

讲 座

作者 杨正伟 2009-3-26 校正文稿。
(请参考对比论文: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,2003,285-296.)

生物体视学新工具—光学体视框

杨 正 伟

(川北医学院体视学研究室 南充 637007)

1 问题的引入

假定一平面内有 N 个二维轮廓,从中随机抽选了 n 个轮廓,这 n 个轮廓尺寸的算术平均,就是此平面内 N 个轮廓的平均尺寸的估计值。对于显微结构,通用的办法是借助探针(具有一定几何图案的探针)来随机抽选,犹如将一定形状的探针“插入”待测空间中去抽选那些被探针探测到的东西。一般而言,有三种抽选方法,分别利用 0 维测试点、1 维测试线和 2 维测试框三种探针。先在待测平面内随机叠加测试点、测试线或测试框,然后选择那些被测试点“击”中,被测试线“穿”过,或者被测试框“框”住的轮廓(图 1)。这三种方法抽选的结果各有不同。面积愈大的轮廓被测试点击着的机会愈大,直径愈大的轮廓被测试线穿过的机会愈大,因此利用测试点

的轮廓

或测试线所抽选的粒子中,愈大的粒子愈多。要让所有轮廓都有相等的机会被抽选,换句话说要进行无偏或均匀的抽样,需要利用测试框。类似地,要无偏计数平面上轮廓数,也需要借助测试框。完全位于测试框内的轮廓应该抽选或计数,而与测试框的边线有交叉的轮廓,存在着边缘效应。半自动或全自动图像分析中,可给每个轮廓指定一个或多个点^[2-3],将轮廓转化成 0 维(无大小)的点,从而消除边缘效应。用肉眼抽选或计数轮廓时,解决边缘效应的唯一无偏方法是采用禁线法则^[4]:抽选或计数只与长方形或正方形测试框的相邻两边,例如右边和上边,有交叉的轮廓,而不抽选或计数与测试框的禁线,即左边和下边以及左边向上的延伸线和右边向下的延伸线(可无限延伸),在任何交叉的轮廓(图 1)。

完

有

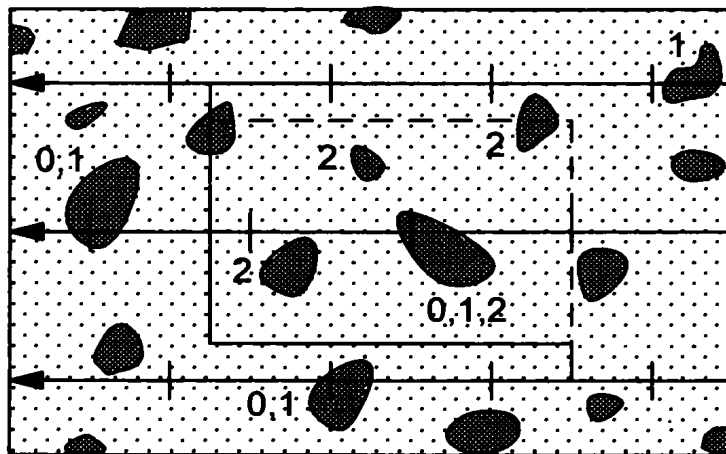


图 1 图示一长方形平面上有若干轮廓(阴影部分),其中随机叠加有一长方形测试框、3 条平行测试线(箭头线)和 12 个测试点(短竖线与测试线之间的交叉点)。测试框中的实线,即左边、下边以及左边向上的延伸和右边向下的延伸,即禁线。数字 0、1 和 2 表示这些轮廓分别被 0 维测试点、1 维测试线和 2 维测试框(根据禁线法则)所抽选。

假如上述平面轮廓是三维空间内粒子的截面(生物组织切片上观察到了结构如此,而体液涂片内的有形成分另当别论)。用0维测试点、1维测试线和2维测试框抽选或计数粒子,将分别取决于粒子的体积、表面积(粒子外表面的面积)和直径。即是说,体积愈大的粒子被(其随机截面内的随机)测试点击着机会愈大,表面积愈大的粒子被测试线穿过的机会愈大,直径愈大的粒子被测试框切着的机会愈大。因此,0维、1维或2维的探子不能无偏(或者说均匀)抽选或计数粒子。要无偏抽选或计数位于三维空间内粒子,必需利用三维探子——体视框(disector*)^[5]。

