

374156

体视学与细胞形态计量分析

Stereology and Cell Morphometry

唐 外 星

刘 大 冲

赠
阅
书
馆



湖 南 医 学 院 电 镜 室

一 九 八 七 年 十 月

Q241WX

说 明

体视学，作为形态学研究的主要方法之一在我国医学生物界的应用仅几年历史。国内绝大多数高等医学院校尚未开设此课，当然，也没有相应的医用体视学教材。

我们撰写“体视学与细胞形态计量分析”一文是在部分科研工作的基础上，整理综述有关文献而完成的。试图作为87级研究生开设体视学课的暂行参考资料。文中部分内容又要参加省测试学会进行交流。

目前，这门新兴学科还很不普及，研究水平距欧美发达国家甚远。作者的意愿是本文能起到抛砖引玉的作用，使读者阅后有所裨益。

由于我们理论专业水平不高，对新学科的引进和消化还需要花更大的气力，许多理论问题和具体做法尚需在继续探索中才能解决，加上文献资料十分有限，文章中缺点和错误在所难免，对此，谨求大家批评指正。

在撰写过程中，承蒙本室主任彭隆祥副教授多方支持和热忱关照，特此鸣谢！

作 者

1987·10

体视学与细胞形态计量分析

Stereology and Cell Morphometry

湖南医学院电镜室

唐外星

刘大冲

内容提要：作者从五个方面介绍了体视学的相关理论及其发展。在理清体视学的基本概念及其研究内容的前提下，从实用出发，着重阐明医学上感兴趣的几个特征参数的计算及意义，并介绍了近年来医学领域应用体视学的一些实例，考虑到图像分析仪在我国的发展和运用，本文也作了部分叙述。

目 录

前 言.....	1
一、体视学的基本概念及其发展.....	2
二、体视学运用中的一般性问题.....	3
三、常用特征参数的意义及计算.....	7
四、形态计量学在医学中的应用.....	17
五、图像分析仪导论.....	21

在医学领域里，形态学的出现算得上是最古老的学科之一。尽管其发展经历了整体水平（肉眼观察），细胞水平（光镜观察）到目前的超微结构水平（电镜观察）及亚分子及分子水平，但对于细胞形态研究的基本“轴心”没有改变。这就是说，随着科学技术的日新月异，研究手段愈来愈先进，然而，所有这一切都是采用定性描述的方法，甚至只是对切片的二维图象进行“镜下所见”的描述。

长期以来，形态学工作者早以意识到这种方法既客观，又不客观，既具体又片面，加上人眼观察误差等因素，所得结果可塑性大，而且有时会发生错误。

纵观当今形态学发展趋势：免疫组织细胞定性定量分析技术，使细胞研究迈进生物分子水平；对细胞超微结构的观察，尤其是超高压电镜的生物学应用，使活体细胞的生物分子结构的分析成为现实；近年来，体视学在医学领域的移植，使经典的形态学观察方法从平面走向立体，从二维图像归还三维结构空间，实现了细胞形态定性研究向定量发展的过渡。并已逐步形成一门新兴学科，受到越来越多的人的瞩目和关注。

一、体视学的基本概念及其发展

体视学（Stereology）又称立体学。是一门既年轻而又古老的方法学科。它起源于二千多年前的天象观察；基本原理是十九世纪法国地质学家Delesse和英国显微镜学家Sorby各自在几何概率论和拓朴学基础上提出的。

Elias等人于1961年在一次只有十几个人参加的非正式国际会议上，首先提出体视学（Stereology）一词，并给体视学定义为：“体视学是建立从组织的截面所获得的二维测量值与描述这组织的二维参数之间关系的数学方法的科学”。简单地讲体视学的概念是二维图像的三维解释或二维空间的三维推断。

和体视学原理有关的最早解决的一个几何概率问题（所谓Buffon原理）是1877年完成的。这一原理的起源，还可追溯到

没有任何现在的体视学，而只在100多年后才了解到它的意义。在1847年由生物学家证明了 $V_V = A_A$ 后到1898年及1930年也由生物学家证明了 $A_A = L_L$ 及 $V_V = P_P$ 。这些现在被认为是体视学中最简单的最基本的公式，差不多经历了100多年才得以完成。

