

显微摄像条件对细胞形态测试结果的影响

蓝永洪 牛海艳 林世珍 江朝娜 杨 智 符碧薇

(海南医学院形态学实验室 海南 海口 571101)

摘要 目的 研究显微摄像条件对细胞形态测试结果的影响情况。方法 :以苏木精 - 伊红(HE)染色的胃壁细胞为研究对象,分别在不同光亮度、对比度、饱和度和锐度的成像条件下进行显微摄像,采用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0)测试胃壁细胞的色度学和几何形态学参数,并对测试结果进行分析比较。结果 :不同光亮度、对比度、饱和度组的胃壁细胞红、绿、蓝三基色差异均有统计学意义($P<0.05$),其中红、绿、蓝基色值在高光亮度和高对比度组最高,同时红基色值在高饱和组最高,而绿、蓝基色值在高饱和组最低($P<0.05$)。不同锐度的胃壁细胞红、绿、蓝三基色差异没有统计学意义($P>0.05$)。不同光亮度、对比度、饱和度和锐度的胃壁细胞的面积、周长、平均直径差异均没有统计学意义($P>0.05$)。结论 :光亮度、对比度和饱和度对细胞色度学参数影响明显,而对几何形态学参数无明显影响。

关键词 显微摄像 细胞形态 光亮度 对比度 饱和度 锐度

中图分类号 Q334 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012) 05-872-04

Effect of Microscopic Photography Conditions on Test Results of Cell Morphology

LAN Yong-hong, NIU Hai-yan, LIN Shi-zhen, JIANG Chao-na, YANG Zhi, FU Bi-wei

(Morphological Laboratory of Hainan Medical College, Hainan, Haikou, 571101, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study is to study effect of microscopic photography conditions on test results of cell morphology. **Methods:** The gastric parietal cells by hematoxylin-eosin (HE) staining were taken as the research object. The microscopic photography was taken in different imaging condition, including brightness, contrast, saturation and sharpness. The parameters of colorimetry and geometric morphology in gastric parietal cells were tested by image analysis software (Image-Pro Plus 6.0), and comparison and analysis was performed among test results. **Results:** There were statistical significances in red, green, blue three primary colors of gastric parietal cells among different brightness, contrast, saturation group ($P<0.05$). The high brightness and contrast group had highest values of red, green, blue three primary colors, and the high saturation group had highest values of red primary colors and lowest green, blue primary colors ($P<0.05$). There was no statistical significance in red, green, blue three primary colors of gastric parietal cells among sharpness group ($P>0.05$). There were no statistical significances in area, perimeter, average diameter of gastric parietal cells among groups ($P>0.05$). **Conclusions:** The brightness, contrast and saturation has significant influence on cell colorimetry parameters, but has not obvious effect on geometric morphology parameters.

Key words: Microscopic photography; Cell morphology; Brightness; Contrast; Saturation; Sharpness

Chinese Library Classification(CLC): Q334 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2012) 05-872-04

前言

组织与细胞结构的病理学改变是以一定的形态改变表现出来的,它包括几何结构的改变和颜色特征的变化^[1]。颜色分析在形态学研究中具有重要的价值,细胞结构的不同或结构发生改变都会表现出颜色的不同^[2]。苏木精 - 伊红(HE)染色是最基本的也是最重要的病理学染色技术,其颜色变化是临床病理医生诊断分型的关键^[3,4],同时免疫组织化学染色法也是通过细胞膜或细胞浆颜色的有无或深浅来判断组织或细胞含有某种物质(如抗原、抗体等)数目的方法之一,在病理诊断、术后治疗和预后评估等方面发挥了重要的作用^[5-7]。细胞几何结构的变化也

