

Photoshop 软件在辅助体视学测试中的潜在应用

郭洋, 向宇, 杨林凤, 杨正伟
(川北医学院基础医学与法医学院形态定量研究室, 四川 南充 637000)

【摘要】 在拟测图像上叠加测格, 然后进行测点、交点等的数量计数, 直径、点取截距等的长度测量, 此即体视学定量研究中的基本测试。Photoshop 可用于图像观察、测格制备和长度测量, 因此可用于辅助这些测试。本文简要介绍了用 Photoshop 制备测格和测量长度的基本方法, 包括如何绘制并保存可叠加但不遮盖所测图像的测格以及长度测量值的校验。
【关键词】 长度测量; 测格; Photoshop; 体视学
【中图分类号】 N3 **【文献标志码】** A

Potential application of the Photoshop software in facilitating stereological tests

GUO Yang, XIANG Yu, YANG Lin-feng, YANG Zheng-wei
(Morphometric Research Laboratory, Research Institute of Basic Medicine and Forensics School, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Counting of test points, intersections and others and measurement of lengths such as diameters and point-sampled intercepts, performed on images superimposed with test grids, are basic tests in stereological quantitative studies. The Photoshop software can be used to observe images, prepare grids and measure lengths and can therefore be used to facilitate the tests. The present study briefly described the basic methods of preparing grids and measuring lengths with Photoshop, including how to draw and save test grids that can be superimposed on but do not cover up the images to be measured, and calibration of lengths measured.
【Key words】 Length measurement; Test grids; Photoshop; Stereology

对某器官组织内某种结构的某个形态特征的体视学定量研究, 其最后一步通常是: 在随机抽选的一组测试视野(组织切片图像)上, 根据拟测指标叠加所需测格——测点、测线和/或测框, 然后有针对性的计数结构(所测组织结构在切片上形成的轮廓图像)内的测点数、测线与轮廓边线之间的交点数和/或测框内的轮廓数等, 按一定的要求测量直径、宽度、截距、点取截距、核距或转距等^[1-2]。这些数量计数和长度测量即体视学的基本测试。对于光镜切片, 较理想的测试操作是利用体视学图像系统, 在电脑屏上观察图像, 并用测格软件生成测格图案叠加在图像上, 借助机动载物台等距随机抽选切片上的测试视野, 每观察一个视野就测量一个视野^[3]。不过, 不少情况下, 尤其是在数字图像技术进步的今天, 可先获取并保存所测结构的(大量)数字图像, 以后再观察测量。这或者是因为没有体视学测试软件, 或者是为了方便以后反复的甚至不同的观测。这样的数字图像不仅包括光镜和电镜显微图像, 也

包括医学影像、扫描图、照片等。Photoshop (Adobe 公司) 是常用的数字图像的观看和处理软件, 也具有绘制测格和长度测量的功能, 因此在体视学基本测试中有潜在应用价值。不过, 这方面的应用不多, 笔者实验室最近有一些运用体会^[4-5], 因此在这里简要介绍一下用 Photoshop 制备测格和测量长度的基本方法。

1 测格绘制

Photoshop 可以生成平行线(等间距的横线或竖线)或网格(由横线与竖线交叉而成)叠加在图像上。线条(横线或竖线)、横竖线条的交叉点以及线条围成的长方框, 可分别当做体视学的基本测试工具: 测线、测点和测框^[1]。

网格可直接生成。例如, 用 8.0.1 版本的 Photoshop (简体中文版), 选【编辑】(菜单栏)、【预置】(下拉菜单)、【参考线、网格和切片】(2 级菜单)即弹出网格设置的对话框。在该窗口上设置网格线的