的

2 体视框

体视框由一平面(测试平面)内的测试框(已知面积 a)和另一与之相距一定距离(h)的平行平面

(或称对照平面,其范围可无限延伸)构成。它相当于具有一定体积($a \cdot h$)的长方体。将它随机地“插入”待测三维空间内,就可均匀抽选或计数粒子。其无偏法则是:抽选或计数那些被体视框的测试框所截(遵循禁线法则),而不被对照平面所截(即不在该平面上形成任何轮廓)的粒子(图2)。任一粒子在体视框的测试平面或对照平面上的轮廓,指的是属于该粒子的所有轮廓及其间的连线(如在一平面内该粒子形成有多个轮廓的话)。(每个凸型粒子在一个截面上只能形成一个轮廓,而凹型粒子可能形成多个。)为了保证如此抽选或计数粒子的无偏性,(1)任一粒子在测试平面和/或对照平面上形成的一个或多个轮廓,必需能鉴别、确定其是否来自同一粒子;(2)测试框与对照平面之间的距离不大于任一粒子在垂直于测试平面方向上的直径,以避免粒子被遗漏。

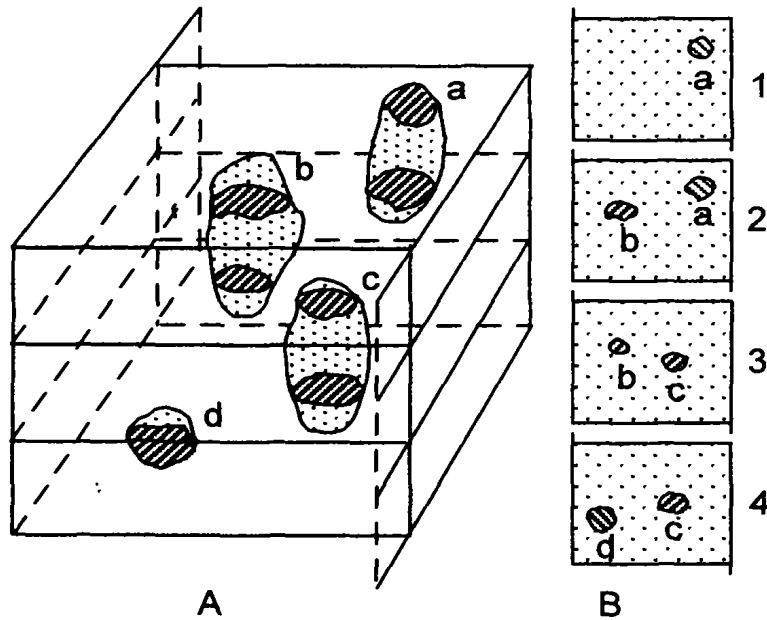


图2 图示一具有四个截面(1、2、3、和4)的体视框。A:三维示意图。B:平面示意图。a、b、c和d:四个粒子的编号。第1截面作为体视框的对照平面,第2到4截面依次作为体视框的测试平面,其上叠加测试框。根据体视框法则,已与第1截面相截的粒子a不被抽选或计数,粒子d的“头”被第4截面所截并且位于测试框内,应该被抽选或计数。该图中应该被抽选或计数的还包括粒子b和粒子c

利用体视框抽选或计数粒子,其无偏性不受体视框方向的影响,也不受截尾效应(即实际观测的显微组织图像中,粒子的两端部分的截面图像由于太小等原因,不能被观测到)的影响。利用体视框从上到下抽选或计数粒子(以上一截面作为对照平面),犹如在长方体空间内抽选或计数粒子的“头”端。由

于每个粒子有并且只有一个“头”,因此该抽选或该计数法则是无偏的。

* 译注——disector一词由di-(二、双)、-sect-(截、切)和or(名词后缀)三部分构成,其字面意义为“双截”,所以有人译之为“双截面体视框”。由于它实质是一个三维的长方体形测试框,笔者译之为“体视框”。