是临床诊断分型的依据之一,具有重要的临床意义。细胞形态的定量分析有助于较全面和准确地反映病变情况,克服定性描述中的主观性,在计算机图形定量分析及判别有重要的意义^[8]。但是细胞的定量分析主要立足于图像分析上,图像的质量直接关系到图像分析的结果,而图像的质量和显微摄像条件关系密切。本研究以胃壁细胞为研究对象,分别在不同光亮度、对比度、饱和度和锐度的成像条件下进行显微摄像,采用图像分析软件测试胃壁细胞的色度学和几何形态学参数,并对测试结果进行分析比较,探讨上述成像条件对细胞形态的影响情况,为定量分析提供理论基础。

1 材料及方法

1.1 实验仪器及软件

生物组织自动脱水机(ZT-12P2,孝感亚光医用电子技术有限公司) 冷冻包埋机(YB-6LF,孝感亚光医用电子技术有限公司) 半自动轮转切片机(HM340E,德国, Microm) 光学显微镜

作者简介 蓝永洪(1978-),男,医学硕士,实验师,主要从事组织学与胚胎学实验教学和研究工作, E-mail: 411382095@qq.com, Tel: 13976995305

(收稿日期: 2011-07-30 接受日期: 2011-08-23)

(CX31,Olympus,日本);专业数字摄像头(DPIXEL200,广州市泰柯计算机有限公司);Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(Media Cybematics,美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 标本制备 常规取胃组织,福尔马林固定、酒精脱水、二甲苯将组织透明后进行浸蜡、包埋,制成 4μm 的石蜡切片,进行 HE 染色,中性树胶封片。在安装外置式摄像头的显微镜下拍摄胃壁细胞的图像,并保存于计算机待测。

1.2.2 细胞摄像及测试 胃壁细胞的摄像条件以光亮度(-46)、对比度(189)、色调(0)、饱和度(255)、锐度(255)和曝光值(66)为标准,拍摄微标尺图像作为标尺。在固定其他参数的情况下,分别在不同光亮度(-16、-46、-76)、对比度(159、189、219)、饱和度(155、205、255)和锐度(155、205、255)条件下获取切片上 10 个视野的图片,并输入计算机中待测。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分别测试胃壁细胞的色度学参数和几何形态学参数,选取的色度学参数包含红(R)、绿(G)、蓝(B)三基色,而几何形态学参数包含面积、周长、平均直径。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,检测结果用均值± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素的方差分析(ONE-WAY ANOVA)及基于此的组间多重比较方法(SNK 法)比较不同组间的色度学和几何形态学参数,上述分析均采用双侧检验,检验水平 α 为 0.05,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对色度学参数的影响

由表 1-4 可以看出,不同光亮度、对比度、饱和度组的红、绿、蓝三基色差异均有统计学意义($P < 0.05$) 其中红、绿、蓝基色值在高光亮度和高对比度组最高,同时红基色值在高饱和组最高,而绿、蓝基色值在高饱和组最低($P < 0.05$)。不同锐度的红、绿、蓝三基色差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 对几何形态学参数的影响

由表 5-8 可以看出,不同光亮度、对比度、饱和度、锐度组的面积、周长、平均直径差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 光亮度对胃壁细胞色度学参数的影响

Table 1 Effect of brightness on parameters of colorimetry in gastric parietal cells

Brightness	n	Red	Green	Blue
Low brightness (-76)	150	190.120± 6.215	62.055± 6.576	57.199± 5.334
Moderate brightness (-46)	150	220.102± 6.084*	92.861± 6.601*	87.753± 5.140*
High brightness (-16)	150	243.925± 3.301**	123.126± 6.815**	117.782± 5.075**
F		3779.688	3148.992	5121.976
P		0.001	0.001	0.001

Note: *Vs Low brightness group, $P < 0.05$; #Vs Moderate brightness group, $P < 0.05$

表 2 对比度对胃壁细胞色度学参数的影响

Table 2 Effect of contrast on parameters of colorimetry in gastric parietal cells

