

举一例介绍光学分合法用于估计器官内细胞总数

何琦¹, 唐勇², 杨正伟³

(1. 川北医学院基础医学研究中心人体解剖学教研室, 四川 南充 637000; 2. 重庆医科大学组织学与胚胎学教研室, 重庆 渝中 400016; 3. 川北医学院形态定量研究室, 四川 南充 637000)

【摘要】 为推广光学分合法, 一种常用于估计器官组织内细胞总数的光学体视框与分合法相结合的无偏体视学方法, 本文举一例介绍了其在神经元总数估计中的应用。获得一侧成年小鼠海马结构齿状回 (DG 区) 的连续冰冻切片, 等距随机抽选其中 1/5 的切片 (共抽得 14 张), 用免疫组织化学染色结合甲酚紫复染显示 DCX 阳性神经元, 观测切片上的整个 DG 区, 用光学体视框计数 15 μm 厚度的切片组织里 DCX 阳性神经元的胞体, 同时用指针测微计测量切片组织的实际厚度。结果数到 291 个神经元 (胞体), 测得切片平均厚度为 24.22 μm。因此, 根据光学分合法, 该侧海马 DG 区 DCX 阳性神经元的总数为: $291 \times (5/1) \times (24.22/15) = 2\,439$ 。结合这个实例, 本文较详细地讨论了光学分合法的理论基础和实践相关问题。

【关键词】 光学分合法; 海马; 神经元; 数量; 体视学

【中图分类号】 R329 **【文献标志码】** A

Use of the optical fractionator (unbiased stereological method) exemplified by total number estimation of cells in an organ

HE Qi¹, TANG Yong², YANG Zheng-wei³

(1. Department of Human Anatomy, Research Center of Basic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan; 2. Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 3. Morphometric Research Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 For promotion of the optical fractionator, an unbiased stereological method of the optical disector combined with the fractionator that is commonly used to estimate the total number of cells in an organ (tissue), the present article exemplified its use in a total number estimation of neurons. Serial frozen sections of the dentate gyrus (DG region) of the hippocampal formation on one side were obtained from an adult mouse, 1/5 of the sections were sampled in a systematic random manner, with 14 sections being sampled. The sections were stained using an immunohistochemical method and counterstained with cresyl violet to show DCX-positive neurons. The whole DG regions were observed and the somas (cell bodies) of DCX-positive neurons were counted within 15 μm (thickness) of the section tissue with the optical disector, meanwhile the actual thickness of the section tissue was measured with a microcator. As a result, 291 neurons (somas) were counted and the average of measured section thicknesses was 24.22 μm. Therefore, according to the optical fractionator, the total number of DCX-positive neurons in the hippocampal DG region was: $291 \times (5/1) \times (24.22/15) = 2,439$. With this example, we discussed in more details about the theoretical foundation and practice-related issues of the optical fractionator.

【Key words】 Optical fractionator; Hippocampus; Neurons; Number; Stereology

细胞是生物器官组织的基本结构与功能单位。通常每个细胞有且只有一个细胞核。细胞 (核) 的生理、病理变化常伴有其形状、大小的改变, 但更常观测的是其数量的改变, 它反映了其在所属器官组织的总的生存 (增生或减少) 与功能状态。

估计器官组织内细胞 (核) 或其它粒子 (例如肾小球、阳性突触素颗粒等) 数量的基本方法是体视学方法^[1-3]。细胞核的直径多为几微米, 整个细胞 (胞体) 的直径少有 >40 μm 的 (个别细胞除外), 因

此人们多用光学体视框 (optical disector) 在较厚的单张切片 (厚度 10 ~ 40 μm) 组织内直接计数细胞核、细胞 (胞体) 或比细胞核更小的粒子 (例如突触素颗粒) 以估计其数量, 而不用物理体视框 (physical disector) 在多张相邻连续切片之间计数粒子——这样计数粒子非常麻烦^[2-5]。[在一定面积的切片平面上计数细胞轮廓以估计细胞数密度的方法, 因为简便仍在流行, 但这种计数方法有偏差 (biased), 迟早会被无偏 (unbiased) 计数方法光学体视框所取

代^[3]。]估计细胞总数目前热门的无偏体视学方法是光学体视框与分合法(fractionator)相结合的光学分合法(optical fractionator)(图1),它有一个重要优点:不受组织处理所致组织体积变化的影响^[1-3,6-9]。这个方法虽已不算新,但在国内的应用仍然很少,可能与这种方法较难理解、实施或学会有一定关系。因此这里以一侧成年小鼠海马结构齿状回DCX阳性神经元的总数估计为例^[7],较详细地介绍光学分合法的具体操作、理论基础和实践相关问题,分享笔者的应用经验,希望能对光学分合法的推广和优化应用起到一定的作用。