实践中,有物理体视框和光学体视框两种方式^[6]。前者利用两张或多张相邻的平行连续切片,在一切片平面上叠加测试框,另一切片平面作为对照平面。后者只利用一张厚切片,在该厚切片内连续“断层扫描”,作光学切片观察。物理体视框较适合于较大粒子,例如肾小球。对于较小的粒子,辨别鉴别两张(物理)切片上的哪些轮廓属于同一粒子将非常困难,常常需要先在多张连续切片的同一部位进行显微摄影,然后再在显微照片上仔细观察、匹配

各个粒子的轮廓^[7]。光学体视框克服了这一缺点。先在厚切片内选择一视野并在切片的上表面聚焦,叠加测试框,然后向下移动载物台,“断层扫描”观察切片。已在切片的上表面(体视框的对照平面)上形成有轮廓的粒子不计数,只计数向下聚焦时在体视框内(遵循体视框法则)新出现的粒子的“头”端(图2、3)。依此方法,粒子的辨认容易,而且其计数或抽选可立即完成,效率远远高于物理体视框。

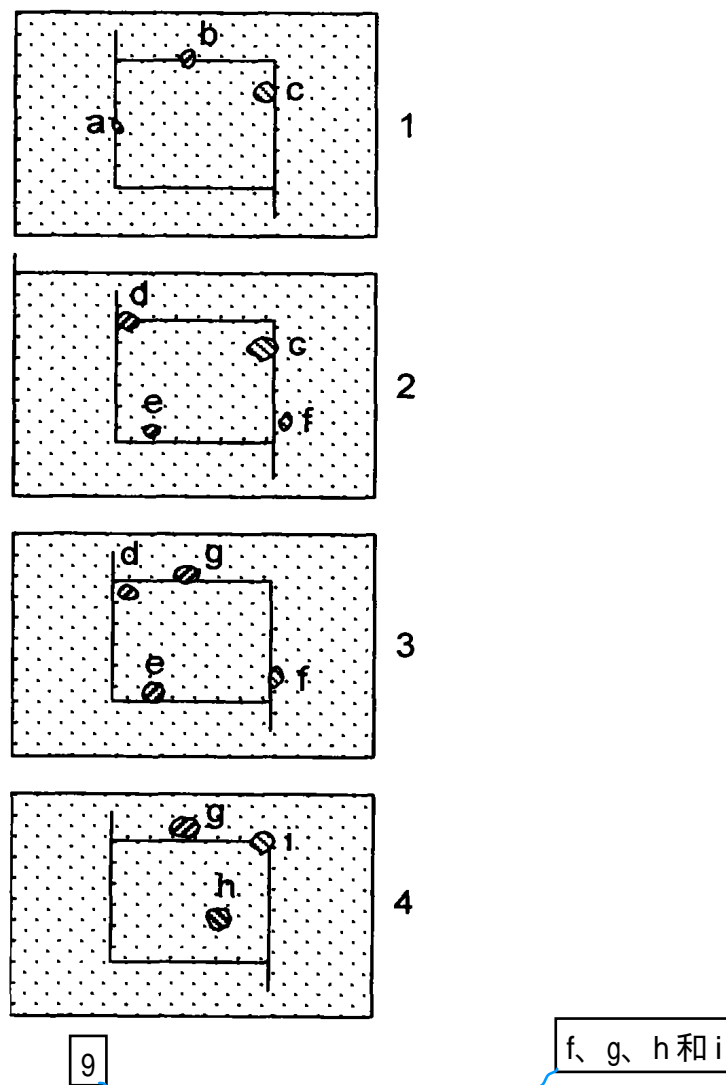


图3 光学体视框边缘效应的示意图。平面1到4为厚切片内依次向下聚焦所看到的聚焦平面。平面1内的长方形框为叠加的测试框,其左边、下边以及左边向上的延伸和右边向下的延伸为禁线。平面2至4内的测试框为平面1内的测试框在平面2至4内相应位置上的连续叠映。a至i分别表示8个粒子在这四个聚焦平面上所形成的轮廓(斜线阴影)。抽选或计数粒子时,从平面1起始(以此为对照平面),平面4终止。根据体视框法则,只有其中的粒子f、g和h才应该被抽选或计数。如果体视框仅在平面1和平面2之间,平面1为对照平面,平面2为测试平面,那么在平面2上的测试框内形成有轮廓的粒子e应该被抽选或计数。但在平面1至4之间的整个体视框中,粒子e与平面3内测试框的禁线相交,不应被抽选或计数。

