

组织处理致组织体积变化对体视学估计影响的校正

杨正伟
(川北医学院形态定量研究室,四川 南充 637000)

【摘要】器官内组织结构的量(体积、表面积、长度、数量等)可用体视学(形态定量)方法通过测量组织切片进行估计,但切片组织通常经过了固定、脱水、包埋、切片和染色等处理,测量结果反映的是结构处理后的定量特征。组织处理后结构的体积等可能会发生改变,从而影响体视学估计结果;为了校正结果以反映结构处理前的定量特征,需要分别获得器官组织处理前和处理后的体积以估计组织处理后总的体积变化以及组织内所测结构的相应变化。本文较系统、全面地论述了用处理前后器官体积校正体视学估计的理论基础,如何获得这些体积,如何运用它们校正不同的体视学结果,什么情况下需要单独的校正实验,以及如何进行校正实验。本文的一个重要且新颖之处是引入了一个新概念:组织处理后的器官体积应该分为实际体积和虚拟体积两种,基于三维空间内(实际切片组织内)的测量和基于二维平面上(切片平面上)的测量的体视学估计,要分别基于实际体积和虚拟体积进行校正。

【关键词】组织处理;包埋;切片;组织学;形态定量;体视学
【中图分类号】 R329 **【文献标志码】** A

Correction of the effects of tissue volume changes caused by tissue processing on stereological estimates

YANG Zheng-wei
(Morphometric Research Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 The amounts (such as volume, surface area, length and number) of histological structures can be estimated with stereological (morphometric) methods by measuring tissue sections, but the section tissue has usually undergone processing such as fixation, dehydration, embedding, sectioning and staining and the measured results reflect the quantitative characteristics of structures after the processing. The volume and others of structures will likely change after tissue processing, thus affecting the results of stereological estimation; to correct the results so as to reflect the quantitative properties of the structures before processing, the respective volumes of the organ tissue before and after processing need to be obtained to estimate the overall tissue volume change post-processing and the corresponding change of structures of interest in the tissue. The present paper deals, in a systematic and comprehensive way, with the theoretical basis for correction of stereological estimates using the organ volumes before and after processing, how to obtain the volumes, how to use them to correct different stereological results, in which cases separate experiments are needed for correction, and how to implement the experiments for correction. An important and novel part of the present paper is introduction of a new concept; the organ volume after tissue processing should be categorized into two volumes - actual and virtual volumes; corrections for stereological estimates based on measurements in the three-dimensional space (within the actual section tissue) and those on two-dimensional planes (on sectional planes) should be based on the actual and virtual volumes, respectively.

【Key words】 Tissue processing; Embedding; Sections; Histology; Morphometry; Stereology

生物组织的体视学(形态定量)研究^[1],通常分为五步进行。第一步,获取所测器官(例如睾丸、大脑)组织——整个器官或其中的部分组织(块)。第二步,处理所取器官组织(块),即进行固定、脱水等处理,然后用石蜡或树脂包埋组织块(如需要)。第三步,用切片机从(包埋的)组织块切取切片,将之裱于玻片(光镜观察用)或铜网(电镜观察用)之上,然后进行染色。第四步,用显微镜观测染色后的组

织切片,即根据体视学原理,在切片上随机抽选部分切片视野或组织结构进行测量,由此定量研究所测组织结构(例如生精小管或某种细胞核)的几何特征,例如体积分数(V_V)、表面积密度(S_V)、长度密度(L_V ,对线形结构而言)、数密度(N_V ,对离散结构——粒子而言)——单位体积的所测器官组织内所测结构的体积、表面积、长度、数量。第五步,计算所测结构在所测器官组织内的总量,即将体积分数、

表面积密度、长度密度或数密度乘以所测器官组织的(总)体积,从而得到所测器官组织内所测结构的总体积(V)、总表面积(S)、总长(L)或总数(N):

$$T = T_v \times V' \tag{1}$$

式中 T 为所测结构的总量;V' 为包含所测结构的器官组织的(总)体积——参照(空间)体积; $T_v (= T/V')$ 为比值或密度——单位体积器官组织内所测结构的量(体积或数量等),在上述第四步进行估计。如果上述第四步估计的是局部尺寸,例如膜状结构的平均厚度、细胞核的平均体积,则不涉及下一步(第五步)的研究。

上述第四步估计的所测结构的密度 T_v ,是一个相对量,它不表示或说明所测结构的总量或绝对量有多少,它的增加或减少也不说明所测结构或包含所测结构的器官组织的总量是增加还是减少了。为了反映某种生理或实验状态下,所测器官组织内的所测组织结构究竟发生了什么形态变化——所测结构本身的体积或数量等究竟增加或减少了没有,或者说为了避免参照陷阱^[1],继续上述第五步的总量估计有必要,且重要。

公式 1 里的三个指标(总量、密度和参照体积)及其间的关系,从数学或体视学理论看,简单、完美。但稍加思考,其潜在的问题就会显露出来。第四步的密度估计是在切片组织上进行的,即我们的测量是在处理后(即经过了上述第二步和第三步的处理之后)的器官组织切片上进行的,不是在器官组织处理前(第一步取材获得的新鲜器官组织)的切片(或者说器官组织处理前的“原位切片”)上进行的。由此引出一系列的理论与实践问题:研究者最后要估计的结果,应该是处理前还是处理后的结果,即是处理前还是处理后的器官组织内所测结构的几何特征?理想的回答想必是,研究者希望最后的结果反映的是不受组织处理方法所影响的新鲜器官组织结构的特征。既然如此,那么公式 1 中的参照体积 V',应该是处理前还是处理后的体积?从处理后组织(切片)获得的结构特征,研究者能否完美复原处理前组织的结构特征,即能否把处理后结果校正为处理前结果?

不少实际研究中,人们多把组织块切取前的新鲜器官的体积(组织处理前)当作参照体积 V',将其与从切片(组织处理后)估计的密度 T_v 相乘获得结构总量 T(公式 1)。这里有一个潜在假设:假设最后显微观测的切片,是新鲜器官组织的“原位切片”,即上述第二步和第三步的处理没有改变所测组织结构及其周围结构的几何特征。基于这个假设的定量研究,尤其是有对照组的对比研究,不少研究

者、编辑、读者或同行,都可能会基本接受,因为它是基于观测数据的客观判断,远优于一般的组织病理学定性研究——基于切片观察感觉的主观判断。不过,这样获得的定量结果,可能因为组织处理方法的不同而不同。此外,这样获得的结果未必是真实或无偏的结果。举个例子,假设组织处理(上述第二步和第三步)之后,某器官内的某种细胞核的总数不会改变(即细胞核不会因为组织处理而消失),但器官(切片组织)的体积将减少(皱缩)或者增加(膨胀)1/4(25%),那么从切片(组织处理后)估计的细胞核的数密度(单位体积器官组织内细胞核的数量),与真实数密度(组织处理前)相比将会分别增加 1/3 (= 1/0.75 - 1) 或者减少 1/5 (= 1 - 1/1.25),因此,从切片估计的数密度与处理前的器官体积相乘所得的细胞核总数,与细胞核真实总数相比将会分别增加(高估)1/3(33%)或者减少(低估)1/5(20%)。这是不小的偏差(bias)——系统误差。不可否认,较完善的定量研究,最好能考虑组织处理所致组织体积变化对体视学估计的影响。

笔者曾于 2012 年论述如何校正组织处理致组织变化(组织皱缩与切片压缩)对体视学估计(主要是总量估计)的影响^[1]。其基本方法是,估计器官组织处理前的体积以及处理后的体积,计算体积变化情况(组织皱缩系数),然后用以校正不同的体视学测量指标。不过,笔者实验室最近(2024 年)的论文进一步阐明了,校正不仅要考虑体视学测量指标,还要考虑测量所用体视学方法——是基于二维(切片)平面上的测试(例如交点计数、轮廓计数、截距等的长度测量)还是基于三维(实际切片组织)空间内的测试(例如用体视框计数粒子、用祖暅原理估计粒子的体积):校正要基于所用体视学方法分别用到两个不同概念的处理后体积——虚拟(virtual)体积和实际(actual)体积^[2]。至此,校正相关的理论基础与实践操作已比较完善,因此本文对组织处理致组织体积变化对体视学估计(包括总量和局部尺寸估计)的影响,进行更系统、全面的论述。

1 组织处理对组织体积与结构特征的影响

就常用的石蜡或树脂包埋切片而言,组织处理对组织体积的影响主要出现在包埋过程(上述第二步组织处理)和制片过程(上述第三步组织处理)。见图 1 及图 2。把包埋的组织块完全切成连续切片,并用所有连续切片三维重建,可通过对比三维重建的组织块的体积与处理前组织块的体积,估计包埋过程和制片过程导致的总体积变化。