1 实例方法与结果

1只正常成年雄性B6C3小鼠(体质量约为30g),经4%多聚甲醛灌注固定后取出一侧大脑半球(包含有海马结构),沿冠状平面方向作连续冰冻切片(切片机设定的切片厚度为50 μm),等距随机抽选其中1/5的切片,用免疫组织化学染色和甲酚紫复染显示双皮质素(DCX)阳性神经元^[7]。

运用体视学图像系统(丹麦Visiopharm公司的Visiopharm Integrator System),在屏幕上观测切片。先在低倍镜下圈定每张切片上海马结构的整个齿状回区域(DG区),然后用油镜(数值孔径1.40)观察测试视野,视野上叠加105 μm×79 μm长宽的Gundersen测框(即无偏计数框或禁线框),借助电脑辅助的机动载物台100%抽选DG区的所有视野(即把视野面积的抽样分数设定为100%,1个视野即1个测框区域),用光学体视框在15 μm厚度的切片组织里(相当于在105 μm×79 μm×15 μm长宽高的三维空间里)计数DCX阳性神经元胞体(一个胞体即一个神经元)^[3,5]。每个体视框的顶面都固定在切片上表面的下面3 μm处的聚焦平面。对于计数到神经元胞体的体视框(视野),大致每间隔一个视野就测量其所在区域的切片组织的实际厚度,即用电脑辅助的指针测微计测量并显示的切片上表面与下表面之间的间距^[3,5]。

结果:总共抽选到14张包含有海马DG区的切片,共有123个体视框数到DCX阳性神经元胞体,每个体视框数到1~10个(变异系数81.05%),总共数到291个。14张切片里各自数到1~43个神经元胞体,每张切片平均20.79个(变异系数71.84%)。共测了65个视野的切片厚度(实际厚度),结果为20~31 μm,平均24.22 μm(变异系数10.54%)。

因为课题组等距随机抽取的是1/5的切片——即切片的抽样分数为1/5,平均24.22 μm厚度的切

片里只计数了15 μm厚度的切片组织——即切片厚度的抽样分数为15/24.22,所以,根据光学分合法(图1),所测海马DG区的DCX阳性神经元(胞体)的总数为:数到的神经元数量×切片抽样分数的倒数×切片厚度抽样分数的倒数=291×(5/1)×(24.22/15)=2 439^[3,7]。

2 讨论

2.1 细胞辨认与计数

相对于整个细胞而言,细胞核的形状通常较规则,容易被普通染料(例如苏木精)染色,而且所染边界清晰,因此人们多通过计数细胞核来估计细胞数。对于有单个不规则细胞核、细胞核又有单个清晰核仁的细胞(例如Sertoli细胞),也可通过计数核仁来估计细胞数^[10]。不过要注意的是,个别细胞核内难免会另有1~2个染色质聚集的像核仁的区域,因此计数过程中要注意上下聚焦观察整个细胞核的情况,只计数核内最大、最清晰且更靠近核中心的那个核仁^[11]。

本文所举的例子,用了特殊染色(免疫组织化学染色结合甲酚紫复染)来显示特殊(包含特殊结构或化学物质、具有特殊功能)的神经元,清晰显示的是其胞体,胞体内染色较深的细胞质使细胞核的边界相对不清、辨认较难,因此该例是通过计数胞体来估计细胞数的^[7]。

2.2 实验设计

关于海马连续切片的方向,按照惯例课题组选择的是冠状切片,这是为了有利于海马各区的辨认,有利于获得更多的海马切片^[11]。

运用分合法的实验设计,本质是等距随机抽样,而且各级抽样(组织块、切片、视野等各阶段的抽样)都要求等距随机^[1-3]。该例中,由于小鼠海马小,课题组把整个海马完全切成了连续切片,然后等距随机抽选切片,没有涉及组织块抽样;由于DG区小,测量了整个DG区,也没有涉及视野抽样。即是说该例的实验设计没有或者说消除了组织块抽样和视野抽样的误差。课题组最后在一定厚度的切片组织里进行神经元计数,实际上也是抽样:沿垂直于切片平面的方向(Z轴)抽选一定厚度的切片组织来测量。严格按照分合法的要求,这最后一级的抽样也应该等距随机进行。但实际上课题组是固定在切片中间大部分的厚度区域进行神经元计数的。不得不承认,每个视野都在Z轴方向上进行等距随机抽样实际上难以实现,或者说可行性差;此外,切片上表面或下表面(附近)的神经元(轮廓)可能染色不好、辨认困难甚至有破坏,因此实际上也不宜抽选靠近

