

- 6 Manickam A, Sivanandham M. Mycobacterium bovis BCG and purified protein derivative - induced reduction in the CD80 expression and the antigen up - take function of dendritic cells from patients with cervical cancer[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011, 159(2): 413 - 417
- 7 高立芬, 孙汶生, 马春红, 等. pcDNA3 - HBV 瞬时转染对树突状细胞的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45(4): 325 - 328
- 8 董加秀, 赵守松, 高继君, 等. 慢性乙型肝炎感染者外周血树突状细胞亚群与血清 HBVDNA 的关系研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(3): 167 - 170
- 9 彭建平, 孙克伟, 伍玉南. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞诱导的 HBV 特异性细胞毒性 T 细胞 PD - 1 的表达[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(12): 926 - 929 (收稿日期: 2012 - 07 - 17) (修回日期: 2012 - 10 - 08)

## 计算机图像分析行肾结晶评分的可行性研究

卢 锋 张士青 谭桂梗

**摘 要** **目的** 探索计算机图像软件 Image - Pro. Plus(IPP)在肾结晶评分中的可行性。**方法** 对 Olympus IX - 51 显微镜获取的 4 组 40 张 HE 染色的肾切片图像用 IPP 进行结晶物理参数测量, 筛选出最佳参数, 并与结晶的人工镜下直接评分进行稳定性和可靠性的比照。**结果** 结晶面积是 IPP 测量的最佳参数, 可实现结晶评分的无级量化, 稳定性和可靠性均优于人工分级评分法。**结论** IPP 结晶评分具有良好的精确性、可靠性及稳定性, 尤其适于批量处理。

**关键词** IPP 结晶 评分 稳定性 重复性

**Feasibility Calculating of the Renal Crystallization Score with Computer Image Analysis.** Lu Feng, Zhang Shiqing, Tan Guigeng. Department of Urology, No. 3 people's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

**Abstract Objective** To study the feasibility of calculating the renal crystallization score with computer image analysis. **Methods** Forty HE staining slice were divided into four groups. Olympus - IX51 microscope was used to obtain these slices picture. These images were test with software IPP and the crystallization information of physical measurement parameter were obtained. The best score parameter were filter out and stability and reliability compared were with artificial direct endoscopic score of crystallization. **Results** Area of crystallization was the best parameter in the measurement of software IPP. IPP crystallization score could obtain the parameter information of crystallization full quantitatively and its stability and reliability were much better than artificial grading score. **Conclusion** IPP crystallization score has good accuracy, reliability and stability, which is especially suitable for the crystallization of the score batch processing.

**Key words** IPP; Crystallization; Score; Stability; Repeatability

目前在肾结石的动物实验研究中, 肾结石形成程度的量化评估, 是由研究者在光学显微镜下观察肾脏 HE 染色切片中的结晶情况, 并按评分标准作出评分。国内外研究者采用的评分标准各不相同, 但都属于半定量的分级评分法, 其特点是定量精度差, 分级时评分者的主观性较大, 对同一批切片, 不同评分者评分的一致性、同一评分者不同时间评分的一致性均较差, 因此, 可靠性和稳定性均不理想<sup>[1~4]</sup>。要提高结晶评分的可靠性和稳定性, 就必须在评分时避免人为主观因素的介入。采用计算机图像分析软件进行结晶情况的客观测量可能是实现评分的精确化、客观

化和全量化的理想方向。为此, 我们采用计算机图像分析软件 Image - Pro. Plus, 对肾草酸钙结石模型大鼠的肾脏 HE 染色切片进行数据分析处理, 研究其对结晶情况进行精确、客观、定量测评的可行性、可靠性和稳定性。

### 材料与方法

1. 材料: (1) 计算机图像分析软件: Image - Pro. Plus (简称 IPP) 6.0, 购自 Media Cybernetics 公司。(2) 分析图像: 40 张 Wistar 大鼠肾 HE 染色切片, 其中有空白对照组、单纯 1% 乙二醇诱石组、诱石 + 干预剂 A 组、诱石 + 干预剂 B 组各 10 张, 每组 5 只大鼠。由研究人员在放大 200 倍的 Olympus IX - 51 光学显微镜下逐一观察, 在每一张切片中, 选择 1 个结晶分布最集中、数量最多的视野作为代表性视野, 摄取数码照片, 共 40 张。