包埋过程可引起组织体积变化,即器官组织

(块)经固定、脱水和包埋之后体积可能减少或增加了。制片过程也可引起组织体积变化,主要体现在切片面积(切片组织聚焦观察平面的大小)和切片厚度的变化。总的来讲,最后实际获得的连续切片——有一定的面积和实际厚度——三维重建之后有一个组织体积:处理后实际体积。不过,多数体视学方法基于的是切片平面(穿过器官组织的二维截面)上的测试,即测试结果与切片的实际面积有关,而与切片的实际厚度无关(假设切片的实际厚度不影响切片平面上的测试结果)^[1]。由此引出另一个处理后组织体积——虚拟体积:由连续切片平面——有一定的面积和间距(没有厚度)——三维重建之后的体积(本文 3.2 部分)。

组织结构的组织学(形态)特征——形状、大小、多少和空间分布,由其几何特征决定。几何特征可概括为度量特征和拓扑特征:体积、表面积、长度、直径等为度量特征,粒子的数量属于拓扑特征——不受结构连续形变所影响的特征^[1]。例如一个肾小体或细胞核之类的粒子,它变扁变长或变大变小可影响其度量特征——直径、表面积和体积,但不影响其数量(拓扑特征)——它还是一个粒子。

器官组织体积的变化将会如何相应影响组织内所测结构的定量特征?假设所测结构及其周围结构的体积变化均匀(uniform)——在三维空间内各个维度或方向的改变程度都相同或成比例^[2],那么任何结构的体积及其表面积、直径的改变程度就对应于一个球体的体积及其球面、直径的改变程度。例如,一个球体的体积如均匀皱缩 25% 或膨胀 25% (即变成一个体积减少 25% 或体积增加 25% 的球体),那么其表面积将皱缩 17.5% [$= 1 - (1 - 25\%)^{2/3}$] 或膨胀 16.0% [$= (1 + 25\%)^{2/3} - 1$],其直径将皱缩 9.1% [$= 1 - (1 - 25\%)^{1/3}$] 或膨胀 7.7% [$= (1 + 25\%)^{1/3} - 1$]。假设所测结构及其周围结构的体积变化均匀或成比例,那么组织体积的改变,将不影响所测结构体积分数(比例)的估计。不论组织体积是否均匀改变,组织体积(参照体积)的改变将直接影响粒子的数密度,但不影响其总数。

注意,组织处理致组织体积变化对组织内所测结构的影响,或者说组织处理直接对所测结构的影响,实际上不能无偏估计,除非研究者能观测并对比处理前、后所测结构的特征。实际的估计都必需基于(模型)假设。例如,假设组织处理不会导致细胞核等粒子的破坏或消失——这个假设可以接受,那么粒子的总数(拓扑特征)就不会受组织处理的影响。假设所测结构及其周围结构的变化均匀(上

述)——这个假设基本可以接受但实际情况未必如此,那么基于组织处理后总的体积变化,就可估计组织内包含的所测结构的体积、表面积、长度等(度量特征)的相应变化^[1-2]。

2 如何估计处理前器官组织的体积

尽量获得处理前器官组织(包含所测结构的参照空间)的体积[本文用 V' (pre) 表示],是体视学研究的一个基本步骤,不论是否需要用这个体积来校正体视学估计结果(文内 4 和 5 部分),因为它本身就是一个重要的形态特征,可直接反映器官的组织结构总量或生长发育情况(例如器官是否萎缩或肿胀),从而间接反映个体内该器官组织的总的功能情况(例如总的生理或病理功能是否可能减弱或增强)。

理想的处理前状态是器官组织取材前的活体状态,即最好能获得取材前的新鲜活体器官体积,以此作为处理前器官组织体积。活体器官组织的体积,可通过 CT 或 MRI 获取器官组织的连续断层图像,然后运用祖暅原理[英语文献常称为卡瓦列里(Cavalieri)原理]根据断层的层厚和总面积估计其体积^[1-4]。

对于实验动物,常用的方法是动物麻醉或处死后立即取出完整器官,以此新鲜取材器官的体积作为处理前体积。对于不必先切成较小组织块再进行固定的较小器官,最好先将整个器官(包括部分附着在器官周围的、不易游离的其他组织)充分固定,然后置入 70% 乙醇(器官组织可在其中长期保存),在此脱水保存期间进行组织处理:游离器官并估计其体积(以此体积作为处理前体积),然后按照随机抽样要求切取组织块。这样做可较从容地完成重要的组织处理过程。笔者实验室有试点研究表明,浸润固定(不论是否事先进行了灌注固定)后在 70% 乙醇里脱水保存的器官的体积,与其取材时(固定前)的体积差别不大^[5-6]。

估计器官处理前体积之前,要注意完整游离器官,勿破坏器官的被膜。较大的器官可用祖暅原理或排水法(water displacement)估计其体积,较小的器官首选称重法(基于其质量和密度)估计其体积^[1]。较小器官称重前,要注意蘸干其表面附着的液体,也要注意勿把器官放置外面过久以免器官内水分挥发。有内容物(异物)的器官(例如膀胱、大血管、胃),称重前要注意排空其内容物。对于内容物难以排空的小肠、结肠,根据称重法估计的总体积,也许可这样除去其内容物的体积:随机切取部分

肠段,排空其内容物前、后分别称重,由此计算内容物所占质量比例,估计内容物的体积。

对于包含在较大器官内的“小器官”(例如神经核团、颈动脉体、心室^[7]、海马^[8]),处理前最好能仔细把它游离出来,然后测其体积(用称重法或祖暅原理)。只要其完整,即使游离不全(仍有少部分的其他组织附着)关系也不大;可把仍然附着的其他组织当作该器官组织的一部分来研究,这不会影响所测结构的总量或局部大小^[8]。大器官内的“小器官”,尤其是那些难以游离的(例如大脑白质^[9]或灰质、心室或心房壁),其处理前体积也可这样估计:将包含整个所测器官组织的较大器官(组织),切成平行、等厚的组织薄片,然后观察整个所测器官组织的所有不同切面(组织薄片的同侧剖面),用祖暅原理(根据切面间距和切面总面积)估计其体积。把包含有测点的透明胶片测格叠加在组织切面上,肉眼或用解剖显微镜放大后计数测点,或者把组织切面扫描后用 Photoshop 观察,然后叠加并计数测点,这样就可估计切面总面积^[1-4,9]。为了有效的减少估计误差,要注意保证连续切面的总数不太少。例如,对于不规则的器官组织,连续切面的总数≥10 个^[1]。

对于不同组织结构在器官内分布比较均匀的器官,为了简便和减少工作量,可从器官切取一个组织块当作处理前“器官”,根据称重法估计其处理前体积;该“器官”包埋并完全切成连续切片后再估计其处理后体积。不过,这种方法有几个潜在问题要注意。(1)对于睾丸那种有明显内压的器官,组织块一切取就可能发生一定的皱缩^[2],因此这种“组织块器官”不能很好的代表处理前状态的完整器官。可以想象,肺组织块更有可能出现这种情况:组织块一切取就可能出现一定的塌陷——肺泡里的气体或液体(固定脱水后)在切取组织块时会有一定程度的流出。血供较丰富的器官,组织块切面出血可影响其质量与体积的准确获得。鉴于此,这样的组织块最好是在器官固定脱水后——血液凝固后切取,即把器官固定后脱水保存期间当作器官处理前状态。(2)没有完整被膜的小组织块,其质量的称量易受其表面附着液体的量的影响,其密度估计也易受液体渗透组织块的影响。(3)所取组织块的处理后变化,未必能很好的代表器官不同部位组织块的处理后变化,因此这样的组织块最好从器官的不同部位随机切取。

3 如何估计处理后的器官组织的体积

器官组织处理主要有两步:引言部分所述第二

步(从固定到包埋)和第三步(制片)。用于校正体视学估计结果的包含所测结构的器官组织的处理后体积[本文用 $V'(\text{post})$ 表示]有两个概念:一是处理后实际体积 $V'(\text{post}, \text{act})$,二是处理后虚拟体积 $V'(\text{post}, \text{vir})$,前者用于校正基于三维空间里的测试的体视学估计,后者用于校正基于二维平面上的测试的体视学估计(见文内引言部分)。

3.1 处理后实际体积的估计

器官组织(块)包埋后有一个体积,这里称之为处理后包埋块(embedded block)的体积 $V'(\text{post}, \text{eb})$ 。见图 2B。通过整个包埋块,假想作等距平行截面。见图 2B。根据本文涉及的内容,本文将平行截面的间距表示为 $t(\text{ba})$,意为切片机设定的切片厚度或组织块步进(block advance)。(根据我们的试点研究,Leica 切片机设定的切片厚度相当准确^[2]。)平行截面上包埋块切面的面积,本文表示为 $a(\text{eb})$,意为包埋块切面积。根据祖暅原理,如果等距平行截面(任一方向的)的位置是随机的(准确的讲是第一个通过包埋块一端的截面,距离该端的距离是在 0 与 $t(\text{ba})$ 之间随机确定),就可根据截面间距和包埋块切面总面积无偏估计包埋块的体积^[1-2]:

$$V'(\text{post}, \text{eb}) = t(\text{ba}) \times \sum a(\text{eb}) \tag{2}$$

当平行截面的间距很小时,包埋块相邻切面的面积就会接近,相邻切面之间的组织就可看作为切片组织,这样包埋块的体积就是所有连续切片组织的体积之和,因此公式 2 中的 $\sum a(\text{eb})$ 可用连续切片的总面积估计^[1]。

