

# 106 例正常人窦房结图像分析<sup>①</sup>

罗 斌<sup>1,②</sup> 宋一璇<sup>1</sup> 祝家镇<sup>1</sup> 姚青松<sup>2</sup>  
梁尚猷<sup>2</sup> 谢建华<sup>3</sup> 曾家乐<sup>3</sup>

(1 中山医科大学法医病理学教研室; 广州, 510089

2 广州市刑事科学技术研究所 3 东莞市刑事科学技术研究所)

**提 要** 运用新式纵切窦房结的取材法, 切取 106 例无明显心脏疾患的法医解剖案例之人体窦房结(SAN)标本。在 SAN 纵切最大面积区域, 取 2  $\mu\text{m}$  厚切片数张, HE 及 Betty 特殊染色, 应用计算机显微图像分析系统测量每例 SAN 纵切最大面积, 并算出出生 2 d~83 岁范围 7 个年龄组 SAN 面积均数。分析其面积大小与年龄改变的量化指标。

**主题词** 窦房结/解剖学和组织学; 图像处理, 计算机辅助

**中图分类号** R322.11; D919.1

心脏传导系统(cardiac conducting system, CCS)是由特殊分化的心肌细胞和间质构成。其主要功能是产生并传导冲动, 也就是产生并维持心脏正常的节律(80 次/min 左右), 并保证心房、心室收缩和舒张的协调。传导系统是由窦房结(SAN)、房内束、房室结(AVN)、房室束(HIS 束)、左右束支及其终末纤维网等组成<sup>[1]</sup>。本研究应用计算机显微图像分析测量尸解人体心脏 SAN 纵切最大面积, 旨在探讨 SAN 面积大小与年龄变化的关系, 为国人传导系统形态学改变与人体衰老、法医猝死的关系提供基础性理论依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 标本来源

106 例心脏标本取自 1989 年 10 月~

1993 年 4 月本校法医病理教研室和广州市、东莞市公安局法医室等单位的解剖案例, 经尸解及切片检查未见明显心脏疾患。常规石蜡连续切片(2  $\mu\text{m}$  厚), 经 HE 及 Betty 染色后镜检筛选出 106 例共分 7 个年龄组之 SAN 纵切最大面积玻片(筛选标准: ①SAN 取材准确, ②能取到 SAN 最大纵切面积, ③ Betty 染色彩鲜艳分明)。死亡原因: ①交通事故 43 例, ②机械性损伤 28 例, ③疾病(肺炎、肠梗阻)12 例, ④机械性窒息 10 例, ⑤电击死 9 例, ⑥敌敌畏中毒 1 例, ⑦死因不明 3 例。年龄分布见表 1。

### 1.2 研究方法

1.2.1 SAN 取材方法 按照文献[2]方法。

1.2.2 固定、包埋、切片 切取的长方形组织块经 10% 中性福尔马林液固定 12 h, 换液后再固定 12 h。常规酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡。将组织块沿其长轴均匀切成两块, 两对

① 国家自然科学基金资助项目;

② 第一作者, 1962 年出生, 男, 硕士, 讲师

切面石蜡包埋,进行连续切片。在窦房结最大面积区域,每隔10片取厚为 $2\mu\text{m}$ 半薄切片1张,每例均有切片40~50张。烤箱 $56^{\circ}\text{C}$ 烘片6h(奥地利Reichert公司生产的切片机、刀片)。

表1 SAN标本的年龄分布

组别	年龄(岁)	性别		例数(%)
		男	女	
1	$\leq 10^{1)}$	9	3	12(11.3)
2	11~20	13	7	20(18.9)
3	21~30	24	3	27(25.5)
4	31~40	12	4	16(15.1)
5	41~50	8	3	11(10.4)
6	51~60	6	4	10(9.4)
7	61~83	6	4	10(9.4)
合计		78	28	106(100)