间隔(甚至包括【子网格】设置)、颜色和样式等,然后执行【视图】-【显示】-【网格】即可显示所设置的网格。这种方法操作简单,一旦设置好,每次打开图像即有网格显示。

生成平行线或网格的第二种方法,是叠加参考线。例如,用 20.0.4 版本的 Photoshop (简体中文版),【视图】下有菜单可自定义设置参考线的行数和列数,由此生成所需平行线或网格(其横线间距与竖线间距未必相等)。(参考线的颜色、样式,仍需在【参考线、网格和切片】菜单上设置。)单击对话框上的【预设】(下拉按钮),然后在预设列表中选择【存储预设】,键入存储名称后【保存】,即可把所设置的参数存入系统。以后每次打开图像,选【新建参考线版面】点击确定即可显示参考线。

用上面两种方法生成的网格线条的粗细都不能设置;不过,从实用的角度看,这些线条的粗细合适,适于体视学测量。见图 1。此外,用上面两种方法生成的网格(或线条)均无法打印或保存于图像中。

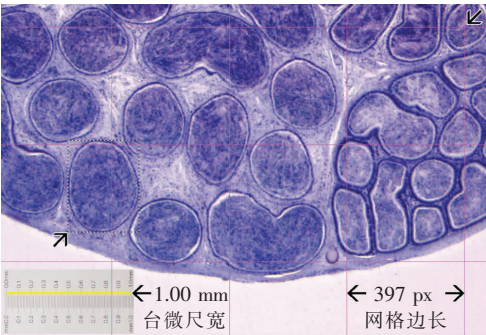


图 1 一张光镜照片在 Photoshop 上的观测

光镜照片拍摄自一张成年大鼠附睾切片(苏木精染色)。相同放大倍数下拍摄的台微尺的一部分,插入在照片的左下角。照片上叠加有网格线(红色,用 Photoshop 生成),横向和纵向网格线之间的交叉点可当做测点(↖)用,网格线和网格可分别当做测线和测框用。用 Photoshop 测得的图像大小:1.00 mm 的台微尺长度——箭头(←)所指黄线的横向宽度,420 px、14.82 cm;网格线间隔(网格边长、测点间距),397 px、14 cm;箭头(↗)所指附睾管轮廓(被覆上皮围成,近似椭圆形)的横径/纵径(矩形选取框的宽度/高度),241/313 px、8.50/11.04 cm。用台微尺校准之后,即考虑放大倍数(=14.82 cm÷1.00 mm=148.2)之后,网格线的真实间隔为 0.94 mm,箭头(↗)所指附睾管轮廓的真实横径、纵径分别为 0.57、0.74 mm。

Photoshop 也可手绘测格:用 Photoshop 工具和鼠标绘制。体视学基本测试常用的测格(几何元素),只是由短横线与短竖线交叉形成的测点,较长直线构成的测线,以及直线围成的测框^[1]。用 Photoshop 可手绘直线,并调节其长短、粗细、颜色、方向,还可任意移动,因此可用于设计实际测试所需的各种测格^[1-2]。见图 2。

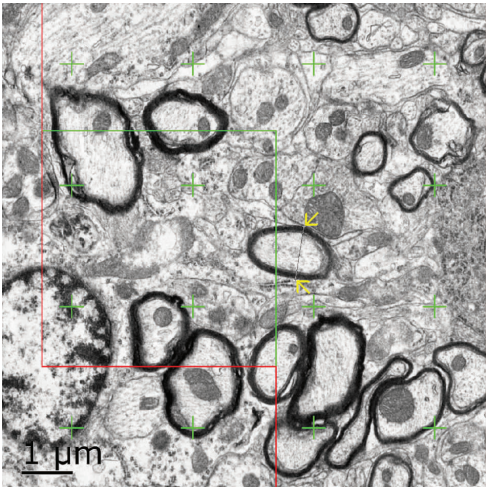


图 2 一张透射电镜照片在 Photoshop 上的观测

电镜照片拍摄自一张成年大鼠脊髓背角超薄切片。照片的左下角有电镜添加的一段标尺(1 μm 宽)。照片上叠加有测格(用 Photoshop 制作并粘贴):16 个测点(绿色十字线的交叉点)和 1 个测框(禁线框,由 3 条红线与 2 条绿线围成)。用 Photoshop 测得的图像大小:1 μm 的标尺长度(横向宽度)7.66 cm;测点间距(横向或纵向),18.06 cm;测框宽度或高度,35 cm;一个有髓神经纤维轮廓(似椭圆形)的短径(黄色箭头↖和↗所指线段长),7.95 cm。用标尺校准之后,即考虑放大倍数(= 7.66 cm÷1 μm = 76 600)之后,测点的真实间距为 2.36 μm,测框的真实边长为 4.57 μm,有髓神经纤维(黄色箭头所指)的真实短径为 1.04 μm。