从包埋块实际切取的切片,染色后(观测前)有一个面积,这里称之为 $a(\text{post})$,即处理后用于显微观测的切片面积(图 1 及图 2)。由于制片过程可能引起的变化,这个面积可能不同于切片在相应包埋块上留下的切面的面积 $a(\text{eb})$;此外,切片的实际厚度 $t(\text{act})$ 与切片机设定的厚度 $t(\text{ba})$ 相比也可能不同。即用从包埋块切取的所有连续切片(染色后)三维重建后复原的器官组织块的体积,由于切片面积的变化不同于包埋块的体积(图 2)。这个由实际切片重建的器官组织(实际空间)的体积,即处理后实际体积,它可根据切片实际厚度和连续切片的总面积用祖暅原理如下估计:

$$V'(\text{post}, \text{act}) = t(\text{act}) \times \sum a(\text{post}) \tag{3}$$

式中的切片实际厚度 $t(\text{act})$,对于光镜切片而言,最好用指针测微计(microcator)测量:在油镜下观察切片,先在切片组织上表面聚焦(观察到组织结构),然后在其下表面聚焦,指针测微计即可测量(显示)

上、下聚焦平面的间距,这个间距即为切片组织的实际厚度^[1-2]。

总之,一个器官组织块的处理后实际体积,可根据公式 3 用整个器官组织块的连续切片(染色后)估计。实际研究中,通常不必测量所有连续切片,可等距随机抽取其中的部分切片(从经验上讲抽选的切片总数最好不少于 10 张)来裱片、染色然后测量^[1-2]。例如,先在 1 至 20 之间均匀随机确定一个正整数 n (可用 Excel 软件的公式“ $=20 * \text{RAND}() + 0.5$ ”确定),然后抽选第 n 张、第 $(n + 20)$ 张、第 $(n + 40)$ 张……连续切片,此即每 20 张抽选 1 张的等距随机抽样^[1]。根据分合法(fractionator)^[1-2,10],假设每 $n(\text{sec})$ 张[“ $n(\text{sec})$ ”为正整数]连续切片抽选了 1 张,那么所选切片(染色后)的总面积与 $n(\text{sec})$ 之积就是公式 3 里 $\sum a(\text{post})$ 的无偏估计。

对于较大的器官(组织),一般不能把它完整包埋并切片。此时,可先把整个器官切成组织块,然后等距随机抽选其中的部分组织块,分别包埋各个所选组织块并连续切片。根据分合法,假设每 $n(\text{blo})$ 个[“ $n(\text{blo})$ ”为正整数]组织块抽选了 1 块,那么所选组织块的处理后实际体积之和乘以 $n(\text{blo})$,就是整个器官处理后实际体积的无偏估计^[1-2]。如研究者不知道组织块的抽样间距 $n(\text{blo})$,那就最好能在把整个器官(处理前)切成组织块后立即获得两个质量:所有组织块的总质量以及其中所选组织块的总质量。这样,前一个质量与后一个质量之比(未必是整数)就可用作 $n(\text{blo})$ 的近似估计^[1-2]。不过注意,这只是近似估计,不是没有偏差(即使偏差可能不大),因为分合法(本质是从抽样间距和样本量获得总量的统计方法^[1])需要的组织块抽样间距不等同于这个质量比,除非器官组织均质——各处或各块的密度(g/cm^3)都相同。尤其是,这个质量比还容易受组织块的切取或称重操作(主要是组织块内液体溢出或浸入)的影响。

3.2 处理后虚拟体积的估计

如把从包埋块切取的切片当做器官组织的二维截面——这是多数体视学估计的理论基础,那么包埋块切片后的组织体积改变就体现在切片面积的改变上。切片最初的面积(即该切片在包埋块上留下的切面的面积)为 $a(\text{eb})$,染色后(观测前)变为 $a(\text{post})$ 。见图 1 及图 2。这种面积变化犹如通过缩小或放大切片面积来均匀缩放整个包埋块,更简单、形象的讲犹如用鼠标成比例的缩放三维图像一样。这个缩放后的包埋块体积即处理后虚拟体积(图 2

及图 3)。

根据切片(染色后)面积及该切片在包埋块上留下的切面积,研究者可如下估计处理后切片面积变化比(ratio of area change)^[2]:

RAC = a(post) ÷ a(eb)

(4)

由此研究者可进一步估计如上缩放后的器官组织的二维截面间距。这个间距本为 $t(\text{ba})$ ——切片机设定的切片厚度,如上缩放后即变为可如下估计的切片虚拟厚度^[2]:

t(vir) = t(ba) × RAC^{1/2}

(5)

由此研究者可如下进一步估计器官组织的处理后虚拟体积^[2]:

V'(post, vir) = t(vir) × ∑ a(post)

(6)

这样获得的体积,犹如间距为 $t(\text{vir})$ 、总面积为 $\sum a(\text{post})$ 的连续切片平面围成的虚拟空间的体积,它与切片的实际厚度无关(图 2 及图 3)。与处理后实际体积的估计(公式 3)相比,处理后虚拟体积的估计(公式 6)同样是根据祖暅原理的估计(同样需要如上估计连续切片的面积),但不需要估计切片实际厚度(少一个麻烦),而需要估计切片面积变化比(另多一个麻烦)。

有两种特殊的组织块切片——不经过包埋处理的冷冻切片和振动切片,其处理后实际体积的估计仍需用连续切片(见公式 3),处理后虚拟体积的估计同样需要知道切片面积的变化,只是组织包埋块切面的面积[$a(\text{eb})$]在这两种情况下是组织块切面的面积(公式 4-6)。

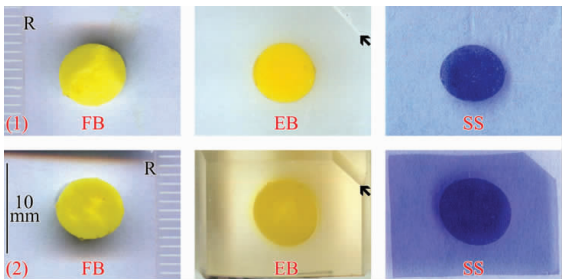


图 1 组织块(包埋前后)和切片扫描图

FB(新鲜块):大鼠睾丸横切组织块(包埋前,经过了 Bouin 液浸润固定和 70%乙醇脱水处理),分别用于石蜡(1)和甲基丙烯酸树脂(2)包埋;EB(包埋块):组织块的石蜡(1)、甲基丙烯酸树脂(2)包埋块[切取切片(SS)之后];SS(染色切片):从包埋块切取的切片(已染色并封片)——已脱蜡的石蜡切片(1)和未脱树脂的树脂切片(2)。↖,石蜡块(1)、树脂块(2)的一个切角,用以统一确定裱片(把切片捞取在玻片上)时放置切片的方向。R:扫描图像时在 FB 旁边放置的普通直尺(未必非常精确)图像的一部分(刻度线间距为 1 mm)。左下的竖线(10 mm):反映扫描图真实尺寸的标尺。(注,这些扫描图来自笔者实验室最近的研究[□]。)

