免疫组织化学图像光度学参数的选择及测量

文 敏,周 波,余资江 (贵阳医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 探讨免疫组织化学图像定量分析的最佳光度学指标,并对其测量方法及影响因素进行分析,以提高图像分析的精度。**方法** 运用图像分析软件,建立统一的图像采集、分割及处理标准,对青年、老年大鼠海马CA3区突触素的平均光密度、积分光密度进行测量。**结果** 青年组与老年组大鼠海马CA3区突触素积分光密度较平均光密度差异性更为显著。**结论** 积分光密度与平均光密度相比将面积因素考虑在内,测量物质含量结果更为准确。

[关键词] 免疫组织化学;图像分析;光密度

[中图分类号] R392.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)06-0377-02

Selecting and measurement of luminance parameter based on immunohistochemistry image

WEN Min, ZHOU Bo, YU Zi-jiang(Department of Anatomy, Guiyang Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To evaluate the best luminance parameters on the quantitative image analysis of immunohistochemical staining, and analyze the methods of measuring and correlative factors, in order to improve the measurement precision. **Methods** Unified picture collected, processed and dispose standard established from image analysis software were used to measure the average optical density, integral optical density of hippocampal's CA3 area synapses for young and old. **Results** The integral optical density of hippocampal's CA3 area had more significant difference than the average optical density in young and old. **Conclusion** Compared with the average optical density, integral optical density has much more accurate results about measuring the content of some substances.

Keywords: immunohistochemistry; image analysis; optical density

光度学参数是免疫组织化学染色图像分析中的常用检测指标,运用计算机图像分析软件对免疫组织化学阳性产物着色的深浅及面积的大小进行分析,可以计算出阳性产物的光度学参数值,从而达到对组织(细胞)内化学物质的定性、定位和定量分析的目的。然而,如何使用计算机图像分析软件对免疫组化图像进行准确定量分析,尽量减少人为误差,提高检测精度,一直是大家所关注但又未能很好解决的问题[1-2]。本文通过对大鼠海马CA3区突触素免疫组织化学图像的定量分析,来探讨免疫组化染色准确定量分析的常规方法。

1 材料与方法

1.1 光度学参数定量分析的常用指标

青年、老年大鼠海马CA3区突触素的平均光密度、积分光密度的测量,常用指标:①灰度(gray scale)用来定量描述图像中像素颜色深浅程度的参数;②光密度(optical density, OD),又称吸光度,是指光线通过溶液或物质前的入射光强度Ia与该光线通过后的透射光强度Ib比值的对数。

1.2 免疫组化染色准确定量分析的进程

1.2.1 采像 图像采集的条件和标准必须严格统一。开机后预热20 min,将采图的各项设置包括光源、白平衡、对比度等均改为手动调节且固定,以保证每次采图设置一致。拍照前需要校正灰度,将图片转换为灰度图,测量空白区域灰度,在220~240之间较好,如果灰度值在250以上,说明太亮;灰度值太低,说明图像太暗。在拍照过程中,除了调整视野和焦距以外,显微镜其他部件一律不动,如果调整参数,将会影响免疫组化测定结果。照片拍摄完成后不得用Photoshop等图像处理软件进行调整[6]。

1.2.2 光密度校准 光密度校准即扣除背景,相当于分光光度计清零。可以用图像分析软件或光密度板实现,但一部分图像分析软件不带此功能。我们选用国外软件Image-Pro Plus对图片进行分析。

1.2.3 图像分割及转换 成功分割出阳性物质,是准确分析图像的前提,也是较为困难的步骤。我们采用HIS(色调、饱和度、亮度)模式对图像进行分割。分割出阳性区域后,将其转换为灰度图像,这样便可以直接测量光密度了。

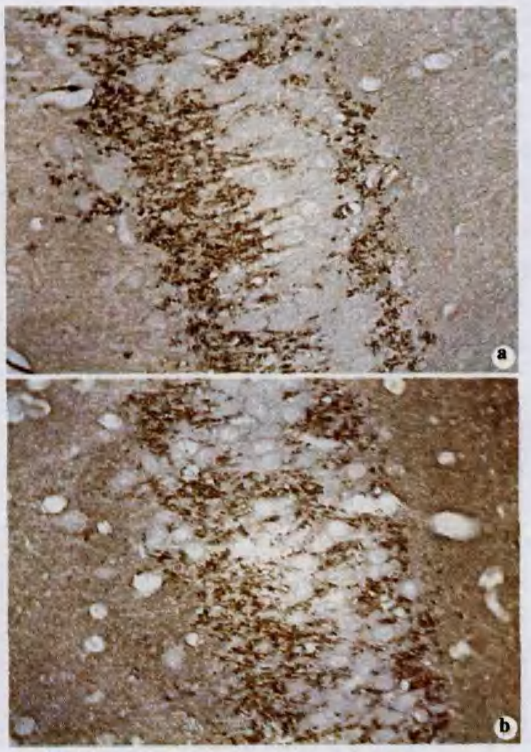
2 结果

按上述方法对青年、老年大鼠海马CA3区突触素的平均光密度、积分光密度进行测量见图1。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30660189);贵阳医学院博士基金(院C2006-4)

