

显微镜下眼见未必为“实”

杨正伟

(川北医学院 形态定量研究室, 四川 南充市 637007)

俗话说, 眼见为实。不过组织学或形态定量研究中, 显微镜下亲眼所见未必是“实”, 未必是“真”。

举例来讲, 如你用光学显微镜在某放大倍数下观察某器官组织切片时, 看到一个直径为 $6\ \mu\text{m}$ 的圆形细胞 (轮廓), 那就说明该器官组织内确实有这个细胞存在 (人工假象除外), 这是眼见为实。不过, 且不说你所用显微镜未看到或看清的结构未必不存在, 关于以下问题也未必眼见为“实”。

1、所见细胞是“圆”形的吗?

不知道。因为切片上所见一般是细胞的一个切面 (轮廓), 细胞的真实形状可能是球形或椭球形, 也可能是不规则的, 只有观察了该细胞的连续切片后才能得知。

2、所见细胞 (假如是球形) 的直径真是 $6\ \mu\text{m}$ 吗?

多半不是。一是因为所见细胞切面未必是刚好通过球心的最大切面 (通过球心的圆形切面的直径才是球体的直径), 二是因为切片上所见细胞大小未必等于其活体 (新鲜状态) 细胞大小。后者是一个严肃的问题。组织学中, 为观察细胞等显微结构, 我们常常不得不对器官组织进行固定、脱水、包埋处理, 并经切片和染色处理后在显微镜下观察。这一系列处理常常伴有组织皱缩 (tissue shrinkage)^[1-7]。例如, 根据笔者等的研究, 1~70 天龄大鼠睾丸组织块经固定、脱水及环氧树脂包埋切片后体积减少总共约 24%~12%^[1], 成年猴睾丸组织块经甲基丙烯酸树脂包埋切片后体积变化不大^[2], 成年大鼠松果体经石蜡包埋切片后体积减少高达 67%^[4]。与甲基丙烯酸树脂包埋切片相比, 石蜡包埋切片上所见成年大鼠肾脏内肾小管直径小 18.5%, 肾小管细胞核直径小 13.8%^[3]; 成年兔睾丸内生精小管直径小 17.1%, 球形精子细胞核直径小 10.8%^[6]。与活体组织结构相比, 这些结构究竟皱缩了多少, 人们不得而知。

3、进一步讲, 假如在切片上用体视学方法测得某种细胞在器官组织内的体积分数、表面积密度、高度 (或直径) 密度分别为 V_v 、 S_v 、 H_v , 那么器官组织内这种细胞的总体积、总表面积、总高度分别为多少?

假设器官组织处理前的 (真实的或新鲜状态的) 体积为 V_b (下标 b 表示 before), 处理后的体积为 V_a (下标 a 表示 after) ——即假想把器官组织完全切成连续切片后, 由连续切片重建的器官组织的体积。

(1) 假设所测细胞及其周围组织结构的体积在组织处理过程中的变化是均匀一致的, 那么, 将 V_v 乘以新鲜 (处理前) 器官组织的体积 V_b 即得新鲜 (处理前) 器官组织内这种细胞的总体积 V :

$$V \approx V_v \times V_b \quad (1)$$

[注: 假设所测结构的形态变化是均匀的, 是人们常常不得不做的假设, 但实际上是否均匀人们不得而知。例如, 与甲基丙烯酸树脂包埋切片相比, 石蜡包埋切片上测得的成年大鼠肾脏内肾小管的体积分数 (所占体积比例) 小 6%~10%^[3], 成年兔睾丸内生精小管的体积分数小约 17%^[6]。成年动物睾丸这个器官似乎很特别, 其石蜡包埋切片上生精小管周围有较大的并非任何组织结构的空隙 (想必是人工假象): 甲基丙烯酸树脂包埋的成年兔睾丸切片上这种空隙所占面积比例仅约 1%, 而石蜡包埋切片上这种空隙所占面积比例高达 22%^[6]。]