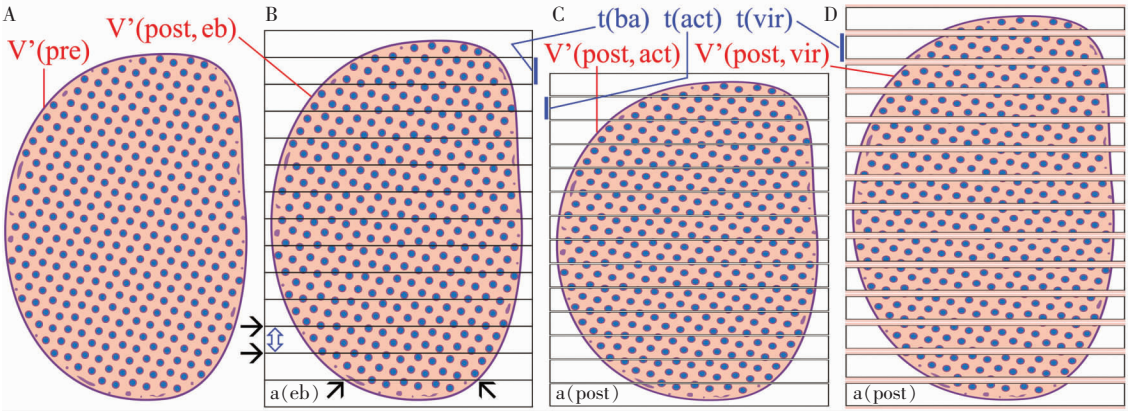


图 2 组织处理后体积变化示意图

图 2A 示处理前器官(组织块),其体积为 $V'(\text{pre})$,内含球形粒子。图 2B 示该器官包埋后,其体积为 $V'(\text{post}, \text{eb})$,等于通过包埋块的等距截面的面积“ $a(\text{eb})$ ”(箭头↗和↘之间)总和乘以截面间距“ $t(\text{ba})$ ”(↕)。图 2C 示该器官(包埋块)完全连续切片后,由连续切片(染色后)三维重建的器官(实际空间),其体积为 $V'(\text{post}, \text{act})$ ——处理后实际体积,等于切片面积“ $a(\text{post})$ ”的总和乘以切片的实际厚度“ $t(\text{act})$ ”。图 2D 示该器官(包埋块)的连续切片基于切片面积的变化均匀缩放后再三维重建的器官(虚拟空间),其体积为 $V'(\text{post}, \text{vir})$ ——处理后虚拟体积,等于切片面积“ $a(\text{post})$ ”的总和乘以切片的虚拟厚度“ $t(\text{vir})$ ”,与切片的实际厚度无关。这个均匀缩放是三维缩放;切片长宽的均匀缩放[基于从 $a(\text{eb})$ 向 $a(\text{post})$ 的缩放比例]以及 $t(\text{ba})$ [实际上就是切片时的包埋块步进或者说切片机设定的切片厚度]与切片长宽一起的均匀缩放[$t(\text{ba})$ 缩放后变成 $t(\text{vir})$]。该图显示的是甲基丙烯酸树脂包埋睾丸切片组织处理后的大致变化[2];组织块包埋后膨胀(体积增加),包埋块切片后切片扩张(面积增加)、变薄(实际厚度减少),切片平面的间距因为切片扩张而相应扩大(虚拟厚度增加)。

化比 $RVC(\text{act})$ 和虚拟体积变化比 $RVC(\text{vir})$ 。这两个系数(比值)可用包含所测结构的器官组织的处理前体积以及处理后实际体积与虚拟体积(公式 3 及公式 6)分别估计:

$$RVC(\text{act}) = V'(\text{post}, \text{act}) \div V'(\text{pre}) \tag{7}$$

$$RVC(\text{vir}) = V'(\text{post}, \text{vir}) \div V'(\text{pre}) \tag{8}$$

其中的实际体积变化比用于校正基于三维空间里的测量的体视学估计,虚拟体积变化比用于校正基于二维平面上的测量的体视学估计。

4.1 总体积的校正

假设处理后器官组织及其包含的所测结构(任何结构)的体积变化均匀或成比例(见文内 1 部分),那么,从根据测点计数(切片平面上的测量)估计的整个器官组织内所测结构的体积分数 $V_v(\text{post})$ [处理后器官组织内所测结构所占的体积比例],应如下估计处理前器官组织内所测结构的总体积 $V(\text{pre})$ [1]:

$$V(\text{pre}) = V_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \tag{9}$$

该项估计没用体积变化系数,直接用了处理前器官组织的体积 $V'(\text{pre})$ (见文内 2 部分),因为我们假设了组织体积的均匀变化,即组织处理前、后所测结构的体积分数不变。换言之,我们相当于在 $V'(\text{pre})$ (公式 9) 的后面乘以了一个等于 1 的校正系数: $RVC(\text{vir})^{0.3}$ 。

4.2 总表面积的校正

假设处理后器官组织及其包含的所测结构(任

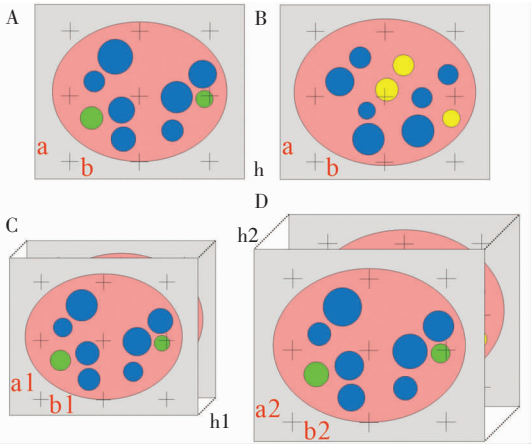


图 3 虚拟体积示意图

图 3A 和 3B 示通过某器官组织(处理前)的两个平行截面(切片),截面宽、长分别为 a 、 b ,截面间距(高)为 h ,截面之间的空间(长方体形组织块)的体积为 $axbh$ 。组织处理后该空间发生了变化;这个空间的长、宽均匀(成比例)缩小(图 3C)或放大(图 3D),这个空间的高也随之成比例减少或增加。这个缩小或放大的相似空间(虚拟空间)的体积(分别为 $a_1xb_1xh_1$ 和 $a_2xb_2xh_2$)即器官组织处理后的虚拟体积。

4 如何校正组织体积变化对体视学估计的影响

把从切片组织(处理后)测量的结果(几何特征),校正为处理前器官组织的“原始”结果,需要获得器官组织处理前体积、处理后体积和两个体积变化比 $RVC(\text{ratio of volume change})$ ——实际体积变

何结构)的体积变化均匀,那么,从根据交点计数(切片平面上的测量)估计的整个器官组织内所测结构的表面积密度 $S_v(\text{post})$ [单位体积的处理后器官组织内所测结构的表面积],研究者应如下估计处理前器官组织内所测结构的总表面积 $S(\text{pre})$ ^[1-2]:

$$S(\text{pre}) = S_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \times \text{RVC}(\text{vir})^{1/3} \tag{10}$$

该项估计用了体积变化系数:虚拟体积变化比的立方根。这个公式之所以成立是因为^[1]: $S(\text{pre}) = S(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{2/3} = S_v(\text{post}) \times V'(\text{post}, \text{vir}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{2/3}$ 。该式中的 $S(\text{post})$ 表示处理后器官组织内所测结构的总表面积,把公式 8 的 $\text{RVC}(\text{vir})$ 代入该式即得公式 10。

4.3 总长的校正

假设处理后器官组织及其包含的所测结构(线形结构)的体积变化均匀,那么,从根据轮廓计数(切片平面上的测量)估计的整个器官组织内所测结构的长度密度 $L_v(\text{post})$ [单位体积的处理后器官组织内所测结构的长度],研究者应如下估计处理前器官组织内所测结构的总长 $L(\text{pre})$ ^[1,2]:

$$L(\text{pre}) = L_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \times \text{RVC}(\text{vir})^{2/3} \tag{11}$$

该项估计用了体积变化系数:虚拟体积变化比的 2/3 次方。这个公式成立是因为^[1]: $L(\text{pre}) = L(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{1/3} = L_v(\text{post}) \times V'(\text{post}, \text{vir}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{1/3}$ 。该式中的 $L(\text{post})$ 表示处理后器官组织内所测结构的总长,把公式 8 的 $\text{RVC}(\text{vir})$ 代入该式即得公式 11。

对于非常细小的线形结构(例如神经纤维、毛细血管),推测其处理后变化可能不均匀——其长度变化与其体积变化不一致,更可能的实际情形是:处理后其长度不变。如接受这个假设,我们可如下近似估计 $L(\text{pre})$ ^[1]:

$$L(\text{pre}) = L_v(\text{post}) \times V'(\text{post}, \text{act}) = L_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \times \text{RVC}(\text{act}) \tag{12}$$

注意,该公式(与公式 14 相似)成立需要的假设——组织处理后线形结构的总长不变,有点特别,笔者未见研究证明过。

管状结构的长度也可由其体积与横断面积估计^[1,11-12],等于组织处理前结构的总体积 $V(\text{pre})$ 除以处理前结构的平均横断面积 $\bar{a}(\text{pre})$ 。这里, $V(\text{pre})$ 不需要校正(见公式 9),但 $\bar{a}(\text{pre})$ 需要(见公式 17)。

4.4 总数的校正

从根据轮廓计数和直径测量(切片平面上的测量)估计的数密度 $N_v(\text{post})$ [单位体积的处理后器

官组织内所测粒子的数量],研究者应如下估计处理前器官组织内所测粒子的总数 $N(\text{pre})$ ^[1-2,13]:

$$N(\text{pre}) = N_v(\text{post}) \times V'(\text{post}, \text{vir}) = N_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \times \text{RVC}(\text{vir}) \tag{13}$$

该项估计假设了组织处理后粒子的总数不变,因此用了处理后虚拟体积(公式中间)和虚拟体积变化比(公式右侧)。

但从用物理或光学体视框(用于粒子计数的三维测框)估计的数密度 $N_v(\text{post})$,研究者应如下估计 $N(\text{pre})$ ^[1-2,14]:

$$N(\text{pre}) = N_v(\text{post}) \times V'(\text{post}, \text{act}) = N_v(\text{post}) \times V'(\text{pre}) \times \text{RVC}(\text{act}) \tag{14}$$

该项估计假设了组织处理后粒子的总数不变,因此用了处理后实际体积(公式中间)与实际体积变化比(公式右侧)。这里之所以要用处理后实际体积(而不是虚拟体积),是因为用体视框计数粒子,本质上是在处理后的实际切片组织(三维)里直接计数粒子(本身),而不是在切片平面(二维)上计数粒子轮廓。

