习班，生物医学界的显微科技人员也较广泛地开展了形态计量学工作。本书作者就是根据他们在汕头大学举办全国性普及班的讲义编写出来的，是我国第一部正式出版的较系统的生物体视学书籍，对普及体视学，促进形态学从定性描述过渡到定量表达，推动体视学发展，具有重要作用。

本书主要讲述体视学方法和图像分析仪的应用。由于形态计量学在我国还处于初始阶段，除刚刚出版的余永宁教授编写的《体视学》是一部专著外，大都是应用性论文。所以，很多专业性术语就难免出现不一致现象。本书也存在这些问题，如本书“Mean Curvature”译为“平均曲度”，过去是“平均曲率”，等等。这是一切新学科于初始期所难免的现象。随着体视学理论、方法和图像分析技术的广泛应用，相信中国体视学学会与各地区学会将在以后的工作中进行规范化，争取尽快统一起来纳入新词典中。

我相信此书的出版会进一步加强国内从事体视学及图像分析方面的科技工作者的联系、交流及对国内外有关方面动态的了解，促进我国体视学及图像分析技术的普及、应用和研究。更希望大家都来著书，出现各种专业方面的专著，并联合开拓新的应用领域和理论，把我国体视学科学发展起来。

张振声

一九九〇年九月六日于北京

前 言

体视学 (Stereology) 是由二维结构信息定量推论三维结构信息的一门介于形态学与数学之间的新兴边缘学科。用体视学原理和方法研究生物组织结构, 并据生物组织的结构特点探讨相应的体视学测算方法称为生物体视学。

生物形态学由定性向定量方向发展是必然趋势。掌握生物体视学技术有助于将生物形态学研究提高到一个新高度。例如, 在病理诊断方面应用体视学技术, 有助于定性诊断向定性定量相结合方向发展, 从而提高诊断的客观性、准确性和可重复性。近年来国外发表的与体视学应用有关的论文逐年增多。国内已召开 5 届体视学学术会议, 收到的学术论文也一届比一届多, 且增加的幅度很大。在第 5 届全国体视学学术会议收到的学术论文中, 生物医学方面的论文占 69%, 且质量较高。这也表明了体视学技术将得到越来越多的重视和广泛的应用。

然而许多人对体视学知识还比较陌生, 不少有志于从事体视学研究的人苦于参考书的缺乏。许多学者、研究生在研究中为了进一步提高科研质量, 也积极寻求体视学方法。为普及体视学知识, 促进体视学技术在生物医学形态学领域的应用, 推动形态学由定性向定量方向发展, 我们撰写了本书。本书是在申洪编写的《实用生物体视学技术》讲义的基础上, 参阅了叶常青教授编译的《体视学研究新方法》及有关文献, 结合我们的研究成果、经验、体会和方法, 增补了一些新内容、新方法, 并增加了图像分析系统和形态定量常用的测算指标等章节后, 经进一步整理、提炼后形成的。考虑到生物工作者阅读的需要, 本着实用的原则,

作者在编写的过程中省去了大部分数学公式推导，而着重于讲解基本概念、测算公式及应用方法。本书适合所有从事形态学研究和教学的科研人员、教师、大学生、研究生参考，我们希望本书对从事生物机能研究的工作者也有所帮助。

本书涉及许多数学公式，但这些公式並不复杂，一般有高中数学基础的人都能理解和运算。体视学测算结果与样本含量、抽样方法、图像质量和测算方法等有关，因此在进行体视学研究时，应加强质量控制，並注意有关公式的适用条件等。

本书的出版得到中国体视学学会秘书长张振声教授的鼓励、支持和帮助，大部分插图的绘制和贴字工作由洪佳慈、陈清同志帮助完成，在此一并表示衷心感谢。本书第十一章由沈忠英编写，其余各章由申洪编写。由于作者水平有限，书中一定存在不少错误，敬请各位同行、读者批评指正。