(2) 根据器官组织处理前、后的体积, 我们可以定义器官组织体积的变化系数 C_v

(coefficient of volume change):

$$C_v = V_a / V_b \quad (2)$$

假设器官组织的均匀变化是像球体那样变大变小的(实际情况未必如此),那么,组织处理过程中所测细胞表面积的变化系数 C_s (coefficient of surface change) 和高度的变化系数 C_h (coefficient of height change) 分别为:

$$C_s = C_v^{2/3} \quad (3)$$

$$C_h = C_v^{1/3} \quad (4)$$

将 S_v 、 H_v 乘以处理后器官组织的体积 V_a , 即分别得器官组织处理后所测细胞的总表面积和总高度。考虑到组织处理过程中的表面积和高度变化,新鲜(处理前)器官组织内这种细胞的总表面积 S 和总高度 H 分别为:

$$S \approx S_v \times V_a / C_s = S_v \times V_b \times C_v^{1/3} \quad (5)$$

$$H \approx H_v \times V_a / C_h = H_v \times V_b \times C_v^{2/3} \quad (6)$$

假设所测结构不是一般的细胞而是线形结构(直径相对很小而长度相对很长,例如毛细血管、神经纤维),其在组织处理过程中的长度变化,与其假设会像球体直径那样变化,也许不如假设其长度不变更合适,即假设组织处理过程中线形结构以直径变化为主而长度变化很小。因此,把从切片上估计的长度密度 L_v 乘以器官组织处理后的体积 V_a 即可近似估计新鲜(处理前)器官组织内所测线形结构的总长度 L :

$$L \approx L_v \times V_a \quad (7)$$

4、再进一步讲,假如在切片上用体视学方法测得某种细胞在器官组织内的数密度为 N_v , 那么器官组织内的细胞总数为多少?

将 N_v 乘以处理后器官组织的体积 V_a 即得器官组织内的细胞总数 N :

$$N = N_v \times V_a \quad (8)$$

[注:组织皱缩或膨胀可影响细胞数密度但不影响细胞总数;数密度是在组织处理后测量的,因此要乘以处理后体积以估计总数(比较公式7)。]

器官组织的处理后体积不像处理前体积(可根据重量和密度估计^[5])那样容易估计,一般要把器官或组织块完全切成连续切片后根据卡瓦列里原理^[8]估计^[1-2, 4]。为了避免因组织皱缩或膨胀而带来的粒子数估计偏差,可采用一种不需考虑任何组织皱缩或膨胀的无偏体视学方法:分合法^[9]。例如,估计某器官内某种细胞核的总数,可如下采用光学体视框^[10]与分合法相结合的光学分合法(optical fractionator)^[11]:先把器官完全切成组织块(blocks),然后等距随机抽取 $1/b$ (b 为正整数)个组织块;把所抽组织块完全切成较厚的连续切片(sections),等距随机抽取 $1/s$ (s 为正整数)张切片;在所抽切片上等距随机抽选 $1/f$ (f 未必是正整数)面积的测试视野(fields);用油镜在所抽视野上测量 $1/d$ (d 未必是正整数)厚度或景深(depth)的切片,即在厚切片内连续观察光学切片,用光学体视框计数一定光学切片厚度内所测细胞核的数量。假如这样计数的细胞核总数为 n ,那么该器官内细胞核总数的无偏估计为: $bsfdn$ 。这种方法的实施需要专门的体视学图像分析系统,以便能①在切片上等距随机抽选测试视野,②测量切片上所抽视野所占的面积比例(以估计 f),③测量并显示切片(包括切片内所测光学切片)的精确厚度(以实现光学体视框技术并估计 d)。