1)年龄最小者为出生后2d

1.2.3 染色 ①HE染色:每例间隔抽取3张切片作HE染色,镜下很容易见到窦房结纵切面全貌及其周围组织。结细胞较工作心肌染色淡,中央常见SAN动脉。HE染色作为特殊染色之对照,据此筛选出SAN最大面积的切片作特殊染色。②Betty染色(改良的Masson三色+Verhoeff弹力纤维染色法)<sup>[3]</sup>,每例取3~6张(间隔抽取)经HE筛选后未染色的蜡片作Betty特殊染色。采用此法进行染色,能在一张玻片上同时显示:起搏细胞及移行细胞呈淡红色,普通工作心肌呈深红色,胶原纤维呈绿色,弹力纤维呈黑褐色。

1.2.4 计算机图像分析—SAN纵切最大面积 ①仪器:日产OLYMPUS VANOX显微镜(可接摄像机);日产RCA-200摄像机

(Closed-circuit Video Equipment);美国AST Premium/286电脑。②软件:使用四川大学计算机科学系图形图像研究室MIAS-300图像分析仪软件系统作图像处理;使用美国SPSS/PC+统计学软件包进行数据处理。③操作程序:将筛选出的SAN结构完整(纵切面)、Betty特染色彩清晰分明之玻片置于带摄像枪显微镜下,用目镜 $10\times$ ,物镜 $4\times$ ,连续扫描观察该例SAN的面积范围。玻片图像经摄像枪摄入显示于电脑荧屏上。采用MIAS-300图像分析仪软件系统,用鼠标器画出此视野SAN的范围,电脑直接算出此视野SAN的面积并将数据储存,扫描完该张玻片(约5~7个视野),电脑即将各视野面积累计相加,得出该例SAN的纵切最大面积。注:计算面积时须减掉SAN动脉之内腔面积。

## 2 结 果

### 2.1 SAN取材法及染色法

运用沿SAN长轴纵切取材法,能准确、简便切取窦房结。经HE染色及Betty染色,镜下显示SAN由特殊分化的心肌细胞(起搏细胞、移行细胞)和结缔组织(胶原纤维、弹力纤维和脂肪组织等)所构成,结细胞围绕SAN结动脉成层排列。结与周围组织有较清楚界线。

### 2.2 窦房结纵切最大面积

应用计算机图像分析系统,将筛选出的106例(男78人,女28人)经Betty染色之SAN最大面积的玻片进行图像连续扫描,各视野面积相加得出SAN最大面积。并计算各年龄组SAN平均面积(表2)。

表2 各年龄组 SAN 平均面积及标准差、标准误 ( $A/\mu\text{m}^2$ )

年龄组(岁)	例数	面积均数	标准差	标准误
2 d~	12	5 700 149.07	1 705 594.05	492 362.59
11~	20	9 526 179.90	652 009.45	145 793.75
21~	27	11 408 398.95	449 920.79	86 466.05
31~	16	11 208 045.37	544 321.73	136 060.43
41~	11	10 891 328.47	533 460.10	160 844.21
51~	10	10 180 540.64	671 775.01	212 433.91
61~83	10	8 299 999.08	557 623.93	176 336.17
合计	106	9 914 065.08	1 951 502.98	189 556.44

SAN 纵切最大面积与年龄之间的关系呈正态曲线。在 20 岁之前,随年龄增加,其面积逐渐变大,青壮年期(20~40 岁左右)为最大,达 11 408 393.95  $\mu\text{m}^2$ 。40 岁之后,随年龄递增面积逐渐变小。

2.3 各年龄组间 SAN 最大面积均数对比分析

用 SPSS/PC+统计学软件包,先作各年

龄组间 SAN 面积均数方差齐性检验( $P=0.086>0.05$ )表示各组间方差无显著性差异。在方差齐的条件下,再作各年龄组间两两比较秩和检验,结果除第 3 组与第 4 组之间无显著性差异外( $P>0.05$ ,表示 21~30 岁,31~40 岁两组 SAN 面积均数无差异),其余各组间 SAN 面积均数大小均有显著性差异(表 3)。