申 洪

1990年10月，广州

目 录

第一章 绪论	(1)
一、基本概念	(1)
二、体视学的诞生与发展	(4)
三、形态观察中的错觉	(5)
四、体视学在生物医学中的应用	(8)
第二章 生物体视学的基本原理	(13)
一、切片	(13)
二、切片与组织结构的关系	(15)
三、几何概率	(18)
四、积分几何学	(21)
五、随机切片	(25)
第三章 基本测试方法	(26)
一、测试系统结构	(26)
二、基本测试方法	(35)
三、测试系统的使用和制作方法	(50)
四、测微尺使用方法	(52)
五、放大倍数的计算	(56)
第四章 密度参数测算方法	(64)
一、体积密度(V_V)测算	(65)
二、表面积密度(S_V)测算	(80)
三、长度密度(L_V)测算	(86)
四、平均曲度密度(K_V)测算	(88)
五、数密度(N_V)测算	(89)

第五章 尺寸参数测算方法	(101)
一、平均粒子直径($\overline{D}$)测算	(101)
二、平均截距($\overline{l_0}$)测算	(107)
三、粒子体积(ν)测算	(107)
四、器官和组织体积(V_o)测算	(124)
五、屏障厚度(τ)测算	(127)
第六章 形状参数测算方法	(131)
一、表面积与体积比(R_{sv})测算	(131)
二、平均表面积($\overline{s}$)测算	(134)
三、平均曲度($\overline{K}$)测算	(135)
四、轴比(R_{ab})测算	(136)
五、球度(S_g)测算	(138)
六、三维形状因子(FF_s)测算	(140)
第七章 分布参数测算方法	(142)
一、平均自由程(λ)测算	(142)
二、平均中心距离($\overline{z}$)测算	(144)
三、最近邻距离(Δ_s)测算	(144)
四、粒子分散度($C_{\lambda z}$)测算	(145)
五、尺寸分布测算	(146)
第八章 结构成份总量测算方法	(152)
一、总体积、总表面积和总长度测算	(152)
二、粒子数测算	(154)
第九章 样本	(159)
一、样本含量	(159)
二、体视学抽样方法	(169)
三、多阶段抽样研究	(174)

第十章 数据处理	(179)
一、 均值、变异指标及标准误.....	(179)
二、 显著性检验的基本概念与 t 检验.....	(186)
三、 数值修约及书写表达.....	(192)
四、 体视学中的法定计量单位.....	(198)
第十一章 图像分析系统	(200)
一、 图像分析系统种类、设备和性能.....	(200)
二、 计算机—图像分析仪图像定量原理.....	(204)
三、 图像分析系统在生物学中的应用.....	(210)
四、 形态定量、图像分析研究的设计和实施.....	(216)
第十二章 形态定量常用测算指标	(223)
附录 1 本书基本符号含义.....	(231)
附录 2 标准正态曲线下的面积表.....	(238)
附录 3 样本均数与总体均数比较 (t 检验) 所需样本含量表.....	(240)
附录 4 两样本均数比较 (t 检验) 所需样本含量表.....	(242)
附录 5 配对比较 (t 检验) 所需样本含量表.....	(244)
附录 6 t 值表.....	(246)
附录 7 体视学中常用法定计量单位.....	(248)
附录 8 米制单位换算系数表.....	(249)
参考文献	(250)

第一章 绪 论

一门学科只有在成功地运用数学时才算达到了真正完善的地步。

——马克思

客观存在的一切事物都是质和量的统一体。事物不仅有质的规定性，而且有量的规定性。质要通过一定的量来表现。事物的质变和量变是紧密相联、相互制约的，所以，在研究任何问题时，都必须注意作量的考察和分析，才能更加准确地把握事物的质。

传统的生物形态学研究采用形态描述反映形态结构及其变化，并多局限于二维水平上，这与缺少形态定量分析技术和方法有关。生物体视学是介于生物形态学与数学之间的一门新兴边缘学科，为生物形态三维定量研究提供了方法。本书将把这门学科的基本知识介绍给读者，并希望能对读者研究有所帮助。

一、基本概念

由二维结构信息定量推论三维结构信息的科学称为体视学（Stereology）。体视学的研究内容包括从二维结构推论三维结构的原理、方法及应用。图象分析是进行体视学研究的方法之一，因此广义上图象分析原理和方法也属体视学研究范畴。用体视学原理和方法研究生物组织的三维结构，并据生物组织的结构特点研究相应的体视学测试方法称为生物体视学（Biological Stereology）。生物体视学是体视学的一个分支。