手绘测格的一个简便方法是用工具栏的【直线工具】。用它可画任意长短、任意方向的直线,并可设置其【粗细】(像素)和【颜色】等。所画直线可这样快捷复制:按住“Alt”键,选【移动工具】,用鼠标拖动所画直线。对于由多条线段构成的部分图案(例如一个测点或测框)或整个图案,可【合并拷贝】然后粘贴,接着用【移动工具】将其移动到所需位置。注意,合并拷贝前要删除背景(在【图层】面板上删除);或者,在新建文件时,在新建文件的弹出窗口上把【背景内容】设置为【透明】,然后再绘制测格。画好测格并确定无背景之后,将测格保存为 TIFF 或 PSD 文件——有测格图层但没有背景的“透明测格”图像文件。以后打开“透明测格”,即可将之复制粘贴在所测图像上。(注意,如果测格图案保存为 JPEG 文件,复制粘贴的测格将包含背景,测格及其背景会完全覆盖所测图像,因此无法观测图像。即使将测格图案保存为有测格图层的 TIFF 或 PSD 文件,如果它还有背景色,以后合并拷贝的测格图案也将包含背景。)如用的是新版 Photoshop,用直线工具画好测格后,也可将测格存入系统:选【编辑】-【定义图案】,在对话框上键入图案名称然后保存;以后在所测图像上执行【编辑】-【填充】,在对话框上先选【内容】下拉列表里的【图案】,再单击

【自定图案】按钮,在弹出图案列表中选测格图案,即可将之前保存的测格叠加在图像上。

工具栏的【钢笔工具】(新版 Photoshop 的较好),也可用于手绘测格。

同一测格中有多组测点时,其中一组测点(通常是间距较大的测点)常用四分之三象限的圆弧线标示(每个测点周围画一条适当长度的圆弧线),以示与其他测点的区别^[1]。圆弧线可用 Photoshop 画。例如用新版 Photoshop,选工具栏的【椭圆选框工具】,按住“Shift”键并拖动鼠标绘制一个正圆,再选【弯度钢笔工具】即可绘制圆弧线。

2 长度测量

2.1 长度测量方法

用 Photoshop 测量长度的第一种方法是用工具栏里的【矩形选框工具】。如图 1 所示,用矩形选框圈定所测结构的上端和下端(即矩形选框的上边缘和下边缘分别与结构的上端点和下端点相切)和/或所测结构的左端和右端(即矩形选框的左边缘和右边缘分别与结构的左端点和右端点相切)之后,即可在【窗口】-【信息】面板上查看所测结构在 Y 轴(上下)方向的高度(H)和 X 轴(左右)方向的宽度(W)——厘米值,即所测结构(轮廓)分别在 Y 轴和 X 轴方向的 Feret 直径^[1]。另,也可拷贝矩形选框选取的区域,然后新建文件,这样就可在新建文件的弹出窗口上查看图像(所选结构)的高度和宽度——像素或厘米值等。工具栏里的【矩形工具】,也有测量高度和宽度的功能。

第二种方法是用工具栏里的【度量工具】。用它可测量图像上任意两点之间的距离(图 2):选【度量工具】,用鼠标在所测图像上点住一点然后拖动到另一点,【信息】面板即显示这两点之间的距离(D)——厘米值。这种方法适于测量任意方向(不仅限于上下或左右方向)的两点间的距离——Feret 直径、点取截距等^[1]。工具栏里的【直线工具】,也有显示所画或所测线段长度的功能。

