

文章编号: 1007-1482 (2013) 03-0249-0254

· CT 技术与图像分析 ·

体视学研究的辅助工具: 现状与展望

杨正伟

(川北医学院 形态定量研究室, 南充 637007)

摘要 生物组织显微镜下的形态定量研究, 涉及固定、脱水、包埋、切片、染色、视野抽样和测试等一系列步骤。有助于这些步骤的工具就是体视学研究的辅助工具。目前市面有售的主要辅助工具是体视学图像系统, 它包含电脑图像与测格系统、机动显微镜载物台以及载物台 Z 轴位移测量仪等。还有一些曾用过的或者可能开发应用的辅助工具, 有如等距刀片机、包埋模具和数据记录仪。本文对此进行了系统性的评述, 以供体视学应用时参考。

关键词: 体视学; 辅助工具

中图分类号: N3

文献标识码: A

Assisting tools in stereological studies: current status and perspectives

YANG Zhengwei

(Morphometric Research Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract Stereological studies of biological tissues under the microscope involve a series of procedures including fixation, dehydration, embedding, sectioning, staining, sampling and measurement of fields of view, etc. The assisting tools in stereological studies are those that facilitate the procedures. A key assisting tool currently available on the market is the stereology image system which includes a computer image and grid system, a motorized microscope stage, a stage Z-axis position measurement device, etc. Some other assisting tools that were used or are potentially developable and useful are systematic slicers, embedding molds, date recorders, etc. They are reviewed systematically in this article, and hope to be helpful for the application of stereology.

Key words: stereology; assisting tools

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 2012—2013 学科发展研究项目 (体视学学科发展报告)

作者简介: 杨正伟 (1963-), 男 (汉), 教授。研究方向: 形态定量研究。

0 引言

基于体视学原理,利用所测结构的截面(切片)图像定量研究所测结构的形态特征(体积、表面积、长度、数量等),涉及一系列的步骤。对于生物组织的显微镜下研究而言,这一系列步骤可能包括取材、固定、脱水、切块、包埋、切片、染色、显微观察、视野抽样、测试以及计算等^[1]。可辅助这些步骤的工具,都是体视学研究的辅助工具。其中涉及的脱水机、包埋机、磨刀机、切片机、显微镜等,严格地讲都属于各个专业或领域的专用设备,因此本文不多讲。不过,除此以外,目前市面上有售的主要辅助工具就只有体视学图像系统了^[1]。下面介绍已有用的或者可能开发应用的重要辅助工具(根据笔者的了解与体会),尤其是体视学图像系统。

1 切片制备相关辅助工具

1.1 等距刀片机

对某一器官(组织),我们可能需要获得其等距随机截面以估计其体积(根据祖暅原理),也可能需要将其等距切成若干组织薄片,然后随机抽选组织块^[1]。当截面间距、薄片厚度或器官高度较小时,最好有一种等距刀片机辅助。笔者这里所谓的等距刀片机(systematic slicer),即把若干刀片(例如石蜡切片刀片)等距平行排列固定在一起,然后一次就将整个器官切成等距薄片^[2]。这样切器官,为保证器官稳固(不动)并减少器官挤压,最好先把固定(用固定液)后的器官用琼脂(7%)包埋,然后在冷却状态下(5℃)切整个包埋块^[2-3]。

1.2 包埋模具

切取随机方向的切片——等向切片(isotropic sections)或垂直切片(vertical sections)——是部分体视学测试的基本要求^[1]。切片机一般都是夹住粘附有组织块(包埋块)的硬质支架或底座,沿固定的

方向切片的,切片机可调节的切片角度非常有限。因此,组织切片方向必须在包埋前考虑。包埋模具的底面一般就是切片平面(方向)。如果可通过组织块剖面,且该剖面即随机方向的切片平面,那么把组织块剖面朝下包埋即可。对于细小的没有(明显)剖面的组织块,为获得等向随机切片,可先用一个球形包埋模具把组织块包埋成球形,然后再常规包埋球形包埋块。这个方法即球切法,其中的球形包埋模具就是一个重要的辅助工具^[1,4]。球形包埋模具一般用于环氧树脂包埋(主要是切超薄切片用)^[4],未见有人用于石蜡包埋。笔者以为,这种模具的关键问题是,由于包埋剂凝固后的皱缩,包埋块实际上很难形成球形,尤其是石蜡包埋块。