体视学的基本理论最先应用于冶金学和矿物学，它涉及统计学、几何概率、曲线及曲面等理论，本世纪二十年代数学家也加入到逐渐开拓和发展体视学原理的行列。目前，在体视学的基础上一门新兴学科数学形态学也随之产生。但是，直至1961年以前，还没有建立完整的体视学系统。

继Elias等1961年创立体视学一词后的两年，国际体视学会(The International Society for Stereology, 简称ISS)于1963年5月正式成立，体视学方法在冶金学、材料科学和矿物学中的应用占据重要地位。与此同时，一些欧美国家学者陆续将金属学中对金属结构的分析方法及地质学中对岩石矿物的分析方法引入到生物组织及细胞结构成分的分析中来，尽管这些领域研究方向不同，但观察的对象都是物体的剖面，得到的是二维图像，这就为体视学移植医学生物学领域奠定了理论基础。

用体视学原理分析细胞二维图像推断三维空间的方法就是细胞形态计量学(Cell Morphometry)。从六十年代到今天，ISS会议每四年召开一次，今年9月在联邦德国，召开了第七次国际体视学会议，从历次会议论文来看，体视学在医学上的广泛应用还是在80年代后才开始。但近几年发展迅速，并成为形态学研究前景的一种必然趋势。

体视学虽然经历了二十多年的发展，目前日趋完善，但毕竟是一门新兴学科，迄今许多字典中仍无体视学一词的一席之地，尤其是医学生物学领域认识的人们还不多。在我国，虽然60年代就有一些工厂和科研单位也相继地引用一些体视学基本方法，但只限于最简单的情况，全国先后召开了四次体视学及图像分析仪学术会议，今年9月18日至9月24日在云南昆明召开了中国第四届体视学论文研讨会，与会代表132人，来自全国冶金、矿物、金属材料，

生物、医学、能源、环保、气象、水产、农业等各个学科，共收集论文80多篇，医学生物学论文占半数以上，大会发言及分组交流论文42篇，英国剑桥仪器公司Jenkinson博士作了图像分析仪Q-970和Q-520专题学术报告。这表明我国体视学的发展进入了一个新阶段。中国体视学会已定于明年正式在北京成立，并每年举行一次全国性学术会议。

二、体视学实际运用中的一般性问题

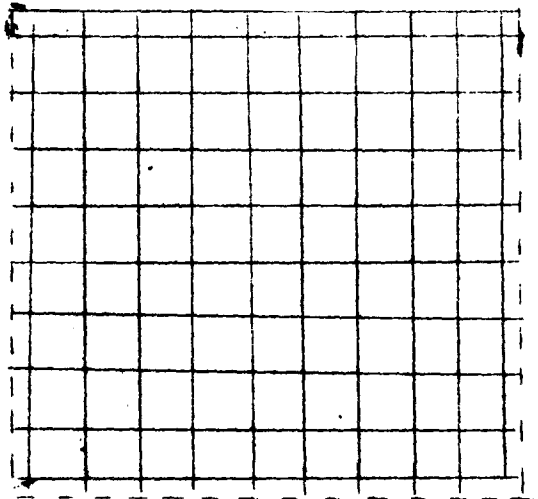
(一) 测试格

体视学建立细胞形态的三维空间所需要的参数是从二维图像上获得，索取这些参数的方法尽管目前可用图像分析仪数十倍高于手工点计算法，但真正实用还是后者，这是因为图像分析仪（如Q-970、Q-520）不仅造价昂贵，目前国内难以普及，而且图像识别能力在生物医学材料上仍存在一些问题，尤其是电镜图片的识别往往不及人眼分析。

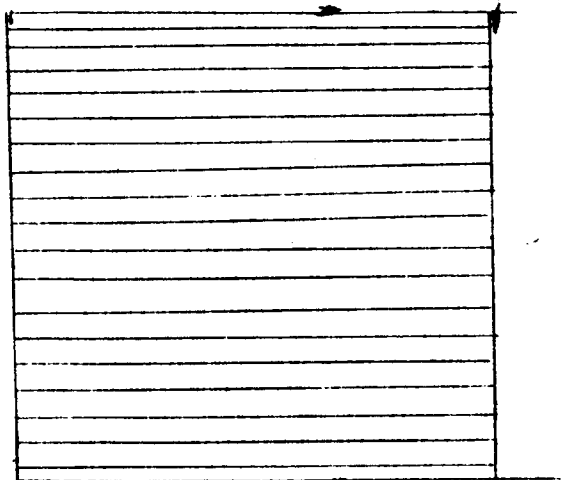
用于体视学测量用的工具叫测试格，它由透明胶片或塑料板制成，测试格的主要作用在于对一定数量的细胞光镜或电镜图像（所包含的二维信息作点、线、面数量测定，而后按体视学公式运算，便可用表面积、体积、长度、厚度、数量、大小分布等十几种参数来描述有关细胞器的特征。