粒子总数也可这样估计:先用粒子的体积分数与平均体积之比估计粒子数密度^[1,13,15],然后用该密度与器官组织体积之积估计粒子总数。换言之,粒子总数等于组织处理前粒子的总体积 $V(\text{pre})$ 除以处理前粒子的平均体积 $\bar{v}(\text{pre})$ 。这里, $V(\text{pre})$ 不需要校正(见公式 9),但 $\bar{v}(\text{pre})$ 要基于估计平均体积所用的方法进行相应的校正(见公式 15 和 16)。

4.5 平均大小的校正

从基于祖暅原理估计的实际切片组织内粒子的平均体积 $\bar{v}(\text{post})$ (参考公式 3) ^[1],研究者应如下估计处理前粒子的平均体积 $\bar{v}(\text{pre})$:

$$\bar{v}(\text{pre}) = \bar{v}(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{act}) \tag{15}$$

该项估计用了体积变化系数:实际体积变化比。

从根据切片平面上的测量估计的粒子平均体积 $\bar{v}(\text{post})$ [例如根据点取截距、核距或转距等长度值估计的粒子体积^[1]以及根据祖暅原理估计的“虚拟空间内”粒子的体积(参考公式 6)],研究者应如下估计组织处理前粒子的 $\bar{v}(\text{pre})$:

$$\bar{v}(\text{pre}) = \bar{v}(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{vir}) \tag{16}$$

该项估计用了虚拟体积变化比。

在切片平面上估计(根据测点计数或直径测量等)的任意轮廓的面积^[1],研究者应如下估计处理前轮廓的平均面积 $\bar{a}(\text{pre})$:

$$\bar{a}(\text{pre}) = \bar{a}(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{2/3} \tag{17}$$

该项估计用了体积变化系数:虚拟体积变化比的 2/3 次方。

从根据切片平面上的测量(截距、宽度或直径

等的测量)估计的薄膜厚度、小管直径、粒子直径等平均大小(距离) $\bar{d}(\text{post})^{[1]}$, 研究者应如下估计处理前结构的平均大小 $\bar{d}(\text{pre})$:

$$\bar{d}(\text{pre}) = \bar{d}(\text{post}) \div \text{RVC}(\text{vir})^{1/3} \quad (18)$$

该项估计用了体积变化系数:虚拟体积变化比的立方根。

5 讨论

本文在上面比较系统的讲了组织处理会引起组织体积改变从而影响体视学估计,也讲了如何估计组织体积变化以及如何根据组织体积变化来校正这种影响,下面讨论重要相关问题。

生物器官组织多是软组织,其显微观测前多要经历一系列的包埋和制片处理,处理过程会引起组织结构的尺寸改变,从而影响其体视学估计结果。研究或总结这种影响及其校正方法的文章,其实也不算很少^[16-18],笔者实验室长期以来就有涉及^[19-20]。但以往的研究不是不全面就是不成熟:以往很少有研究涉及组织处理全过程的组织体积变化,很少有研究采用无偏的设计^[2]。无偏的设计有如:用祖暅原理,结合分合法以及用指针测微计测量的切片实际厚度,以估计组织处理后的实际体积(文内 3.1 部分);用同样的方法扫描观察组织块切面和切片并用测点计数法估计其面积^[2,20]。尤其是,虚拟体积变化的重要概念最近才提出^[2],以前没有认识到校正涉及两种体积变化——组织处理后实际体积和虚拟体积变化,用不同体视学方法获得的结果要用不同的组织体积变化来校正。随着理论思考与技术实践趋于成熟^[2],相信未来会有不少研究人员重视这个校正问题,并进行实际校正研究,为体视学的应用研究提供更多的具体方法与数据参考。

5.1 校正的意义与准确性

组织切片观测前经过的包埋和制片处理,涉及不同类型、大小或形状的器官和从器官切取的组织块,不同种类的固定剂、脱水剂、包埋剂以及不同的固定时间、脱水方法和包埋过程,不同的切片工具与厚度,不同的裱片与染色方法,且不同实验室或研究者可能有不同的处理经验与步骤。因此,处理后组织切片上的定量研究结果最好能校正到处理前组织状态的定量结果——相当于在组织处理前的“原位组织切片”上的定量结果,这样的结果更“标准”,更有可比性。例如,有人研究了不同年龄人脑皮质里的神经元数量,如果假定不同年龄大脑组织石蜡包埋后的体积变化程度相同,研究结论就是老年大脑皮质神经元数量减少;但事实是,年轻大脑的皮质的组织皱缩较大,考虑了这个因素后正确获得的重要结论是:人一生中不伴有大脑皮质神经元的丢

失^[21]。这是一个经典例子,它体现了校正组织处理致组织体积改变对体视学估计影响的重要意义。石蜡切片与树脂切片组织处理致组织体积改变有明显的差异,冰冻切片或振动切片的组织改变可能更是明显^[22-23],这些事实也体现了校正组织处理后改变的必要性。

当然,校正的结果(处理前结果)不会是绝对准确或完美的,因为研究者实际上不知道处理前的真实结果——对照标准,即没有活体或处理前器官组织的标准结果来与校正结果对比。不过,组织处理所致结构形态特征的改变本质上是物理的、机械性改变。因此,只要最后观测的切片看起来比较好、平整,结构内、结构间没有明显的裂隙、空洞、皱褶或重叠等人工假象^[24-25],就可基本判断组织处理后改变基本均匀或成比例。这个判断或假设,是校正的基础(见文内 1 和 3 部分),校正实践中研究者不得不接受,除非有更好的假设或解决办法。

例如,睾丸组织的石蜡切片上,生精小管周围总会出现较大的空隙(人工假象),而树脂切片上没有那样明显的空隙^[24]。这提示,石蜡包埋处理所致生精小管的体积变化不均匀(与其周围的间质结构相比),树脂包埋处理所致变化较均匀,因为活体(处理前)睾丸内应该充满生精小管及其间质,生精小管周围不会出现“真空”的间隙。因此,最好以树脂切片估计的生精小管的体积分数作为标准结果。

其实,不论是否校正定量研究结果,组织处理本身就是组织病理学技术问题,研究或控制组织处理对结构特征的影响始终都应该是组织病理学(包括切片和显微观测)要研究的一个基本方面。

5.2 组织体积变化的一项实际研究

笔者实验室最近对大鼠睾丸组织石蜡切片和树脂切片的组织体积变化,做了较系统、全面的研究^[2],这里简短做个方法和结果的归纳介绍,以让读者对组织变化的大小或幅度有个大致了解。

方法:用不同大小的大鼠(青春期末至成年)睾丸标本,包埋介质是 Leica 公司的石蜡(Paraplast)和甲基丙烯酸(methacrylate)树脂(Historesin),切的是圆形切片(横切睾丸组织块切片)和非圆形切片(半个和四分之一横切组织块的切片),14 μm (石蜡切片)和 25 μm (树脂切片)的切片厚度(Leica 切片机设定的厚度),过碘酸-席夫试剂和苏木精染色。

切片实际厚度,石蜡切片 14.5 ~ 14.6 μm ,树脂切片 20.7 ~ 21.8 μm ;切片面积变化比 RAC(公式 4),石蜡切片 0.935 ~ 1.005,树脂切片 1.034 ~ 1.112;实际体积变化比 RVC(act)(公式 7),石蜡切片 0.766 ~ 0.793,树脂切片 1.005 ~ 1.034;虚拟体积变化比 RVC(vir)(公式 8),石蜡切片 0.716 ~ 0.760,树脂切片 1.221 ~ 1.294。

5.3 校正需要什么、是否必要

校正需要 2 个系数:实际体积变化比和虚拟体积变化比(公式 7-8)。估计前者需要测量切片(染色后)的实际厚度,并利用连续切片估计处理后实际体积(公式 3);估计后者需要估计切片的虚拟厚度(因此需要测量从包埋块切片后切片面积的变化,公式 4-5),并利用连续切片估计处理后虚拟体积(公式 6)。所以,如校正只需要实际体积变化比,那么校正实验就只需要连续切片;如校正需要虚拟体积变化比,那么校正实验就不仅需要连续切片,而且需要单独切片(实验)以估计切片面积变化比(公式 4)。估计切片面积变化比需要扫描切片及其在包埋块上的切面图像,然后分别估计其面积^[2-3,20];连续切片过程中把包埋块取下来扫描,然后再固定在切片机上继续连续切片的操作不现实,因此需要单独进行切片面积变化研究。

试想一下,一项应用研究中研究者获取了不少器官,从每个器官随机切取了切片进行体视学研究。由此引出问题:这项研究中是否可以同时设计校正实验?校正实验是否必需单独进行?总量估计中有 4 种情况需要考虑。(1)研究拟用连续切片和体视框结合分合法估计粒子总数^[1,10,18,26]。这种情况不需要单独的校正实验(文内 6.1 部分)。(2)研究拟用单张厚切片或多张连续切片(未必是组织块的所有连续切片),根据光学体视框(用单张厚切片)或物理体视框(用多张连续切片)先估计粒子数密度,然后结合器官组织体积估计粒子总数(公式 14)^[1,13,27]。这种情况多需要单独的校正实验以估计实际体积变化比。(3)研究拟基于切片平面上的测量(测点计数)估计任何结构的总体积(公式 9)^[1,15]。这种方法由于假设了组织处理前后体积分数不变,不需要单独的校正实验,只需要估计处理前体积。(4)研究拟基于切片平面上的测量(交点计数、轮廓计数等)估计任何结构的总表面积、线形结构的总长或粒子的总数(公式 10-13)^[1,13,15,28]。该情况多需要单独的校正实验以估计虚拟体积变化比。