Contrast	n	Red	Green	Blue
Low contrast (159)	133	200.168± 5.169	68.886± 5.678	62.854± 4.289
Moderate contrast (189)	133	228.955± 5.351*	98.943± 6.582*	92.720± 5.192*
High contrast (219)	133	245.805± 2.951**	128.434± 7.898**	121.455± 6.256**
F		3317.195	2564.125	4055.314
P		0.001	0.001	0.001

Note: *Vs Low contrast group, $P < 0.05$; #Vs Moderate contrast group, $P < 0.05$

表 3 饱和度对胃壁细胞色度学参数的影响

Table 3 Effect of saturation on parameters of colorimetry in gastric parietal cells

Saturation	n	Red	Green	Blue
Low saturation (155)	140	179.457± 7.616	103.340± 7.323	100.680± 6.390
Moderate saturation (205)	140	198.502± 7.886*	95.505± 7.223*	93.475± 6.167*
High saturation (255)	140	215.683± 8.167**	88.005± 7.434**	86.080± 5.840**
F		737.850	153.347	198.137
P		0.001	0.001	0.001

Note: *Vs Low saturation group, $P < 0.05$; #Vs Moderate saturation group, $P < 0.05$

表 4 锐度对胃壁细胞色度学参数的影响

Table 4 Effect of sharpness on parameters of colorimetry in gastric parietal cells

Sharpness	n	Red	Green	Blue
Low sharpness (155)	152	218.564± 6.113	91.459± 7.560	85.769± 5.652
Moderate sharpness (205)	152	219.522± 6.364	91.248± 7.460	86.149± 5.611
High sharpness (255)	152	218.313± 6.339	90.980± 7.483	85.890± 5.506
F		1.572	0.156	0.184
P		0.209	0.856	0.832

表 5 光亮度对胃壁细胞几何形态学参数的影响

Table 5 Effect of brightness on parameters of geometric morphology in gastric parietal cells

Brightness	n	Area (μm ²)	Perimeter(μm)	Average diameter(μm)
Low brightness (-76)	150	180.980± 33.918	49.699± 4.711	15.019± 1.403
Moderate brightness (-46)	150	186.558± 36.027	50.712± 4.825	15.019± 1.467
High brightness (-16)	150	186.752± 37.326	50.498± 4.959	15.033± 1.511
F		1.259	1.832	1.232
P		0.285	0.161	0.293

表 6 对比度对胃壁细胞几何形态学参数的影响

Table 6 Effect of contrast on parameters of geometric morphology in gastric parietal cells

Contrast	n	Area (μm ²)	Perimeter(μm)	Average diameter(μm)
Low contrast (159)	133	186.309± 40.273	50.239± 5.368	15.009± 1.622
Moderate contrast (189)	133	185.231± 38.582	50.186± 5.055	14.964± 1.563
High contrast (219)	133	189.468± 37.615	50.645± 4.955	15.148± 1.518
F		0.428	0.319	0.496
P		0.652	0.727	0.610

表 7 饱和度对胃壁细胞几何形态学参数的影响

Table 7 Effect of saturation on parameters of geometric morphology in gastric parietal cells

Saturation	n	Area (μm ²)	Perimeter(μm)	Average diameter(μm)
Low saturation (155)	140	204.029± 42.697	52.389± 5.144	15.725± 1.648
Moderate saturation (205)	140	200.984± 42.430	52.037± 5.304	15.609± 1.640
High saturation (255)	140	204.432± 42.892	52.405± 5.103	15.755± 1.659
F		0.273	0.225	0.307
P		0.761	0.798	0.736

表 8 锐度对胃壁细胞几何形态学参数的影响

Table 8 Effect of sharpness on parameters of geometric morphology in gastric parietal cells

Sharpness	n	Area (μm ²)	Perimeter(μm)	Average diameter(μm)
Low sharpness (155)	152	200.714± 35.406	52.305± 4.483	15.590± 1.427
Moderate sharpness (205)	152	200.583± 36.454	52.382± 4.569	15.579± 1.463
High sharpness (255)	152	199.020± 35.795	52.201± 4.397	15.520± 1.447
F		0.105	0.063	0.105
P		0.900	0.939	0.901