体视学的理论基础涉及几何学、概率论、数理统计及曲线、

曲面、微积分和拓扑学理论等。对于体视学应用研究来说，无需考虑这些理论问题。尽管体视学理论较复杂，但由此导出的体视学计算公式却十分简单，任何有高中数学基础的人都能够自如地运用这些公式进行计算。在体视学应用研究中，重要的是注意这些公式的适用条件及正确分析和解释体视学测试结果及各种结果之间的关系。

定量反映二维图象特征的理论和方法为平面测量学 (Planimetry)。平面测量是体视学推论的基础。注意不要将体视学与形态测量学 (Morphometry) 相混淆。从狭义上来说形态测量学包括平面测量学和体视学，广义上讲它还包括形态结构要素计数分析，如核分裂计数等。甚至显微分光光度术、流式细胞测密术等都可纳入形态测量学范畴。

体视学参数包括密度参数、尺寸参数、形状参数、分布参数及其它一些参数。密度参数包括体积密度 (V_V)、表面积密度 (S_V)、长度密度 (L_V)、曲度密度 (K_V) 和数密度 (N_V) 等；尺寸参数包括粒子的平均直径 ($\bar{D}$)、平均体积 ($\bar{V}$)、器官体积 (V_o)、平均截距 ($\bar{l}_0$) 和屏障厚度 (τ) 等；形状参数包括粒子的表面积与体积比 (R_{sv})、轴比 (R_{ab})、球度 (S_g)、平均曲度 ($\bar{K}$)、平均表面积 ($\bar{s}$) 等；分布参数包括粒子间的平均自由程 (λ)、平均中心距离 ($\bar{z}$)、粒子分散度 (C_{xz}) 和最近邻距离 (Δ_s) 等；其它参数还有总体积 (V)、总表面积 (S)、粒子总数 (N_x) 等。

在体视学上把包含结构成份的某一空间定义为包容空间 (Containing Space)。例如，在细胞中，线粒体、溶酶体、核等是结构成份。细胞包含了这些结构成份，因此细胞可作为这些结构成份的包容空间。包容空间不是固定不变的，它可根据研究目的需要选定。组织、器官等都可作为包容空间。体视学上所指结构成份应具有一定形态，不包括化学成份。包容空间也叫参照

系 (Reference System)，但两者不完全相同，参照系可以是三维，也可以是二维或一维，但包容空间一般指三维。本质相同的结构成份的集合称为相 (Phase)，例如一个细胞中所有的线粒体就构成该细胞的线粒体相。密度 (Density) 是指单位参照系中包含某相体积、表面积、面积、长度或数量等的量，如体积密度是指单位体积中X相的体积，数密度指单位体积中X相的粒子数等等。当结构成份是由许多离散的能作为单元独立存在的要素组成时，则称这些要素为粒子 (Particle)，如腺体、细胞、核、线粒体等都可当作粒子。粒子形状有凸面体和凹面体之分，当穿过粒子的任意一条直线只形成一条弦 (Chord) 或一条截线 (Intercept)，或在切过该粒子的任意一张切片上只形成一个截面，则称这类粒子为凸面体 (Convex)，否则为凹面体 (Concave)。一次切割组织产生的平面称为切面 (Section)，如石蜡包埋的组织经刀切后组织块表面即为切面。切片 (Slice) 是由两次平行的有限间隔切割组织后产生的。截面 (Profile) 是指切片或切面中的独立成份或结构 (图 1-1)。截距 (Intercept) 是指测试线落在截面内的截线长度 (图 1-2)。测试线与截面边界的相交点称为交点 (Intersection 图 1-3)。

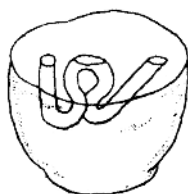


图1-1 截面

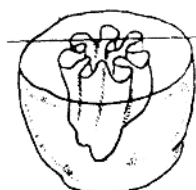


图1-2 截距

在体视学参数中，密度参数是用由两个字母组成的双符号来表示。第一个字母大写，表示密度参数总类；第二个字母通常以下标形式写出，代表包容空间，表明这个参数属密度参数。例

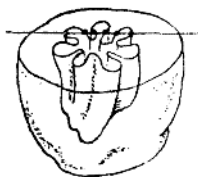


图1-3 测点

推。本书各符号的体视学含意见附录1。

如， V_v 表示体积密度。有时在第二个字母后再跟一个下标字母以表示为某种结构成份的密度参数，如 V_{vX} 表示 X 相粒子的体积密度。有时结构成份和包容空间都用下标字母标出，隔以逗号，跟在第二个字母后，如用 m_i 表示线粒体， c 表示细胞，则 $V_{v(m_i,c)}$ 表示细胞中线粒体的体积密度，以此类推。