切片上表面或下表面的组织来测量^[3,5,9]。也就是说,应用研究中固定在一定厚度区域的测量,实际上包含有这样一个未必真实因而可能带来抽样偏差的假设:Z 轴方向上不同(厚度)区域(例如顶部、中间和底部区域)的神经元数量或数密度,不会因为组织处理(尤其是切片、染色、封片和封片剂固化过程)而出现不同程度的变化^[5,9]。好在有一项研究表明,不同厚度区域的石蜡或甲基丙烯酸树脂切片组织里的细胞核数密度没有显著差异^[5]。

2.3 结果计算

该例中,为了简便,课题组把分合法估计涉及的切片厚度的抽样分数定义为:体视框的高度(该例为固定的 15 μm)与平均切片厚度之比。严格地讲,由于切片厚度的变异,分合法估计结果应基于不同测框区域的切片厚度和数到的神经元数量进行加权计算。就该例而言,仅考虑测量了切片厚度的测框区域的神经元计数结果——65 个测框(体视框)共计数了 150 个神经元,按照上述简便算法,这 65 个测框区域(整个切片厚度)里的神经元总数的估计为:150 × (24.22/15) = 242.2;按照加权算法,各测框数到的神经元数量应乘以各测框区域的切片厚度抽样分数的倒数(各测框区域的切片厚度/15),这样计算的所有测框的结果总和为 243.9,此即这 65 个测框区域(整个切片厚度)神经元总数的无偏估计。与加权算法相比,简便算法所得结果低估了 0.7%,即有 0.7% 的偏差。这样的加权算法等同于 Dorph-Petersen et al(2001) 以前所述方法:用于计算切片厚度抽样分数的平均切片厚度,不应是上述平均厚度(算术平均厚度),而应是基于数到的神经元数量的加权平均厚度^[12]。各个测框区域的切片厚度乘以各个测框数到的神经元数量,65 个测框区域的这个结果总和除以 65 个测框数到的神经元数量总和,即得切片的加权平均厚度,结果为 24.39 μm。基于这个结果,这 65 个测框区域(整个切片厚度)的神经元总数为 150 × (24.39/15) = 243.9,与上述加权计算所得结果完全相等。

总之,光学分合法应用中一般常用的上述简便算法,实际上有偏差,除非切片各区域的厚度相等。但无偏的加权算法,不仅计算麻烦,每个数到了神经元的测框区域都要测量切片厚度更是麻烦。好在生物组织切片(不论是本文所用冰冻切片还是常用的石蜡切片、甲基丙烯酸树脂切片^[8])的厚度变异通常很小,因此简便计算结果与加权计算结果的差别也会很小(见上述结果),应用研究中采用简便算法是可以接受的。

2.4 光学分合法的理论与实践

本文介绍的估计神经元(胞体)总数的无偏体视学方法,常被称为光学分合法(图 1),它用了光学体视框来无偏计数神经元,同时结合运用了分合法来无偏估计其总数^[2-3,6-7,9]。分合法本质是这样一种抽样统计原理:如果研究者从一个器官等距随机抽选了一定比例(抽样分数)的神经元,那么抽得的神经元总数乘以抽样分数的倒数即器官内神经元总数的无偏估计^[1-3]。这里的等距随机抽样,实践中通常包括组织块、切片、视野面积和切片厚度等多个阶段的等距随机抽样,因此这里的抽样分数应为各个阶段抽样分数之积^[1-3](图 1)。本文所举例子没有涉及组织块和视野的抽样,因此不必考虑组织块或视野的抽样分数,或者把他们的抽样分数当作 100%(等于 1)。等距随机抽样是保证分合法估计无偏性的根本。不过,实际运用中,由于技术与切片本身的问题,研究者难以进行切片厚度的等距随机抽样,即难以在切片 Z 轴方向上实施等距随机抽样;为了减少工作量,课题组也倾向于进行简便计算(见文内“实验设计”与“结果计算”部分)。这些都可能给光学分合法带来一定的偏差。