总而言之,显微形态结构的定性研究中,组织处理或显微观察过程可能导致人工假象,因此显微镜下所见未必总是真实。显微形态结构的定量研究中,由于组织处理过程中的形态变化(组织皱缩或膨胀)以及抽样(包括组织块、切片、视野及测试抽样)的局限性,显微镜下所见或所得测量结果,只能是接近真实,未必绝对真实。实践中,我们可以采用较好的组织处理方法(例如树脂包埋切片)以及较好的形态定量研究方法(例如无偏体视学方法),以使显微镜下所见或所测更加逼近真实。

参考文献

1. Yang ZW, Wreford NG, de Kretser DM. A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biol Reprod* 1990; 43(4): 629-35.
2. Zhengwei Y, McLachlan RI, Bremner WJ, Wreford NG. Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *J Androl* 1997; 18(6): 681-7.
3. 代小思, 康健, 杨正伟. 放大倍数和包埋介质对肾组织形态定量研究的影响. *中国体视学与图像分析* 2004; 9(4): 203-5.
4. 吴亮生, 王蕾, 马玉琼, 陈文玉, 欧可群, 杨正伟. 大鼠松果体的神经支配——免疫组织化学及光镜体视学研究. *解剖学报* 2005; 36(3): 288-91.
5. 赵圆宇, 王亚平, 杨正伟. 固定与脱水对睾丸、附睾尾和眼球的密度与体积的影响. *川北医学院学报* 2006; 21(1): 4-7.
6. 赵圆宇. 组织处理对形态定量研究的影响. 重庆: 重庆医科大学, 2006. [硕士论文]
7. 赵圆宇, 杨正伟. 睾丸、附睾和眼球在乙醇内长期保存后的密度与体积变化. *川北医学院学报* 2007; 22(1): 54-5.
8. 杨正伟. 细胞数的体视学定量研究. 见: 现代实用细胞与分子生物学实验技术. 主编: 蔡文琴. 北京: 人民军医出版社, 2003. 285-96.
9. 杨正伟. 关于分合法: 大象有几个腰子? 川北医学院体视学网页 (<http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology>) 上的“趣谈体视学”文章 (2007-5-12)
10. 杨正伟. 我为什么把 disector 译为“体视框”. 川北医学院体视学网页 (<http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology>) 上的“体视学评论”文章 (2006-12-12)
11. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy*. Oxon: Garland Science / BIOS Scientific Publishers, 2005. 87-9.

附注:

该文的原文于 2009 年 2 月 29 日上传至川北医学院体视学网页——川北医学院体视学网页 (<http://www.nsmc.edu.cn/forum/stereology>) 上的“体视学评论”文章 (2009-2-29)。本文在原文基础上作了修改, 主要是修改了第 3 部分——作者原来对 S_v 、 L_v 估计的陈述有严重错误, 本文特此更正。如因此而误导了读者的研究工作, 作者深表歉意。该文 2009-2-29 版本第 3 部分的原文如下:

3、进一步讲, 假如在切片上用体视学方法测得某种细胞在器官组织内的体积分数、表面积密度、高度密度分别为 V_v 、 S_v 、 H_v , 那么器官组织内这种细胞的总体积、总表面积、总高度分别为多少?

将 V_v 、 S_v 、 H_v 分别乘以新鲜 (处理前) 器官组织的体积 V 即得。这里有一个不得不做的假设, 那就是假设所测细胞 (与其周围组织结构相比) 在组织处理过程中的形态变化是均匀的。但实际上是否均匀, 人们不得而知。例如, 与甲基丙烯酸树脂包埋切片相比, 石蜡包埋切片上测得的成年大鼠肾脏内肾小管的体积分数 (所占体积比例) 小 6% ~ 10%^[3], 成年兔睾丸内生精小管的体积分数小约 17%^[6]。成年动物睾丸这个器官似乎很特别, 其石蜡包埋切片上生精小管周围有较大的并非任何组织结构的空隙 (想必是人工假象): 甲基丙烯酸树脂包埋的成年兔睾丸切片上这种空隙所占面积比例仅约 1%, 而石蜡包埋切片上这种空隙所占面积比例高达 22%^[6]。