2.2 真实长度的换算

用 Photoshop 测得的长度值(像素、毫米、厘米或英寸),要考虑图像的缩放情况,即要除以一个缩放系数以换算成真实长度值:

$$\text{真实长度值(毫米、厘米或英寸)} = \text{测得的长度值} \div \text{缩放系数} \quad (1)$$

式中的缩放系数要用标尺(见后面的讨论部分)来确定。

缩放系数有两种。如测得的长度值是像素值,那么其缩放系数为像素缩放系数,即单位长度(例如 cm)的标尺(没有缩放的真实尺寸)所对应的标

尺图像(缩放后)的像素值(px):

$$\text{像素缩放系数(px/cm)} = \text{标尺图像的像素} \div \text{标尺的真实长度} \quad (2)$$

如测得的长度值是尺寸(毫米、厘米或英寸),那么其缩放系数为尺寸缩放系数,即单位长度(毫米、厘米或英寸)的标尺(没有缩放的真实尺寸)所对应的标尺图像(缩放后)的尺寸(毫米、厘米或英寸):

$$\text{尺寸缩放系数} = \text{标尺图像的尺寸} \div \text{标尺的真实尺寸} \quad (3)$$

这个尺寸缩放系数,对于放大观测的图像而言,即人们常说的放大倍数。具体如何把测得的长度值换算成真实长度值,见图 1 和图 2 的图注。

3 讨论

常用且易获得的 Photoshop 软件可用于图像观察、测格制备和长度测量,因此可用于辅助体视学测试。这是基于体视学原理的测试,其基本测试指标是测格(测点等“几何探针”)与所测图像(结构)之间的交互作用结果(例如击中所测结构的测点数、测线穿过所测结构的截距长度),由此进一步根据体视学原理估计所测结构的体积、表面积、长度以及粒子的数量、大小等^[1-2]。这不同于针对数字图像本身的、基于像素特征的半自动或全自动分析,它属于专门的图像分析或识别领域^[1,6-7],不是本文所涉及的内容。虽然借助 Photoshop 的长度测量实质上也是图像分析,但这个图像分析只是应用体视学方法进行定量研究的过程中涉及的一个环节,采用的一个工具。此外,也许有比 Photoshop 更好的图像分析软件可同样用于体视学辅助测试;如果读者有或可获得这样的软件,可试用。

对于 Photoshop 所测图像,务必要注意其缩放倍数,即图像上测得的长度(像素或厘米值),需要校准(calibration)以换算成真实尺寸(厘米值),见上面的公式。校准的基本方法是,在摄取所测图像的同时缩放倍数下,摄取标尺图像。这里的标尺指的是具有标示真实尺寸的刻度的标准样品,例如光镜用的台微尺(stage micrometer)^[1],电镜用的光栅复型(grating replica)^[8],扫描或照相用的普通直尺或三角尺。因为数字图像是由等大的像素(小方点)构成,所以数字图像的像素多少与图像尺寸是呈正比的,因此可通过对比图像与标尺的尺寸来确定真实尺寸的换算比例。

现在的电镜具有给照片添加标尺的功能,这个标尺就是用于校准的(图 2)。对于扫描仪原图大小(100% 缩放)扫描的图像,其图像尺寸(厘米值)应该就是其真实尺寸。对于磁共振或 CT 等连续断层图像,要注意获得其真实断层间距和真实图像大小。

笔者不熟悉如何确定这种医学图像的真实大小,但了解到有学者在测量这种图像时没有注意这个问题。

对于所测图像,也要注意其是否有变形,即观测图像是不是实际所观测结构均匀(不变形)缩放后的图像。检测图像是否变形的的方法之一,是在不同(视野)位置摄取标尺图像,比较本应该相同的刻度在不同位置是否相同。用显微镜摄取的切片图像,质量应该是最高的;扫描仪扫描的“平整物体”(例如组织切片^[4])的图像,质量也应该不错。但相机拍摄的实物图像会有变形(尤其是拍摄角度倾斜时):在平面图像上测得的某些尺寸未必等于立体实物本身的有关尺寸,且这样的尺寸即使有标尺(例如实物旁边放置的直尺)校验也未必准确。此外,对所观测图像还要注意其分辨率,分辨率不够将影响结构的准确辨认与测量。