分合法估计只需要知道抽样分数和最后数到的神经元数量,与组织处理过程(固定、脱水、包埋、切片、染色、封片等)中神经元(胞体)形态是否变化无关,也与包含神经元的器官组织的体积是否(均匀)变化无关。只要组织处理不会引起所测神经元增加(例如 1 个变成多个)或减少(例如消失)的人工假象,分合法的估计就是无偏的,即从体视学方法学的角度讲没有偏差或系统误差。

光学分合法的实践涉及两个(计算机辅助的)精密仪器,一是确定视野面积抽样分数的机动显微镜载物台,二是测定体视框高度或切片厚度的指针测微计(载物台 Z 轴位移测量仪)^[5,13],没有它们的辅助光学分合法的应用就难以实现。当然,如果这两个精密仪器一旦出现质量问题,就可能导致难以确认的系统误差。相比之下,基于数密度和器官组织体积估计粒子总数的方法,不存在抽样分数确定或估计的误差^[3,8-9]。

切片厚度的测量结果,直接影响切片厚度的抽样分数,因此直接影响分合法的总数估计结果。根据笔者的经验,切片组织实际厚度的测量,主要是切片组织上表面和下表面聚焦平面位置的判断,可能受主观因素的影响;为了减少这个影响,切片上表面或下表面的位置最好在反复上下聚焦观察切片的过程中进行判定,应注意判定为测框区域的切片组织结构(不论染色深浅)刚好出现或消失的位置^[8]。

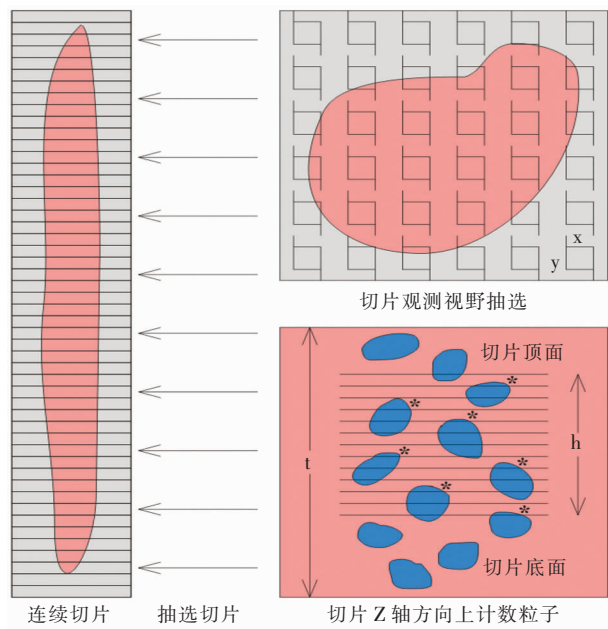


图1 光学分合法一例示意图

把一器官(红色)完全切成连续切片,等距随机抽选其中1/5的切片,即切片(数量)的抽样分数为1/5。在切片上等距随机抽选观测视野——测框(禁线框),测框的长、宽分别为 x 、 y ,图中所示测框的间距分别为 $2x$ 、 $2y$,因此视野(面积)的抽样分数为 $xy/(4xy)=1/4$ 。在实际厚度为 t (切片顶面与底面之间的间距)的切片(Z轴方向)上,从距离切片顶面一定深度的位置开始,从上往下“连续断层”观察切片(光学切片)并用光学体视框计数细胞(蓝色)——计数光学体视框“内”的细胞(星号*标示的是根据体视框计数法则应该被计数的细胞,即假设这些细胞在三维体视框空间“内”),计数细胞的深度(光学体视框总高度)为 h (即用于计数细胞的光学体视框空间的体积为 xyh),因此切片厚度的抽样分数为 h/t ,图中所示 h/t 值为12/23。假设最后从所抽选的切片总共计数到 n 个细胞,那么,根据光学分合法,所测器官内细胞总数的无偏估计为: $n \times \text{切片抽样分数的倒数} \times \text{视野抽样分数的倒数} \times \text{切片厚度抽样分数的倒数} = n \times [1/(1/5)] \times [1/(1/4)] \times [1/(12/23)] = 38.3n$ 。