密度(表面积密度、长度密度、数密度等)估计结果(公式 1 中的 T_v)实际上也可校正,但对此研究者通常不感兴趣,因为估计密度通常主要是为了估计总量,避免参照陷阱(引言部分)^[1,21]。

局部尺寸估计结果可以进行校正。见公式 15-公式 18。不过,实际研究中很少有对局部尺寸估计的校正,因为所测结构的局部尺寸(例如薄膜平均厚度、细胞核平均体积)与包含所测结构的器官组织的体积无关,不存在密度估计中涉及的参照陷阱问题。不过,当局部尺寸用于进一步估计其它指标时,例如用小管直径进一步估计小管的总长时^[1,11-12,15],用肾小体或细胞核的平均体积进一步

估计肾小体或细胞核的总数时^[1,13,15],要注意校正局部尺寸(文内 4.3 和 4.4 部分)。

有一种特别的相对定量指标,例如某种神经器官组织内胶质细胞核的数量与其周围的神经元细胞核的数量之比、睾丸内生精细胞核数量与 Sertoli 细胞核数量之比。这样的比值结果不需要校正组织处理致组织体积变化的影响,因为包含所测细胞核的器官组织相同^[1]。这样的指标虽不表示粒子数究竟是多少,但可有效的反映所测胶质细胞或生精细胞的数量——相对于神经元或支持细胞的数量而言——是否改变、增加或减少了多少(百分比)。这种数量变化,如果假设在所研究的病理生理状态下那些神经元或 Sertoli 细胞核的数量不变(事实上正常成年生物器官的神经元或 Sertoli 细胞的数量一般都认为比较恒定),反映的就是所测胶质细胞或生精细胞总数的变化。

对于任一项体视学应用研究,所测结构的总体积都是一个值得研究的基本指标,因为总体积是结构总量的一个最基本特征,而且其估计最简便(只需要计数测点),还不需要校正系数(公式 9)。因此,如一项应用研究中测量了包括总体积在内的多个指标,而且用总体积这一个指标就可基本达到研究目的——反映所测结构的定量变化,那么对其它指标的校正即使需要也显得不那么重要了。

一个实验室或研究小组,若用相同的方法做了一系列的体视学应用研究,最好专门进行至少一项校正实验(如需要的话)。不同组织块的不同处理可能有不同的体积变化,但相似组织块的相同处理可能有近似的体积变化,因为组织处理所致组织体积变化主要是一种物理、机械性变化,操作上有一定的可控性。如果实验证实某种组织处理所致体积变化的变异不大,那么实验结果不仅可用于校正系列研究的结果,而且还有参考或借用价值。

不论是否需要校正,为了控制组内变异、增加组间可比性——减小因为校正系数可能的不同对研究的可能影响,任何一项定量研究都要注意保证制片质量,保证组织处理方法规范、统一。不仅要注意基本方法——包括固定、脱水、包埋、切片、染色甚至测量方法——相同,而且要尽量注意方法细节可比。这些细节有如:取材方法,从不同器官切取的组织块的大小与形状,切片厚度,裱片和烤片方法^[25],不同组不同个体的切片放在一起进行染色,盲法、轮流测量不同组不同个体的切片(如可能的话)^[1]。

5.4 切片厚度问题

多数体视学原理,理论上都是基于在器官组织(结构)的截面(二维平面)上的测试,但实际研究用的都是有一定厚度的切片组织,实际清晰观察的结构图像是一定厚度(景深范围内)的切片组织的投

影图像,这可能会对测量结果造成一定影响,这种影响主要是所测结构或者投影过多(overprojection,所测结构投影图像的周边扩大)或者投影过少(underprojection,投影图像的周边缩小)^[1]。不过,有试点研究用不同放大倍数的物镜观测睾丸组织厚切片——这意味着观测不同厚度(景深)的切片组织,结果对生精小管体积分数估计的影响不大^[1,24],这可能是因为人眼对于判断结构是否清晰聚焦有一定的调节作用。对于轮廓计数之类的测量,切片厚度对测量结果的影响更是有限,因为一个细胞核或生精小管轮廓,投影多点少点也还是一个轮廓。对于这类基于切片平面的测量的体视学研究,实践中用尽量较薄的切片即可,很少有研究校正切片厚度对结果的影响。

有些体视学研究就是要利用切片厚度来进行估计,例如用光学体视框在一定厚度的切片组织里计数粒子^[1,14],利用切片厚度估计粒子的体积(参考公式 3)。

5.5 如何单独进行校正实验

校正实验主要是为了获得校正系数——实际体积变化比和虚拟体积变化比。本文前面讲了什么体视学估计需要什么校正系数,什么情况需要单独的校正实验。

校正实验主要有两种:连续切片实验和切片面积变化实验^[2]。连续切片实验就是要获取组织块的连续切片,以估计器官组织处理后的实际体积和(或)虚拟体积。估计实际体积需要测量连续切片的总面积以及这些连续切片的实际厚度(公式 3)。估计虚拟体积不仅需要测量连续切片的总面积,还需要估计切片的虚拟厚度(公式 6)。估计切片的虚拟厚度多需要单独的切片面积变化实验,对比切片面积和切片在其组织块上的切面积,再结合切片步进(切片机设定的切片厚度)进行估计(公式 4-5)。根据器官组织处理后的实际/虚拟体积和单独估计的其处理前体积,即可估计实际体积变化比和虚拟体积变化比(公式 7-8)。

进行校正实验必需注意的是,其所用切片与拟进行校正的实际实验(体视学应用研究)所用切片要有可比性,即要注意保证两个实验所用切片的质量及其面积变化一样或可比。为此,(1)校正实验所用器官的大小以及从器官切取的组织块的大小与形状,要与实际实验中所用的器官和组织块相似。(2)校正实验的组织处理(包埋和制片等)方法(包括切片厚度),要与实际实验所用方法一样。(3)校正实验所用组织块的所有连续切片,要有相似的切片质量。这一点很特别,因为实际实验可能只是在组织块浅表区域切取单一的切片,而校正实验针对的是整个组织块的所有连续切片。假如因为组织块

太大、包埋剂渗透组织不够或不均,从组织块中心区域切取的组织切片的体积或面积变化程度不同,那么校正实验所得校正系数,就不能可靠的反映实际实验所用切片的情况。这个潜在问题也许是多虑了,因为笔者实验室最近有研究^[14]表明,从睾丸组织块(石蜡或甲基丙烯酸树脂包埋)的较浅和较深区域分别切取的切片,其切片组织内球形精子细胞核(球形精子细胞密集分布区域内)的数密度没有显著差异,这提示从组织块不同部位切取的切片,其组织体积的变化(皱缩或膨胀)没有明显差异。

关于校正实验的样本含量^[1],下面的经验可作为参考。(1)连续切片实验所用器官的数量不宜 < 5,从每个器官切取的组织块(如比器官小)的数量不宜 < 2,从每个组织块的所有连续切片中等距随机抽选的连续切片的总数不宜 < 10。如果实际实验中用了多组大小差别很大的器官,那么校正实验(连续切片实验)也最好针对不同大小的器官进行:用多组不同大小的器官。(2)面积变化实验所用组织块的数量不宜小于 5。如果实际实验中用了多组大小/形状差别很大的组织块,那么校正实验(面积变化实验)也最好针对不同大小/形状的组织块进行:用多组不同大小/形状的组织块。

5.6 如何具体进行校正

校正的基本方法:对于密度结果,先乘以组织处理前体积,然后根据需要再乘以一个基于实际或虚拟体积变化比的校正系数(公式 9-14);对于平均大小结果,直接除以一个基于实际或虚拟体积变化比的校正系数(公式 15-18)。注意,这里的结果(实际应用研究结果)通常是一个组或一定实验条件的平均结果,校正系数也通常是一个平均变化比。即针对某种实验条件(某种器官组织块的某种处理)的体视学应用研究,用相似的实验条件单独进行校正实验(见上面),获得一个平均的实际或虚拟体积变化比:多个(样本含量)体积变化比的平均。就是说,我们通常不会对组内各个器官的结果(应用研究)进行不同的校正,不会单独针对每个器官进行一项单独的校正实验,因为我们实际上不可能同时进行一项用完全一样的标本、完全一样的方法的校正实验,除非应用研究本身就是一项校正实验。这种“除非”的例外情况,见于用分合法估计粒子数时。用分合法就相当于客观(基于等距抽样设计)消除了组织体积变化的影响,每个器官的一项应用研究同时也相当于一项一对一的校正实验(6.1 部分)。另一个例外情况是,总体积的估计也不需要单独的校正(公式 9),因为这种估计相当于主观消除了组织体积变化的影响,即假设了组织处理后结构的体积分数不变。