3 讨论

形态测试学的特征体现在对组织或细胞结构进行量化和分析,以及根据组织或细胞的结构特点,建立定量描述组织结构和细胞形态的概念、参数和测试方法,其测试参数包含色度学和几何形态学两部分^[9,10]。RGB 模式是最常见的色度学模式,是基于自然界中 3 种基色光的混合原理,将红(R)、绿(G)和蓝(B)3 中基色按照从 0(黑)到 255(白色)的亮度值在每个色阶中分配,从而指定其色彩。当不同亮度的基色混合后,便会产生出 $256 \times 256 \times 256$ 种颜色,约为 1670 万种^[11]。计算机中显示的任何一种颜色可以由红、绿、蓝三种基本颜色按照不同的比例构成,每一像素均包含红、绿、蓝三个分量组成,每一分量都是该图像颜色特征的基本构成因素^[12]。几何形态参数包含面积、直径、周长、长轴、短轴和性状因子、规化形状因子、圆度、椭圆扁圆度、形状不规则指数、周长指数、细胞结构指数等参数,这些参数可以反映细胞的大小、核浆比、形态结构、不规则程度,通过这些参数可以判断细胞是否发生病变。由于上述后几种参数均可通过前几种参数计算得出^[13],因此面积、平均直径、周长、长轴、短轴的变化可以代表几何形状参数的变化情况。本研究选择胃壁细胞为研究对象,探讨成像条件(光亮度、对比度、饱和度和锐度)对细胞色度学参数(R、G、B 三基色)和几何形态学参数(面积、平均直径、周长)的影响情况。其结果显示:光亮度、对比度、饱和度组对细胞的红、绿、蓝三基色影响明显,其中红、绿、蓝基色值在高光亮度和高对比度组最高,同时红基色值在高饱和组最高,而绿、蓝基色值在高饱和组最低,锐度对红、绿、蓝三基色无明显影响。同时光亮度、对比度、饱和度、锐度对细胞的面积、周长、平均直径无明显影响。表明显微摄像条件(如光亮度、对比度和饱和度)对细胞色度学参数影响明显,而对几何形态学参数无明显影响。因此在研究细胞色度学参数时要严格控制好成像条件,务必使摄像参数保持一致,以获取相同质量的细胞图像,以免影响细胞的显微测试结果。当然影响细胞色度学的因素还很多,如染色时间的长短^[14],分化时间的差异^[15]等,而这些可采用自动染色机或组织芯片技术避免^[16]。

参考文献(References)

- [1] 陶金华,申洪,周春辉,等.痰涂片肺癌脱落细胞巴氏染色色度学定量研究[J].中国体视学与图像分析,2007,12(1):62-68
Tao Jin-hua, Shen Hong, Zhou Chun-hui, et al. Quantitative chromatic study on exfoliative cells of lung cancer in sputum smears stained by Papanicolaou [J]. Chinese Journal of Stereology and Image Analysis, 2007, 12(1):62-68
- [2] 蓝永洪,申洪,陆药丹,等.尿移行细胞癌巴氏染色色度学定量研究[J].中国体视学与图像分析,2009,14(4):402-405
Lan Yong-hong, Shen Hong, Lu Yao-dan, et al. Quantitative chromatic study on transitional cell carcinoma cells in urine by papanicolaou staining [J]. Chinese Journal of Stereology and Image Analysis, 2009, 14(4):402-405
- [3] 杨枫.影响 HE 染色细胞形态的因素探讨[J].临床与实验病理学杂志,1999,15(4):361-362
Yang Feng. Investigation of factors with effect on cell morphology of HE staining [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology,