该例中,课题组在切片平面上圈定了整个DG区域(其中可能包含有非DG区的周围组织),但并没有测量每张切片上DG区的面积,也未记录没数到神经元的体视框的数量,因为分合法估计不需要知道DG区或测框的面积,也不需要知道总共用了多少体视框来计数,只需要知道测了其中多少比例(抽样分数)的区域,总共数到多少神经元。不过,测量过程中实际上也可根据测点计数同时估计DG区的面积^[3,14]。这样,就可估计是在多少体积(=DG区总面积 $\times$ 体视框高度)的切片组织里计数的神经元,因此可估计出DG区海马组织里神经元的数密度:=数到的神经元数量/(DG区总面积 $\times$ 体视框高度)。同时,还可利用连续切片根据祖暅原理(卡瓦列里原理)估计DG区的体积(组织处理后的体积):=DG区总面积 $\times$ 平均切片厚度 $\times$ 切片抽样分数的倒数^[2-3,9,14]。把这个体积乘以数密度,同样可得到神经元总数:=数到的神经元数量 $\times$ 切片抽样分数的倒数 $\times$ 切片厚度抽样分数的倒数。就是说,应用分合法的神经元总数估计,实际上也相当于基于数密度和器官组织体积的总数估计;虽然组织处理可

能引起组织体积改变从而会影响(组织体积减少时会增加)神经元的数密度,但分合法设计消除或校正了其对其总数估计的影响^[9]。正是因为不受组织处理致组织体积改变的影响,光学分合法成了引人注目的细胞总数估计方法。不过,由于需要把整个器官组织(或从中等距随机切取的组织块)完全切成连续切片,光学分合法的应用实际上比较麻烦,工作量大,技术要求高,难以保证所有连续切片完好^[8-9]。

2.5 样本含量

形态定量研究中人们总是会问,这个器官、那个器官的体视学测量结果准确、可靠吗?在采用可靠或无偏体视学方法的前提下,这实际上是在问:测量的数据量或者说样本含量足够吗?

这本质是一个统计学问题,在体视学(形态定量)研究中比较复杂^[3]。体视学应用研究中有这样一个重要的一般经验原则:在随机抽样和适当抽样间距的前提下,每个器官每个项目的测量数量(例如计数的粒子数)只需要一二百,根据祖暅原理估计任意粒子(例如海马结构)的体积只需要十来张等距随机连续切片^[3,9]。从这个角度考虑,本文所举例子获取了14张等距切片,最后数到291个神经元,因此课题组认为该例神经元总数估计所用的样本含量是足够或合适的。

具体分析样本含量是否足够,一是需要估计反映器官内抽样误差大小的误差系数(等于标准误除以均值或者变异系数除以样本含量的平方根,它表示估计值与真实值之间的平均差异),二是需要分析确定整项研究(可能包含多个组且每个组包含多个器官)中研究者需要多准的每个器官(或动物)的测量,即器官内抽样误差(误差系数)小于多少才能得到研究者可以接受的整项研究的抽样误差^[3,15]。

就本文的举例,课题组从所测海马DG区最后只获得一个样本(14张切片里数到的291个神经元),因此只能获得一个估计结果(神经元总数2439)。仅从这一个样本,实际上不能计算获得的这个结果有多准——研究者不能无偏估计所得结果的误差系数,因此实际上无法准确判断研究者用的切片数、数的神经元数量是否足够。不过,研究者可从样本“内部”(样本元素)的变异情况分析(近似估计)这个误差系数。一是用文献6所用方法,另一种可能更好的方法是把样本(14张切片)等距分成2个子样本(根据切片顺序确定的单数和偶数切片分别构成的样本)之后再分析^[3,15-16]。但该例所用切片当时没有记录切片顺序,即没有切片序号,因此不能用这两种方法分析误差。还有一个一般的统计学方法:如果把每张切片都当作一个独立(互不相关)随机抽选的样本元素,即把每张切片都当作

一个样本,就可估计其误差系数^[3]:14 张切片里各自数到的神经元数量的变异系数(71.84%)除以切片数 14 的平方根,约等于 19%。这个误差系数显然有点偏高。不过,这不是准确估计的误差系数,因为误差这样估计通常会高估^[3,16-17]。这个误差结果只有一个提示作用:就小鼠海马 DG 区 DCX 阳性神经元总数的估计而言,目前没有误差分析证据表明,未来类似的研究中减少连续切片(或视野)的抽样分数或计数的神经元数量也可得到满意的结果。