用 Photoshop 观测图像时,为了看清结构、准确测试,可适当缩放图像(这个应用 Photoshop【缩放工具】的视图“缩放”不改变图像的像素或分辨率)甚至调整图像质量(例如对比度和亮度)后观测;需要在随机方向测量长度时,也可把图像旋转(沿一个随机确定的角度)后进行;测量的结构可在图像上标记,测量的结果(例如计数的数量)也可标记或记录在图像上。此为用 Photoshop 进行测量的优点。

笔者曾了解到,有学者试图用 CorelDRAW 软件(Corel 公司)分析数字图像,笔者认为这很不合适:虽然用这个软件可以绘制测格,但它不是数字图像的观测软件。

Photoshop 有新旧版本,功能多,操作窍门也多^[9]。熟悉其在某方面的具体操作运用,需要实际尝试与应用。本文只是讲了测格绘制与长度测量的一些基本方法,希望对感兴趣的读者能起到一定的指引作用。

体视学应用研究中,或者说每个生物器官(组织)的某种结构的体视学定量研究中,需要测量多少幅什么切片图像,需要设计什么测格图案来测量,如何运用测格进行什么具体的基本测试(测点计数或长度测量等)以及如何从这些基本测试结果计算最后的估计结果(平面轮廓的面积、周长等或三维结构的体积、表面积等)等,属于体视学范畴的问题^[1-5]。本文主要讲的是,如果研究者手头上获得

有可用于体视学测量的图像(文件)组,就可借助普通的 Photoshop 软件来辅助体视学的基本测试,主要是图像观察、测格制备和长度测量方面的辅助。这明显优于把拟测图像打印出来后在纸质图片上的测量:先把测格图案印制在透明胶片上,然后把透明胶片测格叠加在图片上,接着再进行体视学测试^[1]。不过,对于光镜切片而言,用 Photoshop 的测试辅助远不如用体视学图像系统的测试辅助——在电脑显示器上实时观测切片图像——那样的简便、专业(见前言部分)。例如,用体视学图像系统可任意“选择”测格而不需测试者自己绘制测格,可根据体视学要求随机旋转测线方向,可直接显示不同放大倍数(物镜)下测量的长度结果(不需进行长度换算但需要事先校验测试系统的放大倍数)甚至同时完成长度相关的体视学指标(例如体积)的计算,可实现光学体视框技术(在厚切片内直接计数粒子)^[1,3,10]。

参考文献

[1] 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.

[2] 杨正伟. 体视学测试设计的几点考虑 [J]. 中国体视学与图像分析, 2015, 20(2): 180-184.

[3] 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.

[4] Xiang Y, Guo Y, Yang ZW. A study of area and thickness compression of paraffin sections [J]. Image Analysis and Stereology, 2018, 37(3): 205-212.

[5] 杨林凤, 黄静, 杨雁琪, 等. 神经生长因子对坐骨神经损伤大鼠脊髓内神经纤维的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(6): 677-682.

[6] 丁晓平, 申洪. 病理组织结构定量的显微测试网格与图像分析仪测试的比较 [J]. 中国体视学与图像分析, 1999, 4(2): 102-105.

[7] 耿辰, 汤松岭, 龚伟, 等. 一种基于深度学习多分类模型的肺部细胞病理涂片鉴别诊断方法 [J]. 中国体视学与图像分析, 2023, 28(1): 48-55.

[8] 江闰德. A549 细胞超微结构体视学研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.

[9] 敬伟. Photoshop 2022 从入门到精通 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2022.

[10] 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.

(收稿日期: 2024-09-04 修回日期: 2024-10-17)