测试格制备要求依研究主题不同而定，换句话说测试格的设计，网孔大小一般根据要测的结构不同而相应变化。目前常用的有下列7种。

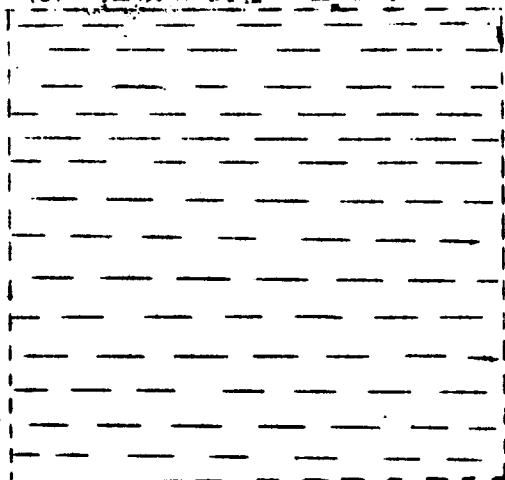
(1) 正方形测试格（图1）



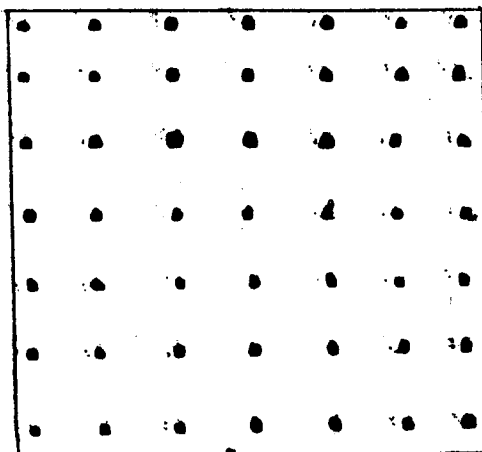
(2) 平行线测试格 (图 2)



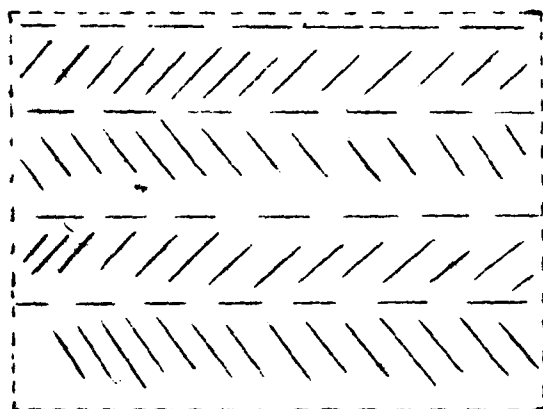
(3) 短线测试格 (图 3)



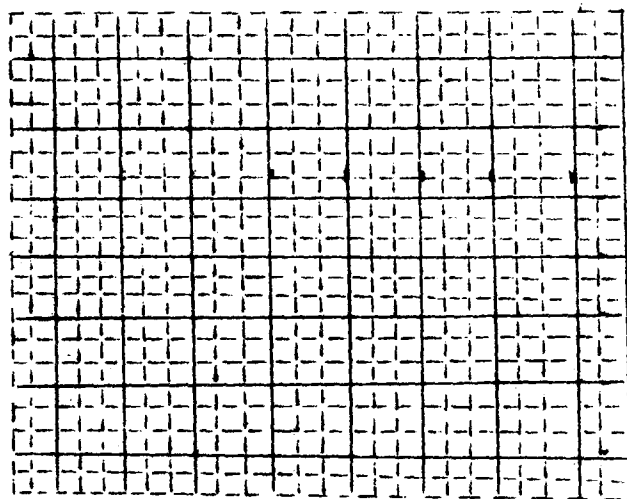
(4) 点测试格 (图 4)



(5) 三向短丝格 (图 5)



(6) 双套正方测试格 (图 6)



(7) 曲线测试格 (图 7)