对于任意石蜡包埋块,鉴于石蜡较软且可溶解再利用,笔者想象,可设计一套一大一小的双模具(double moulds)来确定等向切片或垂直切片的方向。把小包埋模具的底面(平面)定为水平面(以此确定空间方向),大包埋模具的底面(平面)定为切片平面;大模具比小模具要大,小模具包埋块以任意方向都可放入大模具。先用小模具任意包埋组织块,然后在小模具包埋块上切(确定)一个等向切片或垂直切片方向的剖面(根据定向法和垂直切片法^[1,5-6]),接着让该剖面朝下(平行于大模具的底面)把小包埋块再包埋在大模具里,以后适当修整石蜡块后平行于大模具包埋块的底面切片即可。这种方法应该可以实施,较难且要特别注意的是,再包埋时①要固定好小包埋块的位置,使小包埋块上所切等向或垂直切片剖面与大模具底面平行;②要保证小包埋块内组织块的位置不动,即溶蜡再包埋时,组织块下面的石蜡只能溶解一部分,勿让组织块移动或掉下。为此,可能需要分多次把溶蜡倒入大模具里。

2 切片观测相关辅助工具

2.1 电脑图像与测格系统

切片观测首先需要考虑的是怎么观察图像,由

此决定使用什么测格。如在光学显微镜下直接观察图像,就用目镜测格;如在墙上或桌上观察投射(投影)图像,就用纸测格;如图像是显微照片,就用胶片测格;如在电脑屏上观察图像,就用电脑测格——软件生成的测格图案^[1]。这些图像观察及测格工具都是体视学研究的辅助工具。其中最便利的是用以在电脑屏上观察来自显微镜的数字图像,并在图像上叠加电脑测格(test grids)的电脑辅助工具,笔者称之为电脑图像与测格系统(computer image and grid system)。

在电脑屏上观察显微图像的重要优点是可以保存图像,适当调整图像质量,不易产生视觉疲劳(与在显微镜下直接的肉眼观察相比),且容易生成所需测格。

用以在电脑屏上观察显微镜图像的系统,目前市面上已很普遍,但在电脑屏图像上能叠加测格的就少之又少了。不能叠加测格的显微图像系统几乎无法进行体视学测试。办法只能是编写一个软件,使能根据需要生成与叠加测格。尽管这个软件的编写可能并不难,但是目前市面上并未见过这样的软件单独有售。

测格的基本(几何)元素是点(测点)、线(测线)、面(测框)^[1]。电脑测格就是要能根据需要在电脑屏上生成任意数量的测点、任意长度的测线(1条或多条)以及任意面积的测框——禁线框(1个或多个)。此外,测格在电脑屏上的位置也应能根据需要任意移动。如能在电脑屏上随机转动测线,那就最好了。即在1个测试视野上生成1个随机方向的测线,在下1个视野上生成另1个随机方向的测线(即随机转动了上1个视野上的测线),在下1个视野上再随机转动测线……注意,①随机方向有两种选择:平面上的等向随机和正弦加权随机。选用哪种随机必须根据所用切片决定^[1]。②随机方式也有两种选择:单纯随机与等距随机。两种方式均可,等距随机通常更好,但要事先人为确定间距^[1]。

此外,图像有一定放大倍数,测线或测框也有一定的尺寸,因此图像或测格大小要校准(calibration),这就需要用到台微尺(stage micrometer)^[1]。