gy, 1999, 15(4):361-362

- [4] 马恒辉,周晓.HE 染色常见问题与对策[J].临床与实验病理学杂志,2008,24(4):478-481
Ma Heng-hui, Zhou Xiao. The common problems and countermeasures of HE staining [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2008, 24(4):478-481
- [5] 沈铭昌.免疫组化在病理学中的应用进展与评价[J].实用肿瘤杂志,2002,17(5):293-294
Shen Ming-chang. The application progress and evaluation of immunohistochemistry in pathology [J]. Journal of practical oncology, 2002, 17(5):293-294
- [6] 周晓军.免疫组化在病理诊断中的正确应用[J].诊断病理学杂志,2003,10(4):232-236
Zhou Xiao-jun. Correct application of immunohistochemistry in pathological diagnosis [J]. Journal of Practical Oncology, 2003, 10(4):232-236
- [7] 杨红.免疫组化质量控制中的 3 个基本影响因素[J].临床与实验病理学杂志,2001,17(2):183-183
Yang Hong. The 3 basic influencing factors in quality control of immunohistochemistry [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2001, 17(2):183-183
- [8] 吕翔.图像定量分析方法在病理诊断中的应用及其意义[J].中国体视学与图像分析,2001,6(3):186-189
Lu Xiang. Application of quantitative image analysis in pathologic diagnosis and its significance [J]. Chinese Journal of Stereology and Image Analysis, 2001, 6(3):186-189
- [9] 申洪.形态测试学在肿瘤病理学研究中的应用进展[J].实用肿瘤杂志,1999,14(1):9-10
Shen Hong. Application progress of morphometry in tumor pathological research [J]. Journal of Practical Oncology, 1999, 14(1):9-10
- [10] 白明,杨星科.几何形态测量法在生物形态学研究中的应用[J].昆虫知识,2007,44(1):143-147
Bai Ming, Yang Xing-ke. Application of geometric morphometrics in biological researches [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007, 44(1):143-147
- [11] 荆其诚,焦书兰,喻柏林,等.色度学[M].北京:科学出版社,1990,1-2.
Jing Qi-cheng, Jiao Shu-lan, Yu Bo-lin, et al. [M]. Beijing: Science Press, 1990:1-26
- [12] Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M, et al. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force [J]. Ann Intern Med, 2004, 140(9): 740-753
- [13] 申洪,沈忠英.实用生物体视学技术[M].广州:中山大学出版社,1991,223-229
Shen Hong, Shen Zhong-ying. Practical technology of biological stereology [M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 1991:223-229
- [14] 杨群,胥维勇.影响组织切片制作质量几个因素的分析及改进方法[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2005,14(1):119-120
Yang Qun, Xu Wei-yong. Improved method and factors analysis with effect on production quality of tissue section [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2005, 14(1):119-120

(下转第 867 页)

的催化及调控功能区使其获得或失去一定的功能,从而进一步调控相关的下游事件。其中参与凋亡执行的 Caspase-3 能降解多种底物,导致核纤层和细胞骨架的断裂崩解^[5-6]。有研究发现报道在脑缺血模型缺血周边区及海马等 Caspase mRNA 及其相应蛋白表达增加^[7-10]。

β -七叶皂甙钠能抑制神经细胞凋亡^[11-12]。 β -七叶皂甙钠是中药娑罗子的成熟果实提取得到的皂甙盐经冷冻干燥制造而成。 β -七叶皂甙钠能提高机体 ACTH 和可的松血浆水平;能促进血管壁增加血小板生长因子(PGF)分泌;能清除机体内自由基,有抗感染、抗渗出作用,抗水肿,提高静脉张力,加快静脉血流,促进淋巴回流,改善微循环,并有保护血管壁的作用^[13]。它还能改善迟发性脑病损伤处组织淋巴和血液循环,逆转电解质的紊乱及失调,抑制炎症反应,减少氧自由基、脂质过氧化的作用,保护脑神经细胞的亚微结构,促进神经功能恢复。 β -七叶皂甙钠对 Ca^{2+} 通道有阻断作用,对致炎物质磷酸组胺、缓激肽引起的血管通透性增高有抑制作用,并能影响细胞膜、 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATP 酶与离子通道,具有抑制损伤血脑脊液屏障通透性作用,从而抑制神经细胞的凋亡^[14]。