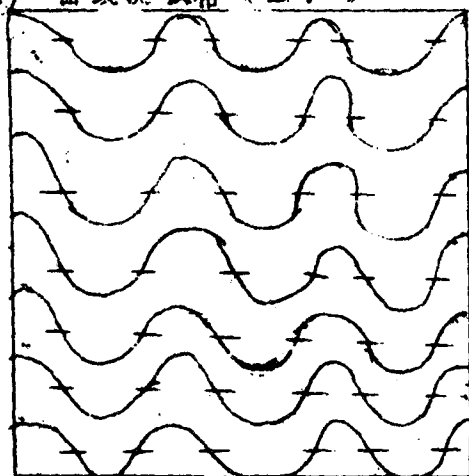


表 I

7 种测试格的主要用途及特点

测试格	主要用途和特点
正方形测试格	为目前广泛使用的测试格, 可用于点、线、面分析
平行线测试格	主要用于曲线长的测量等
短线测试格	应用范围广, 测试交点数时计算方便, 但方向性很强, 不宜于测量有优势取向的曲线。
点阵测试格	测定某结构显示某种周期性排列时较好, 但计算误差较大, 因此可增加随机点数目以及旋转测试格与照片的重叠方向, 以两次以上的测试比值为准。
三向短线格	用在曲线长的测量时, 能得到较准确的结果, 避免了短线格的取向性。
半圆曲线测试格	对于某些各向异性结构切片的电镜图像, 此测试格有其长处。
双套正方测试格	可在一张照片上测试大颗粒, 也可以: 小颗粒, 用途比正方形测试格广。

(二) 最佳取样效率及照片拍摄

早在 1966 年, Weibel 曾探讨了细胞形态立体学定量分析结果的精确度与三级实验样本数 (包埋块或切片数 n_1 ; 摄片视野数 n_2 , 测试点数 n_3) 的密切关系。为了减小平均统计差异, 以增加 n_1 为优, n_2 次之, n_3 效果最差。但是三者的相对单位综合费用是 0.5 : 0.3 : 0.001 弱, 因此, 较高级别取样数的增加应该根据研究课题的需要, 同时考虑到费用的开支问题。

对于实验动物的最佳选用数 n_0 , shay (1975) 作了较详细的论述, 其结果可归纳为下列公式:

$$n_0 = C \cdot S_0^2 / d^2$$

式中 S_0 为标准差; d 为要求检测的差别; C 值与显著性界限

和把握度 α 。

在实际研究中，人们往往不去计算精确的各级实验样本数，在遵循上述原则的前提下，动物只数尽可能年龄、性别、体重接近，每组最少5只左右，如用电镜观察，每只动物标本包埋块5~10块，每个包埋块切片后选两张电镜照片即可，从而照片总数大于30张以上，符合统计学取样原则。

在拍摄照片时有两点要十分注意，一是照片要有代表性，比如说本课题是研究心肌细胞在缺氧时线粒体的改变，所拍摄的照片必须是细胞质中有代表性的线粒体而不要拍个别异型的线粒体，二是选取视野的随机性，不能带有主观意向，如上所述，线粒体在胞质中的分布肯定不均匀，不能只拍摄线粒体多的部位或只拍线粒体数目少的部位。

摄拍照片所产生的误差不是由于面积测量产生的误差而是由于细胞及细胞截面间的差异所造成的误差，即照片之间的差异而形成的统计差异，因此增加照片数比增加每张照片上的测试点数更有意义。

(三) 测试格网孔的大小

以正方形测试格为例，被测结构的大小原则上应与测试格网孔的大小相匹配。被测结构以颗粒截面为代表，单个颗粒的截面积以 S 表示，网孔的面积即测试格常数 a ($a = \frac{A_t}{P_t} = I^2$)。当 $a \ll S$ 时，从概率上讲被测数据准确性高，但工作量大，事实上体视学计算值是一组数据的平均值，这种烦琐费时的劳动也没有必要，若网孔很大， $a \gg S$ ，则颗粒很容易被漏测，误差很大。

三、常用特征参数的意义及计算

体视学原理涉及与任何三维空间图像定量分析有关的理论基础实验技术，有关仪器设计制造，以及在材料、生物等任何与三维图像定量分析有关的各领域中的应用。由于数学、电子计算机、图像分析仪及有关学科的发展，过去被认为是复杂的数学计算而今变得简便实用。进行细胞形态定量分析是直接最办法的借助图像分析仪进行处理。在条件不具备的时候可把体视学运算的公式编成计算机程序，按实验需要自制适当的测试系统 (test systems)，对一