2. 方法: (1) 结晶的人工评分: 按盲法要求, 对 40 张切片照片进行随机编号, 由本课题组的 2 位研究人员分别观察每

作者单位: 201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院泌尿外科

通讯作者: 张士青, 硕士生导师, 电子信箱: uclazsq@163.com

张切片照片中的结晶分布和数量情况,参照安瑞华介绍的标准略作修正进行评分,记录每人观察评分 40 张照片所用时间<sup>[1]</sup>。比较两人评分差异,并作一致性检验。1 周后其中 1 人再次对照片观察评分,比较其两次评分的差异,检验其一致性。(2)结晶的 IPP 软件测量:1)确定 IPP 的最佳结晶测量参数:将上述 2 位研究人员评分一致的图片全部选出,按分值归类;随机取一张评分为 4 分的图片,用 IPP 软件对其进行数据处理。分别统计各分值图片中结晶的面积、吸光度及两者乘积的均值和标准差,统计这些参数与结晶的人工评分值的相关性;选出与人工评分值相关性最佳的参数,用聚类分析方法确定该参数与人工评分各分值相对应的边界范围。2)评估 IPP 软件测量结晶的稳定性与可靠性:由本课题组的 2 位研究人员各自用 IPP 软件,选取合适的 RGB 分色参数,并结合确定的最佳结晶测量参数,编制成“宏”,对 40 张图片进行批量测算并记录每人评分 40 张照片所用时间。比较两位操作者的 RGB 分色参数设置差异和最佳参数测算值差异,并作一致性检验,以检验可靠性;其中 1 位研究人员于 1 周后重复上述流程,对 40 张图片再次进行批量测算。比较其前后两次的测算差异,并作一致性检验,以检验稳定性。

3. 统计学方法:人工结晶评分的一致性分析采用 *Kappa* 检验;RGB 分色参数、最佳参数测算值的一致性分析采用组内相关系数(ICC)检验,人工评分各分值对应的最佳参数分界值确定采用快速聚类分析法<sup>[5, 6]</sup>。

结 果

1. 人工结晶评分情况:不同评分者的评分见表 1, 其 *Kappa* 值为 0.3605, 加 权 *Kappa* 值为 0.6203;

表 3 分级一致性比较

| <i>Kappa</i> | 0       | I       | II       | III      | IV      |
|--------------|---------|---------|----------|----------|---------|
| 不同观察者        | 0.93898 | 0.08571 | 0.20000  | -0.09375 | 0.47299 |
| 同一观察者前后      | 1.00000 | 0.08571 | -0.03738 | 0.13420  | 0.62441 |

2. 结晶的 IPP 最佳测量参数:结晶的面积、吸光度及两者乘积与人工评分值的 *Spearman* 相关系数分别为 0.8486、0.7498 和 0.8309。相关系数最高的为

表 4 人工评分各分值所对应的 Area 值和聚类分析方法确定的划界值(像素)

| 项目                | 0                | I                 | II                | III                | IV                 |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Area( $m \pm s$ ) | 25.71 $\pm$ 9.02 | 65.81 $\pm$ 35.00 | 86.81 $\pm$ 54.10 | 105.79 $\pm$ 64.37 | 163.87 $\pm$ 74.13 |
| 对应 IPP 分界范围       | <44.12           | 44.12 ~ 106.70    | 106.71 ~ 169.26   | 169.27 ~ 237.84    | >237.84            |

3. 两位操作者选取的 RGB 分色参数差异、IPP 结晶面积测量值差异和评分所用时间:两位操作者 RGB 分色参数的选择分别为:A:R:189 ~ 212;G:206 ~ 255;B:125 ~ 255;B:R:185 ~ 212;G:210 ~ 255;B:125 ~ 255。两者所用评分时间分别为 35 和

同一评分者前后两次的评分见表 2,其 *Kappa* 值为 0.3831,加权 *Kappa* 值为 0.6716;各分级一致性比较见表 3;评分 40 张照片所用时间分别为 48 和 45min。