[作者简介] 文 敏(1977-),女,贵州省贵阳市人,讲师,硕士,主要从事中枢神经衰老及医学数字图像处理方面的研究。电话:13765143762, E-mail: wenmin1112@sina.com

[收稿日期] 2009-08-01 [修回日期] 2009-09-05



a:青年组大鼠;b:老年组大鼠

图1 大鼠海马CA3区突触素免疫组化图像采集

两个年龄组大鼠海马CA3区突触素的平均光密度和积分光密度均有显著差异,但积分光密度差异性更为显著,见表1。

表1 两组平均光密度、积分光密度的比较

组别	平均光密度(AOD)	积分光密度(IOD, $\times 10^3$)
青年组	0.3029 ±0.0647*	0.1833 ±0.0269*
老年组	45.763 ±0.484	21.716 ±0.0758

*:与老年组比较,$P<0.01$

3 讨论

光密度是免疫组织化学定量分析的重要光度学指标之一,其测量参数的选择与数据测量的准确性对实验结果有着直接影响。灰度从最黑到最亮分为0~2^{n-1}级(n为图像采集卡的转换精度),最小值为0,对应黑色,最大值为2^{n-1},对应白色,颜色越深灰度值越低。如8 bit的采集卡,其灰度级为0~255级,0级对应黑色,255级对应白色。灰度值的测量受很多因素影响,如图像采集中光源的亮度、图像放大倍数、图像采集卡的转换精度等,这就导致了灰度值的通用性和可比性较差。同时,灰度值与阳性物质的含量并非呈线性相关[3]。由于上述原因,灰度的使用已经日趋减少。依据朗伯—比尔定律,光密度值OD = lg(Ia/Ib) = KCL(Ia、Ib分别为入射光与透射光强度,K为被测物质的吸光系数,C为被测物质浓度,L为被测物质厚度)。可以看出,在切片厚度一致的情况下,OD与被测物质浓度呈线性相关。物质浓度越高,对光线的吸收越多,OD就越高,透射率就越低,照片上亮度就越暗,灰度值也就越低[4]。平均光密度(average optical density ,AOD)是被测细胞的投影或截面图像内各像素光密度的值的总和除以像素点的个数,即像素的光密度的算术平均。平均光密度可以反应组织细胞被染色的深浅,表述的是被测个体的投影或截面内吸光物质的密度。阳性区域AOD = (OD1 + OD2 + ⋯ODn)/n。积分光密度(integrating optical density ,IOD)是指被测细胞的投影或截面图像或完整个体体积内各个像素点的光密度值的总和。表述被测个体的投影或截面图像或完整个体体积内吸光物质的总含量。积分光密度可以分为面积积分光密度(AIOD)和体积积分光密度(VIOD)。前者表示截面或投影内各像素光密度值的总和,反映切片细胞截面内某种化学成分的总含量;后者表述以被测目标完整个体体积为单位的阳性物质的总含量。AIOD = OD1 × Area1 + OD2 × Area2 + ⋯ Odn × Arean。平均光密度反映了阳性区域表达部位光密度的平均值,积分光密度则反映了阳性物质光密度和面积的综合变化。两者相比,积分光密度考虑了面积因素,解决了阳性区域面积不同,颜色相近的情形下,平均光密度很难反映两者差别的问题。因此,将积分光密度作为免疫组织化学定量检测的主要指标[5]。

图像定量测量的误差是不可避免的。在进行图像分析时,测量对象本身数量级就很小,如果存在较大的测量误差的话,就很难获得有价值的、可信的实验数据。图像分析误差产生的原因是多样的,与切片厚度、染色时间、显微镜特性、传感器特性、图像分割的精确度及分析方法标准化等原因密切相关[7]。其中最易控制且与实验硬件设备相关性较小的就是分析方法标准化。由于现在对光密度测量的方法仍无统一标准,所以实验结果很难统一,很难对其精确度做出评价。因此,我们应将分析方法标准化,在对光密度进行测量分析时应尽可能地考虑到可重复性,应尽量将测量步骤统一,将每一步骤的测量参数统一(实验中应统一图像的采集条件及保存格式,应严格校正背景光密度值等),尽可能减低人为因素对测量结果的影响,将测量误差降低。

(下转第381页)

分别与上颌窦后外侧及内壁接续，其形态和大小受后筛窦向眶下板方向发育程度的影响。后筛窦汽化越好，筛上颌板的面积越大。

3 讨论

上颌窦区各结构的形态及毗邻关系对经上颌入路至颅底中央区手术具有重要意义[1-2]。本研究观测结果显示，上颌窦有5个壁。前壁的主要解剖标志有眶下孔、尖牙窝、颧上颌点等，利用这几个解剖标志可以确定上颌窦前壁打开的范围。下壁分为前后两部分，与第二双尖牙和第一、二磨牙关系密切。上颌窦内侧壁有前、后两个增厚区，前者由下鼻甲骨升、降突及泪骨、上颌骨泪沟组成，鼻泪管位于其中；后一增厚区由下鼻甲骨筛突及钩突组成。前后两个增厚区之间较薄区域为前凶，后一增厚区与腭骨垂直板之间较薄或仅为纤维组织封闭的区域为后凶，上颌窦窦腔开口均位于前凶的上部。上颌窦后外壁呈三角形，分内外两部分，内侧打开是翼腭窝，眶下血管神经束走行于外侧壁与上壁交界处[3]。