光学体视框主要适用于较软的、可透射观察的生物显微组织。实施光学体视框需要相应的技术条件。(1)要能制作可清晰观察的厚切片。切片厚度以至少大于粒子的直径为宜。石蜡切片可切 $25\mu\text{m}$ 厚,但难以清晰观察其内部结构。一般的树脂(例如 Epon812)包埋组织难以切厚切片。较理想的是一种甲基丙烯酸树脂(methacrylate),可切 $25\mu\text{m}$ 甚至 $100\mu\text{m}$ 厚的切片。(2)要能精确测量厚切片内聚焦平面(光学切片平面)之间的距离。这需要给显微镜装上一个指针测微计以能精确测量载物台沿 Z 轴方向(垂直方向)移动的距离。(3)要用油镜(物镜)作(观察)光学切片,只有这样,指针测微计测量的载物台上下移动的距离,才等于厚切片内聚焦平面移动的距离(假设包埋树脂和镜油的折光率相同)。而且,最好用高数值孔径的油镜,以使光学切片更薄从而更清晰地观察粒子。(4)最好能通过图像系统在显示屏上清晰显示并测试切片组织图像,此时需要一个测试系统软件,以能能在所显示的组织图像上叠测试框。

加

3 光学体视框应用实例

从一正常成年(约 6 岁)猴子获取一睾丸,置 Bouin 氏液内固定过夜,然后置 70% 酒精内保存。12 周后称睾丸重为 17.3g,测其比重为 0.93。沿垂直于睾丸长轴方向将睾丸切成厚度相似的六个平行组织薄片(近似圆形),间隔抽取三片,然后从每片切取一个扇形组织块,其顶点大致在薄片的中心,大小约为组织薄片的 $1/8$ 。组织块经无水乙醇和正丁醇脱水后包埋入甲基丙烯酸树脂,然后从每个组织块切取一张 $25\mu\text{m}$ 厚的切片。三张切片的平均面积约为 80mm^2 。

为估计标本制备过程中可能引起的组织尺寸变化,另外切取一个组织块,包埋前称重以计算出其处理前体积。同上所述包埋该组织块,作连续切片将整个组织切完,根据等距抽样方法每隔 15 张切片抽取一张,从所抽选的组织切片的面积和切片的厚度,估计出组织处理后的体积^[7]。结果表明,组织处理前后的体积基本无差异。

切片经苏木素染色后,用数值孔径为 1.40 的油镜采集光学切片,在显示屏上观察组织图像。显示屏上叠映有四个(两排)等间距排列的长方形测试框,每个测试框的面积为 $252\mu\text{m}^2$ 。每个测试框的左下角的顶点被看作为一个测试点,计数位于组织切

片内测试点的数目以计算所用测试框的总面积。利用一电动载物台从切片的左上角开始等间距抽选视野。每个视野内的四个测试框中只有左上角的那一个测试框用于计数 1—12 期(step)精子细胞核(球形、椭球形)、13—14 期精子细胞核(扁长凹形),所有测试框于计数 A 型精原细胞核(球形、椭球形)、B 型精原细胞核(球形)、细线前期至合成期精母细胞核(球形)、粗线期精母细胞核(球形)、次级精母细胞核(球形)和支持细胞核(不规则凹形)。

计数细胞核时,先在厚切片的上表面上聚焦,然后向下聚焦 $3\mu\text{m}$,以此聚焦平面作为体视框起始平面,以避免在厚切片表面上可能出现的人工假象。然后慢慢向下连续聚焦 $10\mu\text{m}$,计数在该 $10\mu\text{m}$ 切片厚度内位于测试框内的细胞核的数目(根据上述体视框计数法则),所用体视框的总高度因此为 $10\mu\text{m}$ 。之所以只利用这 $10\mu\text{m}$ 厚度的切片组织,是为了避免在一个计数框内数过多的细胞,并避免可能发生的人工假象(例如下面的切片组织染色深度不够)。在一个测试框内可能有多种细胞,数细胞过多,例如超过 10 个,容易引起疲劳及计数误差。