这个辅助工具不多用,但很基本,也可买到。

2.2 数据记录仪

体视学测试的基本结果是各种数量(测点数、交点数、轮廓数或粒子数)以及长度测量值^[1]。其记录我们一般是先写在纸上,然后录入电脑(Excel软件等)。这种先把原始数据记录在纸上的方法,主要优点是纸质数据可当做原始结果保存,缺点是接着再统计录入电脑较麻烦,也容易出错。因此,为提高效率,也许我们可设计或借用一种计数器(像血细胞分类计数器那样)来记录计数结果,设计一种录入板来记录数值结果,并让记录结果可直接转换成Excel等格式的数据。通过软件设计想必可把电脑键盘也转变成一个计数器、录入板,但可能最好还是单独设计一个数据记录仪(data recorder),这既是为了避免电脑功能影响、电脑键盘太小等问题,又是为了设计一个不同的但更利于记录、分类、录入与数据转换的记录仪。据了解,目前已有体视学图像系统(见下面)具备部分这样的数据记录功能。

2.3 机动显微镜载物台

通常情况下,一个显微视野无法容纳整张切片,我们需要从整张切片抽选部分视野来观测。视野抽选的基本方法是等距抽样^[1]。为实现这种抽样,自然就需要一个可移动的(放置或固定切片用的)载物台——机动显微镜载物台(motorized microscope stage)。就是说,我们需要改装普通显微镜的载物台,使我们能控制载物台的移动。最基本的机动载物台,至少能通过按钮沿一定方向(载物台X和Y轴方向)、按一定间距(几十或几百微米)一步一步地移动载物台。电脑辅助的载物台,例如Prior Scientific公司(<http://www.prior.com/>)生产的载物台,可完全控制载物台的移动:可任意确定抽样的间距或抽样视野所占切片测试区域面积的比例(分合法抽样的抽样分数),可随时回到某个曾观测的视野。

机动载物台是实现切片视野等距抽样或均合抽

样(见下面)的基本工具,没有它几乎所有(切片上的、涉及视野抽样的)体视学测试都可能难以顺利完成。如果这个认识将来能够得到愈来愈多的人的体会与认可,也许,未来生产的普通显微镜会自带一个机动载物台。也许到那时,切片的随机观测才会得到普及。

2.4 载物台 Z 轴位移测量仪

光学体视框是在厚切片内的三维空间里直接计数粒子以估计粒子数的现代体视学技术,其基本要求是:我们要能精确(精度要达到十分之几微米)测量并显示显微镜载物台(切片放置的平面)上下移动(Z轴方向的位移)的距离(用油镜观察厚切片时,这个距离就基本等于厚切片内光学切片平面的移动距离),以便能确定是在厚切片内多厚的组织里进行的粒子计数,从而确定是在厚切片内多少体积的组织里进行的粒子计数^[1]。这就需要给显微镜装配一种叫做 microcator(指针测微计)或 linear encoder(线性编码器)之类的位移测量仪(position measuring device),例如 Heidenhain 公司(<http://www.heidenhain.us/>)所生产的。所测的位移距离可连续地显示出来,也可按一定事先设定的间距显示。

采用光学体视框在厚切片内直接计数并估计细胞(核)或其他细小粒子的数量,是粒子计数技术的一场革命。与采用多张切片的物理体视框相比,它具有无比的优越性。在前者,粒子的辨认与计数可立即同时完成(即在连续上下聚焦、实时观察厚切片的过程中,即可立即确定所见粒子是否该计数);而在后者,要在至少2张切片上分别观察、辨认(匹配)粒子,即要判断确定不同切片上哪些粒子轮廓(断面)是同一粒子产生的,哪些不是,然后才能确定所见粒子是否该计数^[1]。可以肯定,如果能用光学体视框在1张厚切片里计数粒子,没有人会再用多张切片(根据物理体视框)来计数粒子,因为这样实在太麻烦、太耗时。用以估计光学体视框高度的载物台位移测量仪,在体视学研究中的重要意义因此就

不言而喻了。也许,未来生产的研究级显微镜也会自带一个这样的位移测量仪。也许到那时,细胞核等粒子数的无偏估计才容易推广。

2.5 自动图像分析仪

平面上的数字图像由像素(好比非常非常小的点)构成,因此人们可根据所测图像内的像素情况(多少与分布)自动计算图像的面积、周长等。这就是自动图像分析仪(image analyzer)可在形态定量中发挥的作用之一。这样的图像分析仪似从20世纪七八十年代就开始盛行。不过,由于图像识别的实际困难,体视学基本测试(测点计数等)的简单快捷,以及每个视野的测量不必非常精确,体视学测试多为用肉眼辨认图像的人工测试,利用图像分析仪的自动测试实际上不多,也未必快捷、准确^[1]。不过,人工测试中可能涉及一些自动测试的功能运用,例如:

(1)对于肉眼难以准确辨认的复杂结构,例如某种散在分布的、细小的、深浅层次多的免疫阳性染色结构,可借助图像分析让机器(结合肉眼观察)来确定(辨认)所测结构(例如某个灰度范围的结构)。此外,如要测量染色阳性结构的灰度或光密度(以反映阳性物质的多少),人工测试就更无能为力了,必须借助图像分析仪。

(2)距离测量。距离(直径、宽度、截距、点取截距、核距、转距等)的人工测量可在投影或照片图像上进行^[1],但显然不宜在电脑屏图像上进行(因为容易划伤电脑屏等)。在数字图像上用鼠标确定两点(的坐标位置),电脑就可立即算出这两点间的距离,甚至算出其平方或立方值。此外,多个距离测量值可以结合在一起,根据一定公式自动进行综合运算。例如,用垂直转距测量法估计某个所选粒子的体积时,可设计点击多次鼠标,包括随机生成等距平行线以确定点击位置,电脑就由此计算出多个转距并根据相应公式算出该粒子体积的估计值^[1]。

(3)切片对位(alignment)。在一些特殊情况下(例如不能实现光学切片、所测粒子太大),我们可

能必须采用物理体视框来计数或抽选粒子,尽管这可能很麻烦、很耗时^[1]。不过,如果切片能自动对位,那就能减少不少麻烦与时间。所谓切片对位,就是在观察从1张(物理)切片上等距抽选的各个视野时,能同时显示所选视野在另1张相邻连续切片上“相同位置”的视野。这里所谓2张连续切片上的“相同位置”,指的是1张切片上的视野区域在另1张(原位)切片上的垂直(垂直于切片平面)投影区域。实现这种切片对位,想必需要自动图像识别与储存的功能,没有自动图像分析仪是不可能完成的。

(4)视野均合(propportionator)抽样。体视学中潜在的一种可能非常高效的视野抽样方法是:先完整扫描并储存整张切片图像,然后基于各个视野里某种“识别结构”的量(自动识别与测量)“等距”随机抽选出若干用于测试的视野。这里的“等距”抽样的间距,不是一般的空间距离,而是“识别结构”的某种量。抽样后,在所抽视野上测量“所测结构”的量,然后根据“所测结构”的量,结合“识别结构”的量进行“所测结构”总量估计^[1,7-9]。这样的抽样想必需要更强功能的图像识别、储存与分析,没有更加完善的自动图像分析仪是不可能完成的。

2.6 体视学图像系统

把上述切片观测相关辅助工具组合在一起的系统化装置,笔者称之为体视学图像系统(stereology image system)^[1]。笔者以为,最基本的体视学图像系统至少应该能够:在电脑屏上观察显微图像,调整图像质量,等距移动显微镜载物台的X和Y轴(以实现切片视野的等距随机抽样),在图像上按需叠加测格,测量图像上任意两点间的距离(以测量直径、截距等),精确测量并显示载物台Z轴的移动距离(以估计光学体视框的高度)。这种系统的原型最早可能见于1988年,只是当时观测的不是电脑屏图像而是投影图像^[2]。