本研究观察七叶皂甙钠对一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型神经细胞凋亡和 Caspase-3 表达的影响,结果显示,七叶皂甙钠组 Caspase-3 表达均明显少于对照组,七叶皂甙钠可下调 Caspase-3 的表达,抑制神经元的凋亡,中止迟发性脑病损伤,抑制炎症反应,具有神经组织保护和治疗作用。

参考文献(References)

- [1] Piantadosi CA,Zhang J,Levin ED. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat[J].Experimental Neurol,1997,147:103-114
- [2] Beere HM, Wolf BB, Cain K,et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome[J]. Nat Cell Biol,2000,22: 469-475
- [3] Calderone A, Jover T, Noh K-M, et al. Ischemic insults de-repress the gene silencer rest in neurons destined to die [J]. J Neurosci,2003, 23: 2112-2121
- [4] LI Qing Bo,CHANG Yao Ming,LI Jing Sheng ,et al.Effects of hyperbaric oxygen on expression of Bcl-2 and delayed neuronal damage following acute carbon monoxide poisoning in the brain of rats[J]. J Fourth Mil Med Univ,2003,24 (11) :1014-1015
- [5] Peng h, Huang Y, Duan Z,et al. Cellular [A P]regulates TRAIL-induced apoptosis in human fetal cortical neural progenitor cells[J]. Neurosci Res, 2005,82(3):295-305
- [6] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity[J]. Immunol Rev 193:10-21
- [7] Wang JW, Wang DX, Wang RJ,et al. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through a caspase-3 dependent pathway in primary cultures of cortical neuronal cells of fetal mice [J]. Acta Virol, 2005, 49(1): 45-49
- [8] Tanaka H, Yokota H, Jover T,et al. Ischemic preconditioning neuronal survival in the face of caspase-3 activation [J]. Neurol Sci, 2004, 24 (11):2750-2759
- [9] Uemura K,Harada K,Sadamitsu D,et al.Apoptotic and necrotic brain lesions in a fata case of carbon monoxide poisoning [J].Forensic Sci Int,2001,116(2-3):213-219
- [10] Gamier P, Ying W, Swanson RA. (2003) Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase-1 [J]. J Neurosci 23: 7967-7973
- [11] Thom SR, Fisher D, Xue Y,et al. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide [J]. PNAS, 2000, 97 (3):1305-1310
- [12] Myron D,Ginsberg MD, Ronald E, et al. Experimental carbon monoxide encephalopathy in the primate. II clinical Aspects, Neuropstholohy and physiologic Correlation[J].Arch Neurol, 1974, 30:209
- [13] CesaroneMR,Belcaro G, Ippolito E,et al. Microcirculatory efficacy of topical treatmentwith aescin+ essential phospholipids gel on transactaneousPO2in venous insufficiency[J].Angiology, 2004,55 (suppl 1): S7-S10
- [14] Hu XM, Zeng FD.Protective effectsofsodium beta-aescin on ischemia-reperfusion injury in rat brain [J].Acta Pharmacol Sin,2004,39(6): 419-423
- [15] 张明显,孙芳印. HE 染色过程中分化液的改进及注意事项[J].河北医药,1995,17(5):277
Zhang Ming-xian, Sun Fang-yin. Precautions and improvement of differentiation liquid during HE staining [J]. Hebei Medical Journal, 1995, 17(5):277
- [16] 罗小平,李广民,胡维维.自动染片机在 HE 染色中的应用及与手工染色的比较[J]. 诊断病理学杂志, 2007, 14(3):179-180
Luo Xiao-ping, Li Guang-min, Hu Wei-wei. Application of automatic staining machine in HE staining and comparison with manual staining [J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2007, 14(3):179-180

(上接第 875 页)