表 1 不同观察者评分比较

|                  |     | 观察者 A |      |      |      |      |    | A 的评分 |
|------------------|-----|-------|------|------|------|------|----|-------|
|                  |     | 0     | I    | II   | III  | IV   | 合计 |       |
| 观<br>察<br>者<br>B | 0   | 11    | 0    | 0    | 0    | 0    | 11 | 0.08  |
|                  | I   | 1     | 1    | 2    | 2    | 0    | 6  | 2.00  |
|                  | II  | 0     | 2    | 4    | 2    | 1    | 9  | 2.27  |
|                  | III | 0     | 1    | 5    | 1    | 1    | 8  | 2.63  |
|                  | IV  | 0     | 0    | 0    | 3    | 3    | 6  | 3.40  |
| 合计               |     | 12    | 4    | 11   | 8    | 5    | 40 |       |
| B 的评分            |     | 0     | 1.83 | 2.22 | 2.25 | 3.50 |    |       |

0 ~ IV 为不同的分级;突出显示为不同评分者评为相同等级的图片数量

表 2 同一观察者前后评分比较

|        |     | 前次 |      |      |      |      |    | A 的评分 |
|--------|-----|----|------|------|------|------|----|-------|
|        |     | 0  | I    | II   | III  | IV   | 合计 |       |
| 后<br>次 | 0   | 12 | 0    | 0    | 0    | 0    | 12 | 0     |
|        | I   | 0  | 1    | 5    | 0    | 0    | 6  | 1.75  |
|        | II  | 0  | 3    | 3    | 5    | 1    | 12 | 2.09  |
|        | III | 0  | 0    | 3    | 2    | 1    | 6  | 2.50  |
|        | IV  | 0  | 0    | 0    | 1    | 3    | 4  | 3.40  |
| 合计     |     | 12 | 4    | 11   | 8    | 5    | 40 |       |
| B 的评分  |     | 0  | 1.83 | 2.33 | 2.67 | 3.75 |    |       |

0 ~ IV 为不同的分级;突出显示为不同评分者评为相同等级的图片数量

面积,故将面积作为结晶的 IPP 最佳测量参数;与人工评分各级分值相对应的面积均值及使用聚类分析方法确定的划界值见表 4。

32min。两位操作者用 IPP 测得的 40 张切片图片结晶面积分别为 83.56  $\pm$  59.31 及 89.40  $\pm$  72.27,方差分析的值为  $\chi^2 = 0.03$ ,  $P = 0.863$ ;组内相关系数(ICC)的值为 0.9537。

4. 同一操作者前后选取的 RGB 分色参数差异和

IPP 结晶面积测量值差异和评分所用时间:RGB 分色参数的选择分别为:前:R:189 ~ 212;G:206 ~ 255;B:125 ~ 255;后:R:187 ~ 213;G:205 ~ 255;B:125 ~ 255。前后所用评分时间分别为 35 和 28min。操作者前后用 IPP 测得的 40 张切片图片结晶面积分别为  $83.56 \pm 59.31$  及  $94.97 \pm 71.82$ ;方差分析的值为  $\chi^2 = 0.59$ ,  $P = 0.446$ ;组内相关系数 (ICC) 的值为 0.9005。

## 讨 论

目前对动物实验中肾 HE 切片中结晶的数量及分布情况,多采用光镜下观察,并按一定的分级标准进行评分。国内多采用形态分级评分法<sup>[1]</sup>。有些研究者对此标准略作改进以更加符合自己的研究要求<sup>[7,8]</sup>。国外多采用计数分级评分<sup>[3]</sup>。也有研究者采用分级定义不明确的粗略分级评分法<sup>[2,4]</sup>。在理论上,结晶的计数分级评分法的量化度优于形态分级评分法,但在实际操作中,由于结晶的生长多呈堆迭状,故在显微镜下精确计数结晶堆中的结晶数量绝非易事,观察者往往只能以估算代之。形态分级评分法虽然以“点、堆、连接、片”4 种形态判断绕过了立体计数的难题,但由于其未对“堆”、“互相连接”和“片”的形状和大小作出精确定义,导致相互间的分界不够明确,存在明显的分界灰区,令观察者作结晶分级时,会感到难以定夺,而只能以“自由心证”方式进行裁决。