定量量的细胞电镜图像或光镜照片所包含的二维信息作点、线、面数学测定，而后在满足体视学公式运算的前提下，输入计算机便可用表面积、体积、长度、厚度、数量、大小分布等十几种参数来描述有关细胞器的特征，并可用周长、直径、体积等描述细胞的三维结构特点。

很显然，细胞图像的计量分析是建立在二维图象的基础上的，也就是说实现（定性分析向定量转化），但是二维图象与三维图象都是通过切片来完成的，切片上所见的细胞及细胞器仅占有一定的面积，但实际上应该是占有一定的体积，此外，三维结构中的面积（如R面R）在二维图象上则变成了线，还有三维结构中的线（如微丝）在二维图象中则以点的形式出现。这表明二维图象中的维数比三维图象的维数减1，如何把二维图象中的面积转换成体积，把线转换成面积，把点转换成线，这就是体视学研究的主要内容。此外，同一长椭球的线粒体在二维图象上可有不同的形态，其数目也并非真正代表细胞内线粒体的数目。

应当明确体视学作为一种方法把细胞二维平面形态转换成三维立体结构不是图象转换，而是参数转换。它的任务是从 $n-1$ 维图象推论出其 n 维结构，即通过测量平面图象上的有关数据，运用数学方法确定其立体结构特征。所谓组织参数，不外乎是点、线、面、体等基本元素。

有人怀疑细胞形态大小不一，形状也不规则，形态计量是否可行？的确这种计量不是单个细胞的量而是一个细胞群体的量，即求这个群体的平均值。体视学所讨论的组织参数是统计性的，所以，组织参数的精确性取决于测量次数。为了在要求的一定置信水平下有较小的置信区间，则必须有较大的测量量。

下面着重介绍特征参数的意义和基本公式，但略去其来源和推导过程：

1、体密度 (Volume density)

(1) 定义 体密度是表示结构体积在参照系 (reference system) 体积中占有的相对大小的结构参数。它的定义是：某一结构的体积 V_x 与它所在的参照系体积 V_r 之比。所谓参照系的概

念。一般说来是指在体积的相对测量时所参比的大结构。例如：要测量细胞核和细胞质的体积分数则选用整个细胞作为其参照系。对于细胞核内各种结构成分（核仁、异染色质、常染色质、核小体等）测量，可取整个细胞核为参照系。又如测量细胞内各种结构成分（内质网、线粒体、微丝、脂滴、糖原、分泌颗粒）则可取整个细胞质为参照系。假如要测量整个细胞的参数，也可以把组织作为参照系。体密度用 V_v 表示。

(2) 原理：要研究在某一参照系内待测结构成份体积所占的份数，可以通过测量其切片象上的面积来求得，即体密度的面分析。由于面积的测量可以转化为线长的测量和测试点来测量，故 V_v 又有线分析法和点分析法，在实际工作中，点分析法比较常用。

$$V_v = \frac{V_x}{V_r} = \frac{A_x}{A_r}$$

上述公式把体积的测量转变为面积的测量，但必须注意以下诸点：(1) 细胞观察通常是切片。因此，只有在切片很薄时，上述公式才可以成立。(2) 细胞的不同截面上结构是有差异的，而且同一细胞群体的各细胞之间也有差别。因此必须随机拍摄大量不同细胞不同截面的照片，相当于把一个理想的平均细胞从不同方向不同深度进行切片，然后对所得照片进行测量与统计，才能得出可靠的结果。故上述公式实际应用时应该是：

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n A_{xi}}{\sum_{i=1}^n A_{ri}}$$

(注：照片张数为 n ， $i = 1, 2, 3, \dots, n$)

(3) 某一参照系中待测物成分的体密度 V_x 等于某切片象上的面

积密度 (A x), 这个结论是 1846 年法国地质学家 Deless 首先得出的。现在一般叫做 Deless 原理。(4) 所得结果是几张照片体密度的平均值。

用图象分析仪直接测量面积是很容易的, 但有时照片中各结构的识别也比较困难, 在没有这种设备的情况下, 可用自制的测试格进行线分析或点分析。同样可以获得理想的结果。

体密度的线分析公式:

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n L_{xi}}{\sum_{i=1}^n L_{ri}}$$

体密度的点分析公式:

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n P_{xi}}{\sum_{i=1}^n P_{ri}}$$

点分析方法十分简便。只要在照片上数一数相应的测试点数目, 就可以算出体密度。

(3) 医学运用 体密度 (V v) 这一参数十分有用, 在生理情况下它可以描述细胞的基本结构特征, 如颗粒的大小、核浆比例以及各细胞器所占的体积份数。一旦发生病变, 如肿瘤、缺血、细胞水肿等情况下, 细胞的形态发生变化, 通过分别求出其全套体密度数据, 然后定量地加以比较, 则可获得病变累及的主要结构及这种结构变化的情况。与单纯的切片观察、描述的多、少、大、小来比, 它既科学又精确, 而且结论严谨得多。

2、面密度 (Surface density)

(1) 定义：表示膜表面积相对于参照系体积的多少的结构参数，称为面密度 (S_v)。它的定义为：某一膜结构的面积 S_x 与它所在的参照系各体积 V_r 之比，也就是说在参照系平均每单位体积内某种膜结构所具有的面积。面密度用 S_v 表示。

(2) 原理：在参照系各体积膜 (V_r) 中待测物结构膜面积 (S_x)。其切片象为一轮廓线。要研究该物成份的膜面积 (S_x) 可通过测量其轮廓线长度。(即在参照系各截面 A_r 中，膜的截线长为 (B_x) 来求得。参照系各单位面积上的截线长 B_A 等于膜的截线长 B_x 与参照系各面积 (A_r) 比 (公式： $B_A = \frac{B_x}{A_r}$)， B_A 越大。

$$\frac{B_x}{A_r}$$

表示面密度 S_v 越大。即 S_v 与 B_A 成正比，比例系数为 $\frac{4}{\pi}$

数学推导证明：

$$S_v = \frac{4}{\pi} B_A$$

除了上述运用测膜的截线长 B_x 和参照系各面积 A_r 计算 B_A 即可可求出 S_v 外， B_A 的测量还可通过测单位测试线长度内的交点数 (I_L) 求得，即面密度等于参照系内测试线单位长度上的膜截线与测试的交叉点 I_L 的 2 倍。

$$\text{即：} S_v = 2 I_L$$

若参照系各截面中的测试线长的 L_r ，测试点数为 P_r ，则应有 $L_r = Z P_r$ 。如果膜的截线与测试线的交点数为 I_x ，则

$$I_L = \frac{I_x}{L_r} = \frac{I_x}{Z P_r}$$

将此式代入 $S_v = 2 I_L$

$$\text{得：} S_v = \frac{2 I_x}{Z P_r}$$

该式是点计数法使用公式，此式表明只要数出参照系各内的测试点数 P_r 及膜截面与测试线的交点数 I_x ，就可算出面密度 S_v 。 Z 的值随所使用的测试格的不同而不同。 S_v 的单位取决于 Z 采用的单位。

如同体密度一样，测算面密度如果以一张照片为样本的一个单位，样本自然由几张照片组成，故实际测算 S_v 的计算式为：

$$S_v = \frac{\frac{4}{\pi} \frac{\sum_{i=1}^n B_{xi}}{n}}{\frac{\sum_{i=1}^n A_{ri}}{n}} = \frac{2}{Z} \frac{\sum_{i=1}^n I_{xi}}{\frac{\sum_{i=1}^n P_{ri}}{n}}$$

前等式用于图象分析仪，后等式用于点计数法。

(3) 医学应用：细胞中的膜结构包括质膜、核膜、粗面内质网与滑面内质网的膜，线粒体的外膜，内膜与山脊、溶酶体、微体及各种小泡的表面膜等。在细胞形态研究中，膜面积的大小及其在不同情况下的变化，对于细胞功能的分析是很有意义的，例如脑急性缺血再灌注损伤时，海马 CA_1 区锥体细胞中粗面内质网的增生，对估价再灌注损伤病变很有价值。因而不论是研究正常细胞（如核、线粒体，神经递质囊、泡，分泌小滴等）机能与结构的关系，还是病理状态细胞损伤特点，膜结构的形态定量分析都有十分重要的作用。

3、比表面 (Specific surface)