1995年笔者曾在澳大利亚用过某公司装配的观测电脑屏图像的体视学图像系统,该系统当时就

有根据转距测量法估计粒子体积的功能^[10]。笔者实验室于1998年3月自制了这样一套基本的能实施光学体视框技术的体视学图像系统^[11]。该系统由当时的北京驰马特图像公司负责根据笔者的思路与要求而设计、装配。光学显微镜用的是Olympus的BX50型显微镜,机动显微镜载物台(包括载物台Z轴位移的测距功能)由当时的四川联合大学(现四川大学)某个系部的老师制作,测格软件由当时北京的某个在读博士所写,电脑操作系统用的是Win3.2。该系统可能至今仍是在国内装配的唯一体视学图像系统。笔者实验室经常利用该系统进行形态定量研究^[11-12],至今没有坏过。目前市面有售的功能较齐全的体视学图像系统,有如Visiopharm公司(<http://www.visiopharm.com/>)生产的新CAST(new Computer Assisted Stereological Toolbox——新型计算机辅助的体视学工具箱),MBF Bioscience公司(<http://www.mbfbioscience.com/>)生产的Stereo Investigator。据了解,newCAST系统甚至具备切片对位、视野均合抽样等功能。笔者实验室2007年进口过1套这样的系统(没有视野均合抽样功能),是最早进口体视学图像系统的国内单位之一。

值得欣慰的是,目前国际上似有多家公司都在生产或装配体视学图像系统,这为未来体视学辅助工具的改进提供了丰富的范本。有一点笔者想特别指出,由于体视学图像系统的操作者(测量者)要自己选择体视学方法、自己抽选视野(包括抽样间距的考虑)、自己叠加测格(包括测格的选择与组合)、自己计数与测量结果等,且可能要测量很长时间(因为可能要测量很多切片),体视学图像系统的改进设计应高度重视,简单、易学,不易损坏、瘫痪。为此,整个系统的各个组分或亚系统——例如图像采集与显示、测格生成与显示、载物台控制、载物台Z轴位移测距、图像放大倍数校准、距离(直径等)测量等——相对独立可能较好。这样,如果只是测格出了问题,就只需维护测格软件(例如重新安装测格软件);如果只是载物台功能失控,就只需恢复载物台控制功能……

参考文献 (References)

- [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.
YANG Zhengwei. Essential tools for morphometric studies of biological tissues: practical stereological methods[M]. Beijing: Science Press, 2012. (in Chinese)
- [2] Gundersen H J, Bagger P, Bendtsen T F, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis [J]. *APMIS*, 1988, 96(10): 857 - 881.
- [3] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis [J]. *APMIS*, 1988, 96(5): 379 - 394.
- [4] Nyengaard J R, Gundersen H J. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens [J]. *Journal of Microscopy*, 1992, 165(3): 427 - 431.
- [5] Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, et al. Estimation of surface area and length with the orientator [J]. *Journal of Microscopy*, 1990, 159(3): 301 - 317.
- [6] Baddeley A J, Gundersen H J, Cruz-Orive L M. Estimation of surface area from vertical sections [J]. *Journal of Microscopy*, 1986, 142(3): 259 - 276.
- [7] Gardi J E, Nyengaard J R, Gundersen H J. The proportionator: unbiased stereological estimation using biased automatic image analysis and non-uniform probability proportional to size sampling [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2008, 38(3): 313 - 328.
- [8] Gardi J E, Nyengaard J R, Gundersen H J. Automatic sampling for unbiased and efficient stereological estimation using the proportionator in biological studies [J]. *Journal of Microscopy*, 2008, 230(1): 108 - 120.
- [9] 杨正伟. 关于均合法: 比例器 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2011, 16(4): 329.
YANG Zhengwei. On the proportionator [J]. *Chinese Journal of Stereology and Image Analysis*, 2011, 16(4): 329. (in Chinese)
- [10] Zhengwei Y, Wreford N G, Schlatt S, et al. Acute and specific impairment of spermatogonial development by GnRH antagonist-induced gonadotrophin withdrawal in the adult macaque (*Macaca fascicularis*) [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1998, 112(1): 139 - 147.
- [11] Wen X H, Yang Z W. Quantitative (stereological) study on the spermatozoal storage capacity of epididymis in rats and monkeys [J]. *Asian Journal of Andrology*, 2000, 2(1): 73 - 77.
- [12] Peng B, Mao Y, Tang X F, et al. Comparison of spermatogenic damage induced at 6 months after ligation of the vas deferens at proximal and distal locations in the rabbit [J]. *Andrologia*, 2011, 43(2): 129 - 138.