二、体视学的诞生与发展

体视学是近20年来迅速发展起来的一门新兴边缘学科。它的产生可以追逆到19世纪中叶。1848年，法国地质学家 Delesse 在研究岩矿的过程中通过积分推导首先证明某一结构成份在平面中的面积密度 (A_A) 等于其在三维结构中的体密度 V_v ，即 $A_A = V_v$ 。1898年及1930年，生物学家又相继证明了 $A_A = L_L$ 及 $V_v = P_P$ 。 L_L 指单位测试线上的截线长度，即线密度； P_P 指单位测试点中落在测试结构成份上的测试点数，即点密度。这一现在看来是体视学中最简单和最基本的公式，差不多经历了一百年才得以完成。自本世纪20年代起，一些冶金学家和矿物学家开始应用体视学方法进行研究，一些数学家也一起参加开拓和发展体视学原理和方法。从1848年到1961年，体视学虽然在逐渐地发展并得到应用，但还没有形成一个完整的体系。1961年5月12日由 Elias 在德国 Neustadt Schwarzwald 召集的一次只有十几人参加的非正式国际会议上首次使用了 Stereology 这个词。参加这次会议的只有几个生物学家和数学家，但这次会议立即引起了一些冶金学家、材料学家和矿物学家等的注意。两年后，即1963年在维也纳召开了第

一届国际体视学会议，並正式成立了国际体视学学会（International Society for Stereology, ISS），标志着“体视学”作为一门系统学科正式诞生。自1963年之后的20多年中，体视学有了很大的发展，特别是随着电子计算机的普及和图象分析仪的问世，体视学原理、技术应用、测试设备研制等都取得了长足的进步。至1987止年，国际上已召开了七届国际体视学会议。1991年将在美国召开第八届国际体视学会议。ISS于1962年开始出版《Streologica》杂志，1936年因故停刊。1939年，英国皇家显微镜学会的会刊更名为《Journal of Microscopy》，並成为ISS的正式会刊（为两个学会共用）。ISS于1982年开始出版《Acta Stereologica》杂志。

我国自60年代起，一些高等院校、研究单位和工厂开始引用体视学技术。70年代末，我国相继引进了大型自动图象分析仪，国内体视学研究日趋活跃。1981年至1987年由成都工具研究所、中国医学科学院、云南大学相继主持召开了四届全国体视学和图象分析学术会议，在此期间成立了中国体视学学会筹委会。1988年在北京由军事医学科学院主持召开了第五届中国体视学及图象分析学术会议，並正式成立了中国体视学学会（Chinese Society for Stereology, CSS）和中国生物医学体视学学会（Chinese Biomedical Society for Stereology, CBSS）。中国体视学学会现已出版2期《体视学通讯》及一册《体视学译文集》，现正在筹备出版《中国体视学杂志》。我国目前已具有一支相当规模的从事体视学及图象分析工作的队伍，但在体视学研究方面大多为应用研究，基本原理和方法研究较少，与国外相差还较大。

三、形态观察中的错觉

形态描述是生物形态学研究中惯用的方法，虽然能解决不少

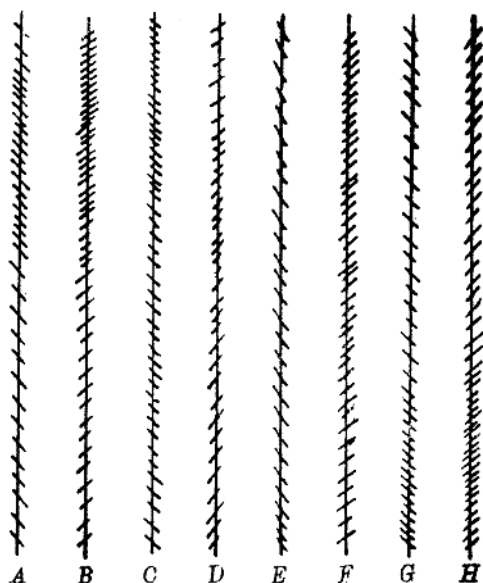
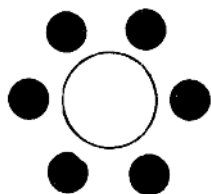
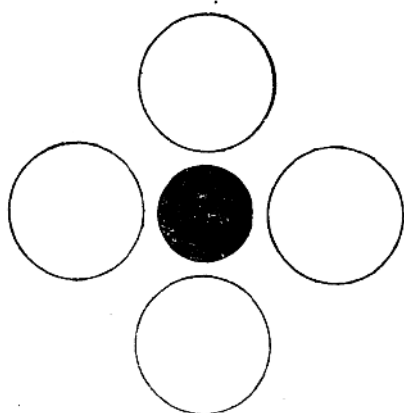