不过,就该例涉及的切片平均厚度的估计而言,把不同区域测得的结果(切片厚度)当作为独立的结果是比较合理的,因为每个区域的测量结果都是一个相当可靠的结果,而且总的来讲不同区域(尤其是不同切片)的测量结果基本上可看作为独立的测量结果。因此,该例获得的切片平均厚度的误差系数可较可靠的估计为:65 个区域切片厚度的变异系数(10.54%)除以 65 的平方根,等于 1.31%。这个结果说明,平均厚度估计的抽样误差非常小。事实上,根据切片厚度的变异系数可以得出这样一个比较可靠的结论:未来类似的研究中实际上只需要从所有连续切片的 DG 区总共等距随机抽选并测量 10 来个区域(而不是 65 个区域)的厚度,就可得到满意的平均厚度结果。(这里之所以说满意,是因为 10 个区域平均结果的误差系数估计为 10.54%除以 10 的平方根,等于 3.3%,达到了一般认为的“满意”标准^[3]:误差系数小于 5%。当然,只测 5 个区域的切片厚度也可得到这个“满意”结果;但在 14 张切片上再多测几个区域也不算多,不会增加多大的工作量。)

2.6 组织皱缩

本文所用冰冻切片,切片机设定的切片厚度(步进)为 50 μm,染色、封片后其实际厚度最后变成平均 24 μm,切片(厚度)压缩了一半多。以前有文献指出冰冻切片甚至可能压缩 2/3^[18]。这说明冰冻切片组织有严重的组织皱缩(体积减少)和结构变形(不均匀形态改变)。这对形态定量研究将产生怎样的影响,是一个不能回避的体视学应用基础问题^[8]。不过,切片压缩或组织皱缩不影响本文的神经元总数估计,因为本文用了体视框来计数神经元(不受结构变形的影响),且用了分合法来估计总数(不受组织体积变化的影响),也不影响本文对样本含量的分析。

参考文献

[1] Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson[J]. Journal of Microscopy, 1986, 143(1): 3-45.

[2] Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools; disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis[J]. APMIS, 1988, 96(10): 857-881.

[3] 杨正伟. 生物组织形态定量研究基本工具: 实用体视学方法[M]. 北京: 科学出版社, 2012.

[4] 彭彬, 林菁艳, 杨正伟. 光镜下突触数——阳性突触素颗粒数的体视学估计[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(3): 211-216.

[5] Xu W, Guo Y, Xiang Y, et al. Is there section deformation resulting in differential change of nuclear numerical densities along the z axis of thick methacrylate or paraffin sections? [J]. Microscopy Research and Technique, 2019, 82(9): 1575-1583.

[6] West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator[J]. The Anatomical Record, 1991, 231(4): 482-497.

[7] He Q, Jiang L, Zhang Y, et al. Anti-LINGO-1 antibody ameliorates cognitive impairment, promotes adult hippocampal neurogenesis, and increases the abundance of CB1R-rich CCK-GABAergic interneurons in AD mice[J]. Neurobiology of Disease, 2021, 156: 105406.

[8] Guo Y, Xiang Y, Wang D, et al. Tissue volume and section area changes of paraffin and methacrylate embedded testicular sections: an unbiased design study [J]. Image Analysis and Stereology, 2024, 43(3): 221-237.

[9] 杨正伟. 组织处理致组织体积变化对体视学估计影响的校正[J]. 川北医学院学报, 2025, 40(8): 955-967.

[10] Zhengwei Y, Wreford NG, Royce P, et al. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998, 83(4): 1284-1291.

[11] 郭镇洲, 杨靓, 彭彬, 等. 老年大鼠海马神经元细胞核体积和直径的体视学观察[J]. 解剖学报, 2022, 53(3): 302-308.

[12] Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size[J]. Journal of Microscopy, 2001, 204(Pt 3): 232-246.

[13] 杨正伟. 体视学研究的辅助工具: 现状与展望[J]. 中国体视学与图像分析, 2013, 18(3): 249-254.

[14] 郭洋, 向宇, 杨林凤, 等. Photoshop 软件在辅助体视学测试中的潜在应用[J]. 川北医学院学报, 2025, 40(8): 973-976.

[15] Xu W, Guo Y, Yang ZW. Comparison of profile counting and diameter measurement for estimating the length density of seminiferous tubules or epididymal duct [J]. Image Analysis and Stereology, 2024, 43(3): 239-247.

[16] Yang Z, Zhang R, Wen X, et al. Caveat on the error analysis for stereological estimates[J]. Image Analysis and Stereology, 2000, 19(1): 9.

[17] 王丹, 文晓红, 郭洋, 等. 根据肾小管轮廓计数和直径估计肾小管长度的两种体视学方法对比[J]. 解剖学报, 2020, 51(6): 967-975.

[18] Andersen BB, Gundersen HJ. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections[J]. Journal of Microscopy, 1999, 196(1): 69-73.

(收稿日期: 2025-01-23 修回日期: 2025-02-23)