表3 各年龄组间 SAN 最大面积均数对比 ( $A/\mu\text{m}^2$ )

年龄(岁)	组别	面积均数	组别						
			1	7	2	6	5	4	3
2 d~	1	5 700 149.07							
61~83	7	8 299 999.46	*						
11~20	2	9 526 179.90	*	*					
51~60	6	10 180 540.64	*	*	*				
41~50	5	10 891 328.47	*	*	*	*			
31~40	4	11 208 045.37	*	*	*	*	*		
21~30	3	11 408 398.95	*	*	*	*	*	*	

\* 号表示各组间 SAN 面积均数比较有显著性差异( $P=0.05$  水平)

2.4 各年龄组内男女之 SAN 面积均数比较

各年龄组内经方差齐性检验,证实方差

齐后,再作男女间 SAN 面积均数的秩和  $t$  检验,上述 7 个年龄组,  $P > 0.05$ ,说明各年龄组内男女之 SAN 面积均数无显著性差异( $P = 0.05$  水平),即表示各年龄组内男女之 SAN 面积均数大小无差别。

### 3 讨 论

#### 3.1 SAN 纵切取材法之特点

本研究采用我们自己设计的新式纵切心传导系统 SAN 的检查法,与传统 CCS 取材方法比较,具有如下特点:①以界沟、SAN 结动脉为主要标志。标志清楚,取材定位准确;②SAN 长径比短径大 2~3 倍,自横轴方向移位远比纵轴方向多。故采用与 SAN 长轴平行之纵切方法,其工作量大为减轻,改进了传统需数百上千张连续切片法;③SAN 是长形的,纵切可在一张切片上观察到 SAN 的全部结构及其周围组织,易于进行全面分析。经实验证明,该法能操作简便、准确切取到 SAN,省时省力,经济节约,为实际检案进行 CCS 常规检查奠定基础。

#### 3.2 SAN 的特殊染色法

过去,我们常采用普通 HE 染色、胶原纤维的 Masson 染色及弹力纤维 Verhoeff 染色法<sup>[4,5]</sup>分别对同一组织进行组织化学染色观察,费时费力,浪费检材。本项研究将 Betty 特染法加以改进并运用在 CCS 研究。经过一年多 SAN 2  $\mu\text{m}$  厚切片染色检验表明,该法具有以下特点:①简便快捷、色彩鲜艳、组织结构分明并较长时间不褪色;②在一张玻片上能同时显示结细胞、工作心肌及胶原纤维、弹力纤维等。起搏细胞及移行细胞呈淡红色,体积较为细小,弯曲状;普通工作心肌呈深红色,大而粗。因切片薄,细胞之间不重叠,两者均可见清晰的横纹(而在 HE 染色中,结细胞横纹不明显);胶原纤维呈绿色,构成间质的主要支架;弹力纤维呈黑褐色,纤细弯曲,不规则分布。所以该特殊染色法不失为 CCS 组织化学的满意的染色法。

#### 3.3 SAN 图像分析的定量研究

近 15 年文献检索表明,仅 Shiraishi<sup>[6]</sup>报道采用彩色图像分析系统定量研究人体 SAN 的体积大小与年龄变化的关系,标本只有 26 例。其余学者对 CCS 仍局限于定性或半定量研究。本研究应用计算机显微图像分析系统<sup>[7]</sup>连续观察 SAN 纵切面全貌,即可得出该例 SAN 纵切最大面积值。本研究优点是:①方法科学、先进,容易掌握;②在显微镜监控下,电脑直观计算玻片 SAN 纵切面积,数据精确可靠,计算方便、快捷;③全部采用人体心脏标本,共 106 例,标本量大,年龄分布合理,经统计学分析处理,结果有实用价值。我们曾尝试仿照 Shiraishi 的方法计算连续切片 SAN 体积,但实践证明其可信度值得商榷。