光镜下对结晶进行观察评分,还涉及到一个视野选取的问题。因为在同一张有结晶的肾切片中,结晶的分布是不均匀的,大小是不一致的,观察者眼中的结晶评分值会随着视野的移动而变化。因此,观察者在评分时,必须选定并统一视野。在实践中,有 3 种单视野法和两种多视野法可供选择:3 种单视野法分别为高、中、低值单视野法;两种多视野法分别为随机多视野平均法和规定多视野平均法。显然,多视野法要比单视野法费时费事。由于上述的计数分级评分法和形态分级评分法均未规定光镜下的观察视野选取标准,从而造成研究者在选择视野法时拥有绝对的自主权。如果研究者在其研究报告中未说明采用了何种视野法,或虽有提及但各家方法不一,都会导致各研究者的研究结果丧失横向可比性。从笔者所阅的已发表的含有结晶评分内容的研究文献看,其采用的视野法基本上都未被作者提及。本研究采用高值单视野法。笔者认为,对研究预防肾结石的动物实验而言,在光镜下进行人工观察评分,应该统一采用高

值单视野法,以更客观地评价干预措施对肾结石的预防效果,避免人为的夸大倾向。

评价一个观测方法的可靠性和稳定性如何,最主要的是看两个或多个观测者对同一稳定事物,或同一观测者对同一稳定事物的两次或多次观测结果是否一致<sup>[9]</sup>。本研究结果表明,采用形态分级评分法对同一批肾脏切片进行结晶的人工光镜下观察评分,无论是不同观察者抑或是同一观察者前后所给的评分,其一致性均差。

在光镜下人工观察评分肾结晶的另一个缺点是耗时费力,本研究两位研究人员人工评分 40 张照片平均耗时 46.5min。如果一项研究有 10 个观察组,每组有 8 个研究个体,每个个体取 2 张切片,每张切片取 10 个视野,就会产生 1600 张照片,若全部在镜下观察评分,其所需的时间更是惊人,且可靠性及重复性更难以保证。

近来,台湾学者自行设计计算机辅助评分系统进行肾结晶评分,在一定程度上可避免个体主观判断的介入<sup>[10]</sup>。然其评分标准仍然沿用半定量分级,完全舍弃了计算机辅助评分所具有的可实现全定量无级化评分的优势<sup>[11]</sup>。

IPP 图像处理软件广泛运用于医学领域,尤其是在免疫组化中被广泛用于各种数据的处理与计算。笔者发现 IPP 用于肾结晶的评分,具有极大的优势:①结晶与背景的对比十分强烈,便于分色选取,干扰小;②利用白平衡可有效保证每张切片所获取的图像背景具有较好的一致性;③将结晶的面积及吸光度等精确的物理参数直接作为评分依据,实现无级化评分,使结晶评分的精确度发生了质的飞跃。另外,用计算机自动测量结晶评分参数,避免了操作者的主观性介入,故评分的可靠性和稳定性大为提高。本研究中,不论是两位操作者分别利用 IPP 软件对同一批照片进行结晶评分或是同一操作者先后对同一批照片进行结晶评分均显示出高度的一致性,表明其可靠性与稳定性远优于人工评分。通过“宏”的编制和运用,可使大量的切片图像得以批处理的方式进行快速测量,本研究两位研究人员用 IPP 评分 40 张切片照片平均耗时 33.5min,低于人工评分的 46.5min。

IPP 对于图片的清晰度有着较高的要求,为确保所摄图片的清晰度,在摄取显微镜下的放大图像时,要精确对焦和适度曝光。结晶的 RGB 分色范围设置十分关键,据我们的反复试验,取 R 值 189 ~ 212;G 值 206 ~ 255;B 值 125 ~ 255,可使结晶的实际存在范

围与自动选定范围的重合度最佳,同时背景着色最小。研究者可根据自己的实际情况,对上述参数略作微调。笔者发现,只要选取的 RGB 分色值差异小于10,其测出的结晶参数的差异将不具统计学意义。

聚类分析是将抽象对象的集合分组成为由类似的对象组成的多个类的分析过程,广泛用于包括数学、统计学、生物学等领域,尤其是近来在数据挖掘上受到广泛的重视<sup>[12, 13]</sup>。为了解 IPP 全定量无级化评分法与传统的半定量形态分级评分法各分值的对应关系,笔者采用快速聚类分析方法,以形态分级评分法的5个分值为基准,将 IPP 测得的结晶参数进行对应划界,使分别采用 IPP 无级评分法和人工形态分级评分法进行评估的研究结果之间具有了可比性。值得强调的是,IPP 法是无级化的定量评分法,其精确性、可靠性和稳定性均远高于半定量的人工分级评分法。因此,理应以 IPP 法取代后者,成为今后结晶评分的金标准,而不应将 IPP 的分值折算成传统的分级分值后进行结晶分级。

#### 参考文献

- 1 安瑞华,冯陶,郭应禄,等. 香豆素对实验性大鼠草酸钙结石形成的影响[J]. 中华泌尿外科杂志, 1994, 15(3):209-212
- 2 李瀛辉,张心湜,陈明村,等. Characterization of ethylene glycol-induced urolithiasis model in rats[J]. 中华民国泌尿科医学杂志, 1991, 2(3):518-524
- 3 Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid Peroxidation in ethylene

glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis[J].