(1) 定义：比表面是指某一成份的膜面积与其体积之比等于其面密度 (S_x) 与体密度 (V_x) 之比。通俗地讲即待测结构本身每单位体积有多少表面积。即：

$$\delta = \frac{S_x}{V_x}$$

(2) 原理：比表面的测算只要已知体密度 V_v 和面密度 S_v 即可求得，反之，若已知 V_v 和 δ ，也可求得 S_v 。比表面比较容易

从二维图象上测算，既可利用图象分析仪测出某一结构的平均周长（ $\overline{B_x}$ ）与平均面积（ $\overline{A_x}$ ）后，用下列公式算出：

$$\delta = \frac{4}{\pi} \frac{\sum_{i=1}^n B_{xi}}{n \sum_{i=1}^n A_{xi}} = \frac{4}{\pi} \frac{\overline{B_x}}{\overline{A_x}}$$

也可用手工点计数法式子求得：

$$\delta = \frac{\sum_{i=1}^n I_{xi}}{Z \sum_{i=1}^n P_{xi}}$$

(3) 医学应用：除了用面密度（ S_v ）测算细胞及其膜性结构外，比表面是对这些结构定量的另一个重要参数。尤其是当细胞肿胀，线粒体水肿，内质网扩张等情况下，这个参数很有用。不难理解小球与大球相比，小球的比表面大而大球的比表面小。红细胞呈双凹圆盘形，与同体积或同表面积的球相比，其比表面积要大得多，这就有利于与周围的气体交换。线粒体或内质网扩张，其比表面变小，相反，细胞核固缩，其表面变大。

4. 颗粒的圆球度 (Sphericity)

定义 颗粒与圆球相差的程度称圆球度。这里讨论的颗粒，主要是指细胞中较大的亚微颗粒，如线粒体、溶酶体、微体、脂滴，分泌颗粒及直径大于超薄切片厚度的囊泡、细胞及细胞核也可以看作组织中的颗粒。一般说来颗粒是圆球形的，其圆球度为1，非球形时圆球度小于1，偏离圆球越远，与1相差越大。

原理：圆球度（ ϕ ）是表示颗粒形状的参数，从圆球度测算式子。

$$\phi = \frac{\delta_s}{\delta}$$

不难看出：颗粒的圆球度为与颗粒截面平均周长相同的等效球的比表面 δ_s 和颗粒本身的比表面 δ 之比。所谓等效球 (equivalent sphere) 即颗粒截面平均周长 $\overline{B_x}$ 相同的球。在二维图象上无论是什么形状的颗粒，都可以求出其比表面 δ ，但要求出 δ ，颗粒截面的平均面积 $\overline{A_x}$ 及平均周长 $\overline{B_x}$ 必须找出，由于 $\overline{A_x}$ 及 $\overline{B_x}$ 均是二维图象上的参数，因此 ϕ 可以直接从二维图像上测算得出。这样，无论颗粒的形状是否规则，都可以得到圆球度这个参数。

$$\phi = \frac{3 \pi^2 \overline{A_x}}{8 \overline{B_x}^2}$$

(3) 医学应用： ϕ 这个参数可以帮助确定颗粒的具体形状，如从图形上判断一种细胞是多面体形的，但究竟是哪一种多面体难以确定。当测算出圆球度后，就可以找到最接近的一种多面体。

5. 颗粒的平均外径与平均体积 (mean tangent diameter and mean caliper diameter)

(1) 定义：表示颗粒大小的体视学参数有两个，一是平均外径，另一个是平均体积。所谓平均外径就是想象用两个平行平面或卡尺去量颗粒的外径，从不同的方向量得的外径不同，将这些外径平均，即为平均外径。而平均体积的概念是好理解的。

(2) 原理：颗粒平均外径的测量在二维图像上测很麻烦，如通过间接方法则就比较容易了，测量方法有三：(1) 截距法。即在测试格上量出测试格线在颗粒截面的长度，也就是测出颗粒与测试线相截的截距，因为颗粒的平均外径 ($\overline{D}$) 与平均截距 $\overline{l}$ 有成正比的关系 ($\overline{D} \propto \overline{l}$)

$$\text{故 } \overline{D} = f d \overline{l}$$

该式中比例系数 $f d$ (shape factor) 为颗粒形状因子。它只与颗粒的形状有关， $f d$ 可查表获得。(2) 比表面法，该方法比截距法简单，因为比表面的求得是用点分析，比表面与平均截