也许研究者可从同一器官(应用研究中所用)

切取另一套标本来进行校正实验,但最后可能还是最好基于平均的体积变化比值来校正各组的结果,因为我们可以相信各个器官的体积变化相同,但校正实验中从各个器官实际估计的体积变化可能有较大的变异。用相同校正系数的校正,不改变各组结果(应用研究)的变异系数或误差系数。因此,应用研究中注意控制组内变异、增加组间可比性非常重要(5.3 部分末)。如应用研究中各组所用器官组织块的大小或形状差别大,各组器官组织的体积变化可能有较大差异^[2,13,21],最好针对各组进行校正实验,以获得各组的组织体积变化比值(5.5 部分)。

举例进行尝试性的校正。(1)假定用甲基丙烯酸树脂切片根据数密度(用光学体视框估计)和睾丸处理前体积估计的睾丸内细胞核总数为 N (百万)^[27],同时假设(单独的校正实验表明)这种切片组织的实际体积变化比为 1.02(见文内 5.2 部分),那么 $1.02 \times N$ (百万)即为校正后的睾丸内细胞核总数结果(公式 14)。(2)假定用石蜡切片根据表面积密度(基于交点计数估计)和肺脏处理前体积估计的肺内肺泡总表面积为 $S(\text{m}^2)$ ^[28],同时假设这种切片组织的虚拟体积变化比为 0.74(文内 5.2 部分),那么 $0.90 \times S(\text{m}^2)$ 即为校正后的肺泡总表面积结果(公式 10)。(3)假定用甲基丙烯酸树脂切片根据长度密度(基于轮廓计数估计)和肾脏处理前体积估计的肾内肾小管总长为 $L(\text{m})$ ^[15],同时假设这种切片组织的虚拟体积变化比为 1.26(5.2 部分),那么 $1.17 \times L(\text{m})$ 即为校正后的肾内肾小管总长结果(见公式 11)。(4)假定用甲基丙烯酸树脂切片根据肾小体的点取截距测量、椭圆形肾小管轮廓的短径测量估计的肾内肾小体的体积加权平均体积、肾小管的平均直径分别为 $v(\mu\text{m}^3)$ 、 $d(\mu\text{m})$ ^[15],同时假设这种切片组织的虚拟体积变化比为 1.26(见文内 5.2 部分),那么 $0.79 \times v(\mu\text{m}^3)$ 、 $0.93 \times d(\mu\text{m})$ 即分别为校正后的肾小体平均体积、肾小管平均直径结果(公式 16 及公式 18)。

6 后记

6.1 关于本文

从根本上讲,体视学方法就是一些基于随机几何学的统计(抽样估计)公式^[1,4,10,16,29]。球体积公式显示,在通过球心的切面上或者说在球体的最大切面上,测量圆切面的直径即得球体的直径,据此即可计算球的体积;体视学公式显示,在包含所测结构的器官组织的什么截面(切片)上,数一下什么点测一下什么长度之类,就可估计所测结构的某些几何特征(体积表面积等)。

不过,把体视学方法实际用于定量研究非常不易。这不是说组织病理学研究容易而体视学研究不

容易,而是在组织病理学研究基础上的更进一步的、更科学可靠的定量研究不容易。例如,假设要定量研究一组动物器官的某种结构:研究者要从每个动物器官随机切取至少 2 个组织块,组织块包埋后要从每个组织块切取至少 1 张切片,切片染色后要从每张切片随机抽选几个甚至几十个视野来测量^[1]。对组织病理学研究人员来讲,切片一制好,研究就已基本完成——再定性观察一下切片即可;但对定量研究而言,定性观察(学会辨认结构、了解结构变化)之后,测量还没有开始,接着要预试、设计测量方案,然后才一张一张的测量切片^[1]。因此,体视学测试完成之后,没有多少研究者会乐意进一步做实验以校正所测结果(如需要),即把从切片组织(经过了一系列处理之后的器官组织)测得的结果校正为处理前器官组织的真实结果。仔细一想,校正实验其实也没有那么容易开展。例如,组织处理后实际体积的估计所涉及的切片实际厚度(公式 3),如果没有指针测微计,根本就没法进行很好的估计;上个世纪 90 年代才开始逐渐流行的体视学图像系统通常才安装有指针测微计^[1,10,14,30-31],因此没有这种系统的实验室根本就难以进行针对实际体积变化的校正实验。

幸好,结构的总体积——最基本、最容易获得的定量指标——估计,不需要校正(公式 9)。不过,人们通常对粒子(细胞核等)数量这个指标特别感兴趣,但这个指标的获得在体视学中是最耗时、最不容易的,且其无偏估计需要用体视框来计数粒子^[1,10]。根据笔者实验室的经验,每张切片的测点计数(用以估计体积)可能只需花几分钟就完成,而每张切片的粒子计数(在厚切片内用光学体视框计数粒子以估计粒子数)可能要花 1~2 h,如用物理体视框在多张连续切片之中计数粒子可能要花更多倍的时间与精力^[1,13]。此外,粒子数这个指标也最受组织体积变化的影响:包含粒子的器官组织的体积与粒子在器官组织里的数密度成反比(见前面引言部分里的举例)。为了避免这个影响,分合法——借用等距抽样的间距来估计总量的统计思想——应运而生^[1,10,18,26]:从器官等距随机切取组织块,组织块完全连续切片后等距随机抽选切片,切片上等距随机抽选视野,视野内还可进一步抽选部分厚度的切片组织来测量(如用光学体视框),最后根据总的抽样间距和计数的粒子数直接计算粒子总数。例如,假设从整个器官组织最后等距抽选了万分之一的切片组织来计数粒子,且共计数了一百个粒子,那么整个器官组织内的粒子总数的无偏估计就是一百万。这种基于分合法的总量估计(计算)不涉及器官组织的体积,因此不需要考虑组织体积的变化,不受组织皱缩或膨胀的影响。因此,粒子总数的估计比较流

行运用体视框结合分合法的方法,尤其是光学体视框与分合法结合的方法(常用于其直径或高度小于切片厚度的细胞核等粒子),它常被称为光学分合法(optical fractionator)^[18,26,32]。换个角度看,体视框结合分合法的方法实质上是考虑了组织体积变化的校正研究方法。例如,用光学体视框的粒子计数,实际上是在一定体积的切片组织内计数粒子,因此实质上估计的是数密度;基于等距抽样的分合法,实质上最终是估计了处理后实际体积(3.1 部分及公式 14)。这种理论或设计上完美的光学分合法,实践起来非常麻烦,因为各级抽样——组织块、切片、视野等的抽样——都要严格遵循等距随机原则,尤其是组织块还要完全连续切片,技术要求高,且不是每张切片都能保证质量。根据笔者实验室的体会,甲基丙烯酸树脂或石蜡包埋的睾丸组织块的完全连续切片,即使全部都能切好、染好,切片组织不完整、有残缺的连续切片数量也起码要占四分之一^[2]。此外,每级抽样都对结果有直接影响,每个步骤的错误或问题都可能直接产生误差或偏差。还有,其最后一步的抽样(在厚切片 Z 轴方向上的抽样)实际上我们没法完美的实施:由于切片不同位置(水平面)的切片厚度(Z 轴)有变异,且靠近切片上表面和下表面的粒子可能不完整、难辨认、有破坏或染色问题,实际上难以或不能在整个厚度的切片组织里等距随机抽选部分厚度的切片组织来计数粒子^[14]。

基于上面所述,应用研究中笔者倾向于这样估计器官内的细小粒子(细胞核、突触素阳性颗粒等)总数:切取单一的厚切片,在油镜下计数一定厚度切片组织内所测粒子的数量(用光学体视框),由此估计粒子数密度,然后将之乘以器官体积以估计粒子总数^[1,27,30,33]。与光学分合法相比,这种估计方法不涉及组织块的连续切片,不必计较各级随机抽样的间距(抽样间距与结果计算无关),明显感觉更简便,也更稳健(robust):结果较稳定,受切片质量的影响较小,即使切取一二张完好切片(如果切片面积足够大、包含的所测粒子足够多或者说切片、视野间的差异足够小的话)也可能获得变异不大的结果。基于这种方法,笔者(和合作者)采用甲基丙烯酸树脂包埋的切片进行了一系列的应用研究:不同实验条件下睾丸内多种细胞核总数的估计^[27,30,34-35]。不过,总数估计中的器官体积本应是处理后器官体积(见公式 14),但我们用了处理前器官体积来代替(相当于没有考虑组织处理后的体积变化),因为先前的试点研究^[30]表明,甲基丙烯酸树脂包埋的睾丸切片组织的体积变化似可忽略不计。

二三十年之后笔者回想,我们以前对甲基丙烯酸树脂包埋的睾丸切片组织处理后体积变化的研究^[30],感觉不够好,以前对石蜡^[19]或环氧树脂^[13]