The Journal of Urology, 1997, 157(3):1059-1063

- 4 Gupta M, Tuncay OL, Valderrama E, et al. Inhibition of calcium oxalate urolithiasis in a rat model of lithogenesis using bisphosphonates[J]. Journal of Endourology, 1997, 11(1):1-4
- 5 李春波,何燕玲,张明园. 一致性检验方法的合理应用[J]. 上海精神医学, 2000, 12(4):228-232
- 6 余红梅,罗艳虹,萨建,等. 组内相关系数及其软件实现[J]. 中国卫生统计, 2011, 28(5):497-500
- 7 张士青,李文峰,顾欣. 钙拮抗剂抑制大鼠肾草酸钙结石生成的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27[增刊(2)]:57-60
- 8 钟宇森,蔡罗蒋. 肾茶提取物抑制小鼠草酸钙结石作用研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(7):1-2
- 9 张士青,潘惟昕,盛兴标. S-L 问卷短期复测的稳定性研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1998, 19:728-732
- 10 Tsai CH, Chen YC, Chen LD, et al. A traditional Chinese herbal antilithic formula, Wulingsan, effectively prevents the renal deposition of calcium oxalate crystal in ethylene glycol-fed rats[J]. Urological Research, 2008, 36(1):17-24
- 11 Tsai CH, Pan TC, Lai MT, et al. Prophylaxis of experimentally induced calcium oxalate nephrolithiasis in rats by Zhulingtang, a traditional Chinese herbal formula[J]. Urol Int, 2009, 82(4):464-471
- 12 王子林. 聚类分析在各地区居民消费价格分类指数中的应用[J]. 科技创业月刊, 2012, 2:55-56
- 13 蒋志伟,尚磊,徐勇勇,等. 应征男青年体质状况评价的方法[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(11):1050-1052

(收稿日期:2012-08-30)

(修回日期:2012-10-15)

## 肝脏上皮样血管平滑肌脂肪瘤的 MRI 诊断

李凤琪 钱海峰 祝跃明 丁玉芹 胡祥华

**摘要** 目的 探讨肝脏上皮样血管平滑肌脂肪瘤(epithelial angiomyolipomas, EAML)的 MRI 表现。方法 回顾性分析9例经病理证实的肝 EAML 的 MRI 表现。9例患者均行 MRI 平扫和多时相动态增强扫描,其中3例行 CT 检查。结果 9例肝 EAML 均为单发的类圆形肿块,边界清晰;5例位于肝脏左叶,3例位于肝脏右叶,1例位于尾叶;MRI 平扫表现为 T<sub>1</sub>WI 稍低信号、T<sub>2</sub>WI 稍高信号,抑脂 T<sub>1</sub>WI 信号减低不明显;增强模式为“快进慢出”型;动脉期8例病灶可见“早期引流静脉”,3例在门脉期和延迟期“假包膜”征,6例在动脉期和2例门脉期可见“中心强化血管”征。结论 肝脏上皮样血管平滑肌脂肪瘤的 MRI 表现具有一定的特征性,有利于肝 EAML 的诊断及鉴别诊断。

**关键词** 肝脏肿瘤 上皮样血管平滑肌脂肪瘤 磁共振成像

**Diagnosis of Hepatic Epithelioid Angiomyolipoma by MRI.** Li Fengqi, Qian Haifeng, Zhu Yueming, Ding Yuqin, Hu Xianghua. Department of Radiology, Huzhou Central Hospital, Zhejiang 313000, China

作者单位:313000 浙江省湖州市中心医院放射科(李凤琪、钱海峰、祝跃明);200032 上海,复旦大学附属中山医院放射科(丁玉芹);323000 浙江省丽水市中心医院放射科(胡祥华)

通讯作者:李凤琪,电子信箱:li-fengqi@163.com