#### 3.4 SAN 主、间质形态学改变与年龄的关系

自从发现 SAN 以来,大家公认 SAN 形态学的改变与年龄有密切关系<sup>[8,9]</sup>,认为在青壮年 SAN 体积最大,青年之前,随年龄增加,体积逐渐增大。中年以后,则随年龄增加反而 SAN 体积缩小。间质随年龄增加,逐渐变多,相对结细胞逐渐减少,而呈现增龄性生理改变<sup>[10]</sup>。本实验定量研究 SAN 纵切最大面积,以具体数据证实了前人提出的观点正确。

运用计算机图像分析系统计算 106 例 7 个年龄组 SAN 纵切最大面积均数,经统计学分析,除 21~30 岁与 31~40 岁两组间面积均数无差别外,其余各组间面积均数均有程度上的差异。20 岁前,SAN 面积随年龄增加而逐渐变大,20~40 岁为最大,40 岁之后,其面积随年龄增大而逐渐变小。同年龄组内,不同性别的人 SAN 面积大小无显著差异。SAN 内间质也随年龄增加而逐渐变多,以胶原纤维为主。SAN 结细胞绝对面积在 40 岁后逐渐变小。

(感谢中山医科大学病理学教研室田宋先老师,珠江医院计算机室刘勇工程师的热忱帮助和支持)

## 参 考 文 献

- 1 中国医科大学主编. 人体解剖学. 北京: 人民卫生出版社, 1978. 218
- 2 宋一璇, 罗 斌, 傅晨钟, 等. 心传导系统简便取材法及 51 例心性猝死观察. 中山医科大学报, 1993, 14(4): 277
- 3 Betty S. A stain for the simultaneous demonstration of collagen, muscle and elastic elements in mammalian tissue. *Laboratory Medicine*, 1988, 4: 243
- 4 芮菊生主编. 组织切片技术. 上海: 上海人民教育出版社, 1980. 27
- 5 凌启波主编. 实用病理特殊染色和组化技术. 广州: 广东高等教育出版社, 1989. 1
- 6 Shiraishi S, Tetsuro T, Tetsuhiro M, et al. Quantitative histological analysis of the human SAN during growth and aging. *Circulation*, 1992, 85: 1
- 7 徐小虎, 祝家镇. 计算机图像分析推断个体年龄的研究. 中山医科大学学报, 1992, 13(3): 67
- 8 Davies MJ, Anderson RH, Becker AE. *The Conduction system of the heart*. London: Butterworth, 1983. 203
- 9 Inoue S, Shinohara F, Niitani H, et al. A new method for the histological study of aging changes in the SAN. *Jpn Heart J*, 1986, 27(5): 653
- 10 Lev M, John T, Thomes. Aging changes in the human SAN. *J Gerontol* 1954, 9: 1

(1994-07-01 收稿 1995-04-01 修回)

## COMPUTER MICROIMAGE ANALYSIS OF AGE-RELATED CHANGES OF THE HUMAN SINO-ATRIAL NODE

Luo Bin<sup>1</sup> Song Yixuan<sup>1</sup> Zhu Jiazhen<sup>1</sup> Yao Qingsong<sup>2</sup>  
Lian Shangyou<sup>2</sup> Xie Jianhua<sup>2</sup> Zeng Jiale<sup>2</sup>

(1 Department of Forensic Pathology Sun Yat-Sen University of Medical Sciences

2 The Institute of Criminal Science of Guangdong)

This paper deals with the age-related changes in size and histological features of sinoatrial node (SAN). 106 autopsy hearts were taken from cases died at different ages (2 days to 83 years) without clinical or pathologic evidence of cardiac diseases. Serial sections of 2  $\mu\text{m}$  in thickness were prepared parallel to the long axis of SAN. The thin sections selected from the largest areas of SAN were stained with HE and Betty's method. The largest areas of the SAN in 7 age groups were calculated by computer image analysis system. Then, the significance of age-related quantitative changes of the human SAN were studied.

**Subject headings** sinoatrial node/anatomy and histology; image analysis, computer-assisted