上颌窦后壁入路是翼腭窝及颞下窝内侧区上半部分肿瘤切除的常用方法，最近有人用于海绵窦及中央颅底肿瘤的切除[4-5]。打开上颌窦后外壁内侧可暴露翼腭窝。上颌窦后外侧壁的厚度不均，其中以后部较薄，而前部相对较厚。在处理上颌窦后外侧壁时，对于较厚的骨壁可以用电钻切削，减少不必要的撕脱伤。由于眶下管内的血管神经较为粗大，走行于骨组织中，周围没有软组织，血管一旦破裂很难自行收缩。因此，术中应尽量靠下方操作，若必须对相关的部位进行手术处理，应提前对眶下血管进行处理。细心剥离上颌窦后外侧壁后部的骨膜，仔细凿开其后方上颌窦后壁的薄层骨片，避免损伤紧贴上颌窦后壁走行的上颌动脉及上颌神经的分支。凿开上颌窦后壁的薄层骨片向内不能超过上颌窦后壁与内侧壁的交界处，以免损伤穿过蝶腭孔的蝶腭动脉，或其分支鼻后外侧动脉和鼻中隔后动脉，向上不能超过上颌窦后壁与顶壁的交界处，防止误入眼眶引起眶内出血[6]。

上颌窦内上壁的后部与后筛窦之间的分隔板为筛上颌板。筛上颌板可以作为一个解剖标志，打开上颌窦后壁的薄层骨片向内不能超过筛上颌板，可避免损伤视神经及进入蝶窦。

任何单一手术入路均不能全面显露颅底的病变，应根据病变的不同特点、形态、位置和方向，选择不同的手术入路。经上颌入路为颅底肿瘤，尤其是颅内外贯通的肿瘤的手术切除提供了一个新的思路。该手术入路既能安全切除相对非功能区的骨质，又能最大限度地暴露肿瘤而又不加重对脑组织的牵拉损伤，保留正常的神经血管结构，降低术后并发症和致残率，较其它手术入路理论上能较好地满足手术的要求。作为一种新的手术入路，其具有潜在的应用前景，如果能借助微创神经外科技术的发展，利用脑内窥镜、精细磨钻和电凝设备的不断更新，手术方式、范围及效果将会明显提高。

[参考文献]

[1] Hitotsumatsu T, Rhoton AL Jr. Unilateral upper and lower subtotal maxillectomy approaches to the cranial base: microsurgical anatomy [J]. Neurosugery, 2000,46(6):1416-1453.

[2] 刘 军,高 玮,曲元明. 经上颌入路切除颅底肿瘤的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2007,34(4):357-359.

[3] 刘卫华,周启珂,李 鑫,等. 眶下管在上颌窦眶面上的解剖定位及其临床意义[J]. 华西医学,2004,19(3):365.

[4] Suarez C, Llorente JL, Munoz C, et al. Facial translocation approach in the management of central skull base and infratemporal tumors [J]. Laryngoscope, 2004,114(6):1047-1051.

[5] 杨 军,于春江,石祥恩,等. 上颌窦-翼腭窝-海绵窦手术入路的显微解剖学研究[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(3):250-254.

[6] 陈合新,徐 睿,许 庚,等. 上颌窦后外侧壁解剖学研究及其临床意义探讨[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂,2006,41(11):865-866.

(编辑:余汇洋)

(上接第378页)

[参考文献]

[1] O'Leary TJ. Standardization in immunohistochemistry [J]. Appl immunohistochem Mol Morphol,2001, 9(1):3-8.

[2] 吕宏升,朱庆生,王 军,等. 全自动显微镜及图像分析系统处理免疫组化图像[J]. 中国体视学与图像分析,2004,1(9):37-40.

[3] Schmitt O, Preusse S, Haas SJ. Comparison of contrast, sensitivity and efficiency of signal amplified and nonamplified immunohistochemical reactions suitable for videomicroscopy-based quantification and neuroimaging [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2004,12(3):157-171.

[4] 汪 薇,王诗航. 光密度值测定在实验医学研究中的应用及意义[J]. 解剖科学进展,2006,12(3):286.

[5] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京:人民军医出版社,2008.305-315.

[6] 李 涛,范 妤,刘 芳. 免疫组织化学图像光密度分析的标准化方法[J]. 解剖学杂志,2008,5(31):727-728.

[7] 汤乐民,丁 斐. 生物科学图像处理与分析[M]. 北京:科学技术出版社,2005.166-186.

(编辑:左艳芳)