睾丸切片的这方面研究也不够好。主要问题是:把从器官切取的组织块当作处理前“器官”,把组织块的质量比值当作抽样间距^[13,19],尤其是测量的组织块较少,没有测量切片的实际厚度。因此,我们决定对睾丸组织石蜡(最常用的包埋剂)和甲基丙烯酸树脂包埋切片的体积变化做一较系统、全面的实验研究。这既是为了给我们自己的系列研究一个交代,也算是给读者、同行一个交代,让大家都注意以前的研究结果(不仅限于细胞核总数)可能有多大的偏差,将来怎么做可能更好。

这项实验中,我们最初设计的只是用连续切片来研究组织处理后的(实际)体积变化。为了确定体积变化主要发生在哪一步的组织处理,我们后来又补充设计研究了从包埋块切片后的切片面积变化。两项实验完成之后,在几个月的论文准备过程中,笔者才逐渐的认识到:组织处理后的体积变化不仅有实际体积变化,还有我们以前没有想到的虚拟体积变化,我们最初设计和补充设计的两项实验正好能完整的呈现这两种体积变化;用不同体视学方法获得的结果(包括除体积分数或总体积以外的几乎所有结果),要基于不同的体积变化来校正。笔者的这个逐渐认识,实际上有一个反复质疑与思考的过程,最后好像一下“恍然大悟”一样。这个“恍然大悟”,虽然不是解答了一个高深的数学理论问题,但确实是对一个重要的体视学应用基础的重新认识。基于此,在实际与虚拟体积这个体视学新概念提出之后^[2],笔者立即撰写该“姊妹篇”论文,既分享笔者最近的认识,又更加系统、全面地论述组织处理致组织体积变化对体视学估计的影响及其校正的理论与实践,并希望借此引导读者、同行进一步重视、探讨和研究这个涉及范围广、影响因素多的体视学基础问题。

6.2 关于《川北医学院学报》

笔者最早自己撰写的论文,于 1989 年 12 月发表在《川北医学院学报》,而且就是关于组织处理对体视学估计影响的主题^[19]。之后,笔者接着在《川北医学院学报》合作发表了一系列的相关主题论文^[5-6,36-38]。35 年之后——在笔者对体视学的理论有了更深刻的认识、对体视学的应用有了更丰富的经验之后,笔者有幸又在《川北医学院学报》发表了这篇该主题的总结性论文。笔者衷心感谢《川北医学院学报》这个学术交流平台长期以来对笔者学术探求的支持。

参考文献

- [1] 杨正伟.生物组织形态定量研究基本工具:实体体视学方法[M].北京:科学出版社,2012.
- [2] Guo Y, Xiang Y, Wang D, et al. Tissue volume and section area

changes of paraffin and methacrylate embedded testicular sections; an unbiased design study [J]. *Image Analysis and Stereology*, 2024, 43(3): 221 – 237.

[3] 郭洋, 向宇, 杨林凤, 等. Photoshop 软件在辅助体视学测试中的潜在应用[J]. *川北医学院学报*, 2025, 40(8): 973 – 976.

[4] Gundersen HJ, Bendtsen TF, 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.

[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[J]. *川北医学院学报*, 2006, 21(1): 4 – 7.

[6] 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[J]. *川北医学院学报*, 2007, 22(1): 54 – 55.

[7] Tang Y, Nyengaard JR, Andersen JB, *et al.* The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart[J]. *Anatomical Record (Hoboken, N J)*, 2009, 292(10): 1630 – 1647.

[8] 郭镇洲, 杨靓, 彭彬, 等. 老年大鼠海马神经元细胞核体积和直径的体视学观察[J]. *解剖学报*, 2022, 53(3): 302 – 308.

[9] Li C, Yang S, Chen L, *et al.* Stereological methods for estimating the myelin sheaths of the myelinated fibers in white matter[J]. *Anatomical Record (Hoboken, N J)*, 2009, 292(10): 1648 – 1655.

[10] Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, *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.

[11] 王丹, 文晓红, 郭洋, 等. 根据肾小管轮廓计数和直径估计肾小管长度的两种体视学方法对比[J]. *解剖学报*, 2020, 51(6): 967 – 975.

[12] Xu W, Guo Y, Yang ZW. Comparison of profile counting and diameter measurement for estimating the length density of seminiferous tubules or epididymal duct[J]. *Image Analysis and Stereology*, 2024, 43(3): 239 – 247.

[13] Yang ZW, Wreford NG, de Kretser DM. A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 43(4): 629 – 635.

[14] Xu W, Guo Y, Xiang Y, *et al.* Is there section deformation resulting in differential change of nuclear numerical densities along the z axis of thick methacrylate or paraffin sections? [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2019, 82(9): 1575 – 1583.

[15] Wang D, Guo Y, Li Y, *et al.* A stereological study of key histological structures in the kidneys of rats from young to old age[J]. *International Journal of Clinical Urology*, 2021, 5(2): 94 – 107.

[16] Weibel ER. *Stereological Methods (Vol. 1): Practical Methods for Biological Morphometry*[M]. London: Academic Press, 1979.

[17] Gerrits PO, Horobin RW, Stokroos I. The effects of glycol methacrylate as a dehydrating agent on the dimensional changes of liver tissue[J]. *Journal of Microscopy*, 1992, 165(Pt 2): 273 – 280.

[18] Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size[J]. *Journal of Microscopy*, 2001, 204(Pt 3): 232 – 246.

[19] 杨正伟, 崔成虎. 睾丸组织石蜡切片的组织皱缩和切片压缩[J]. *川北医学院学报*, 1989, 4(4): 4 – 7.

[20] Xiang Y, Guo Y, Yang ZW. A study of area and thickness compression of paraffin sections[J]. *Image Analysis & Stereology*, 2018, 37(3): 205 – 212.

[21] Brændgaard H, Gundersen HJ. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1986, 18(1 – 2): 39 – 78.

[22] Andersen BB, Gundersen HJ. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections[J]. *Journal of Microscopy*, 1999, 196(1): 69 – 73.

[23] Messina A, Sangster CL, Morrison WA, *et al.* Requirements for obtaining unbiased estimates of neuronal numbers in frozen sections[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 97(2): 133 – 137.

[24] 赵圆宇, 王亚平, 郭洋, 等. 放大倍数和包埋介质对睾丸组织体视学研究的影响[J]. *中国体视学与图像分析*, 2010, 15(2): 191 – 194.

[25] Guo Y, Xiang Y, Yang ZW. Drying paraffin sections on hotplate unadvisable[J]. *Journal of Histology and Histopathology*, 2016, 3: 4.

[26] Chen L, Lu W, Yang Z, *et al.* Age-related changes of the oligodendrocytes in rat subcortical white matter[J]. *Anatomical Record (Hoboken, N J)*, 2011, 294(3): 487 – 493.

[27] He H, Tu Z, Guo Y, *et al.* A stereological (quantitative) study of leydig cell hyperplasia in vasectomized rabbit and rat testes[J]. *International Journal of Clinical Urology*, 2021, 5(1): 4 – 9.

[28] Yang ZW, Qin YH, Su SR. Use of star volume to measure the size of the alveolar space in the asthmatic Guinea-pig lung[J]. *Respirology*, 2002, 7(2): 117 – 121.

[29] Weibel ER. *Stereological Methods (Vol. 2): Theoretical Foundations*[M]. London: Academic Press, 1980.

[30] Zhengwei Y, McLachlan RI, Bremner WJ, *et al.* Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*) [J]. *Journal of Andrology*, 1997, 18(6): 681 – 687.

[31] 杨正伟. 体视学研究的辅助工具: 现状与展望[J]. *中国体视学与图像分析*, 2013, 18(3): 249 – 254.

[32] 何琦, 唐勇, 杨正伟. 举一例介绍光学分合法用于无偏估计细胞核的总数[J]. *川北医学院学报*, 2025, 40(8): 968 – 972.

[33] 吴亮生, 王蕾, 马玉琼, 等. 大鼠松果体的神经支配——免疫组织化学及光镜体视学研究[J]. *解剖学报*, 2005, 36(3): 288 – 291.

[34] Zhang RD, Wen XH, Kong LS, *et al.* A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis[J]. *Reproduction*, 2002, 124(1): 95 – 105.

[35] Yang ZW, Kong LS, Guo Y, *et al.* Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2006, 8(3): 289 – 299.

[36] 李鸿, 杨正伟, 崔成虎, 等. 树脂切片和石蜡切片在一定量研究中的对比[J]. *川北医学院学报*, 1990, 5(4): 48 – 50.

[37] 李鸿, 杨正伟, 崔成虎, 等. 树脂切片和石蜡切片在精子细胞核的大小估计中的对比[J]. *川北医学院学报*, 1991, 6(2): 25 – 27.

[38] 杨正伟, 向宇, 郭洋, 等. 把放久了的包埋组织块放在湿盒里湿润可避免或减少组织切片碎裂[J]. *川北医学院学报*, 2014, 29(5): 492 – 493.