图 1-4 佐勒错觉

研究问题，但还存在不少缺陷。形态描述带有一定主观性。数量概念模糊，而且由于各种错觉的作用，有时会得出完全错误的结论。如图 1—4，由于短线的干扰，往往会认为 A、B、C、D、E、F、G、H 这些相互平行的直线是不平行而且是弯曲的，这种错觉称为佐勒错觉。图 1—5，a、b 两图中的中央圆似乎是 a 大、b 小，其实两中央圆直径完全相等，只是由于圆的颜色深浅不同，及周围圆的大小不同，与中央圆的对比作用不同，造成上述错觉。这种错觉称为埃宾豪斯错觉。在图 1—6 中，左图很容易认为 a 比 b 不等，其实不然，a、b 是等量的。右图中同心圆上方框的边长似



a



b

图1-5 埃宾豪斯错觉

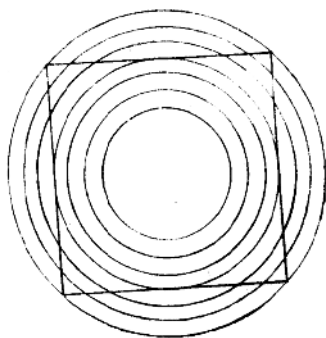
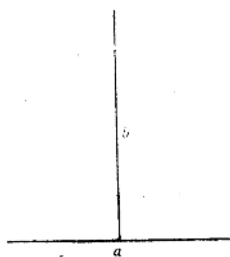
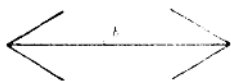
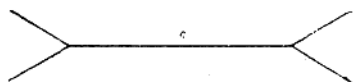


图1-6 形态观察中的错觉

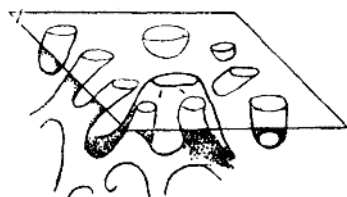


图 1-7 三维结构与二维截面的联系

乎是曲线,其实为直线,构成正方形。对于二维切片中的圆形结构,不一定意味着其三维结构为球体,它可能是球体,也可能是椭球、圆管状结构或不规则结构等。切面为椭圆的粒子,其三维结

构可能是椭球、管状结构,凹面体或不规则结构等(图 1—7)。

所以,“我们应当从这里得出一条经验,就是不要被假象所迷惑。……一切事物,它的现象同它的本质之间是有矛盾的。人们必须通过对现象的分析和研究,才能了解到事物的本质,因此需要有科学。不然,用直觉一看就看出本质来,还要科学干什么?还要研究干什么?所以要研究,就是因为现象同本质之间有矛盾。但假象跟一般现象有区别,因为它是假象。”(毛泽东)

四、体视学在生物医学中的应用

生物医学是采用数学方法最少的学科之一。在以往的生物形态学研究中,基本上都采用定性描述方法,这无疑与形态定量方法发展缓慢、不够普及有一定关系。当今,随着整个科学的发展,随着电子计算机的普及、图象分析仪器的产生和体视学原理、方法的发展等,生物形态研究正由定性向定量、由二维向三维方向发展,充分展现了体视学发展和应用的广阔前景。

(一) 定量阐明组织的三维结构

传统的形态研究方法容易使人们对组织结构的认识局限在二维空间,并且缺乏组织结构的数量概念。应用体视学方法能使人们从三维水平定量地阐明组织、细胞结构。例如,细胞中线粒体的体密度能反映出线粒体相对体积大小,线粒体数密度反映了线