三张切片内各共数了 276、432、和 308 个测试框(取决于切片的大小),其中仅 $1/4$ 的测试框用于计数了精子细胞。每张切片耗时 2.5~3 小时。三张切片内计数的细胞核总数分别为:支持细胞 94, A 型精原细胞 41, B 型精原细胞 33, 细线前期至合成期精母细胞 113, 精线期精母细胞 228, 次级精母细胞 13, 1—12 期精子细胞 246, 13—14 期精子细胞 67。

根据睾丸的重量和比重得睾丸的体积: $17.3/0.93 = 18.6\text{cm}^3$ 。根据所用测试框总数、每个测试框的面积和体视框的高度,得用于计数细胞的体视框的总体积为 $1016 \times 252 \times 10 = 2.56 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,其中仅 $1/4$ 的体视框用于计数精子细胞。将所计数的细胞核总数除以所用体视框的总体积,得单位体积睾丸组织内细胞的数目(假定细胞核的数目等于细胞的数目),后者再乘以睾丸的体积即得整个睾丸内细胞的总数。其结果是:支持细胞 0.68×10^9 , 所有生精细胞 12.21×10^9 。其中各型生精细胞的数目分别为:A 型精原细胞 0.30×10^9 , B 型精原细胞 0.24×10^9 , 细线前期至合成期精母细胞 0.82×10^9 , 粗线期精母细胞 1.66×10^9 , 次级精母细胞 0.09×10^9 , 1—12 期精子细胞 7.15×10^9 , 13—14 期精子细胞 1.95×10^9 。

块

块

上述基本方法为笔者最近在对人和猴类精子发生的研究中所采用。

4 小结

体视框的创新意义在于人们现在可以无偏估计显微粒子的数目及其平均尺寸。要估计粒子的数目,直接利用物理体视框、光学体视框或者双体视框(前两者的结合)^[6]计数粒子。若结合分合法(fractionator)的抽样方法,不需要知道器官的体积、组织处理过程中是否发生皱缩等变化(只要粒子不会被“漏掉”),也可无偏估计整个器官内粒子的数目^[8]。要估计粒子的平均体积,利用体视框估计单位体积器官内粒子的数目(N_v),并根据点计数估计单位体积器官内粒子所占体积的比例(V_v),则 V_v/N_v 即为粒子平均体积的估计。或者,先借助体视框均匀抽选粒子,然后用估计粒子尺寸的体视学方法估计所抽选的各个粒子的大小^[8]。与物理体视框相比,光学体视框具有效率高的优越性。

以往人们通常首先假设所测各个粒子为球形或椭圆形而且具有同样尺寸,然后从单位面积组织切片内粒子轮廓的数目和粒子的直径或粒子所占体积比例,来估计粒子的数目^[9]。实践中没有如此理想的粒子,这些都是有偏的体视学方法。而且,其偏差的大小和方向(高估或低估),实践中通常无法确定,因而也不能用统计检验比较两个或多个这样的估计值。

参 考 文 献

- [1] 杨正伟,叶常青。医用体视学的发展与展望。解剖学杂志,1995;17:79.
- [2] Miles RE. The sampling, by quadrats, of planar aggregates. J Microsc, 1978;113:257
- [3] Jensen EB, Sundberg R. Generalized associated point methods for sampling planar objects. J Microsc, 1986; 144:55.
- [4] Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microsc, 1997;111:219.
- [5] Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc, 1984; 134:127.
- [6] Gundersen HJG, Bagger P, Bendsten TF et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS, 1988;96:875.
- [7] Yang Zhengwei, Wreford NG, de Kretser DM. A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. Biol Reprod, 1990;43:629.
- [8] Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles, a review of unbiased number and size estimator and the presentation of some new ones. J Microsc, 1986;143:3.
- [9] Weibel ER. Stereological Methods. Vol 1: Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press, 1979:40-45.