论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1148-03

计算机辅助的人脑间变性星形细胞瘤微血管构筑三维重建

王清良[1]，卞修武[1]，蒋雪峰[1]，张绍祥[2] （第三军医大学：[1]西南医院病理学研究所，[2]基础医学部解剖学教研室，重庆市计算医学研究所，重庆 400038）

提 要：目的 观测恶性胶质瘤微血管三维构筑的形态学特征。**方法** 采用人脑间变性星形细胞瘤组织连续切片，进行免疫组织化学标记微血管内皮细胞，利用计算机辅助的图片处理和三维重建技术进行微血管构筑的三维重建。**结果** 成功构建了星形胶质细胞瘤部分微血管的三维结构。胶质瘤微血管与正常脑微血管迥然不同，其分布、分枝和走行怪异，在三维构筑上有其自身的特点，不完全遵从由大到小的分级规律，而且某段可向外呈盲管状膨出，部分血管为两端均不通的盲管。**结论** 恶性星形细胞肿瘤的微血管不仅丰富，而且具有形态结构的多样性和异质性。这一特点对于认识恶性肿瘤血管生成三维结构特性、构建数字化肿瘤微血管模型及其在抗血管生成治疗上可能有重要意义。

关键词：胶质瘤；血管生成；微血管构筑；三维重建

中图法分类号：R319；R730.23；R730.264 **文献标识码**：A

Computer-assisted three-dimensional reconstruction of microvessel architecture of human anaplastic astrocytoma

WANG Qing-liang[1], BIAN Xiu-wu[1], JIANG Xue-feng[1], ZHANG Shao-xiang[2] ([1]Department of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe three-dimensional (3-D) morphological features of microvessel architecture of human anaplastic astrocytoma. **Methods** Serial sections of human anaplastic astrocytoma were used to label microvascular endothelial cells with immunohistochemistry using anti-human FⅧ-RAg antibody. The serial images were taken and processed with computer-assisted 3-D reconstruction. **Results** Partial 3-D structures of the microvessels in anaplastic astrocytoma were successfully reconstructed. The morphology of the vessels was strange in their distribution and branching, which were completely different from normal microvessels of the brain. Some of the tumor vessels showed chaotic structure and some showed tubiform caecum. **Conclusion** Microvessels in anaplastic astrocytoma appeared multiformity and heterogeneity as well as abundance. 3-D reconstruction of such features might be of significance in identifying their architecture, constructing digital tumor microvessel models and targeting the vessels in anti-angiogenesis therapy.

Key words: glioma; angiogenesis; microvascular architecture; 3-D reconstruction

不同肿瘤的间质血管具有一定特点，在同类型肿瘤不同分化演进阶段、原发瘤与转移瘤之间以及抗癌药治疗前后，肿瘤血管常呈现相对特征的表现，提示肿瘤新生微血管在肿瘤学上有重要意义[1,2]。肿瘤微血管构筑表型（tumor microvascular architecture phenotype, T-MAP）存在着明显的异质性[3]，研究T-MAP异质性的发生机制必须要显示并研究肿瘤微血管三维形态特征。以往的肿瘤血管生成研究通常是在二维平面上对病理组织切片进行分析。这种方法会造成三维信息的丢失。在人类肿瘤中，恶性胶质瘤是血管最丰富、最适合作为血管生成研究的肿瘤之一[4]。本研究以人脑恶性胶质瘤为材料，以内皮细胞标记后的三维重建（three-dimensional reconstruction）为主要方法，建立和初步观察计算机辅助的肿瘤微血管构筑三维结构。

1 材料与方法

1.1 标本来源和切片

3例标本来源于第三军医大学大坪医院野战外科研究所

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30370552）
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370552)

作者简介：王清良（1974－），男，四川省富顺县人，硕士，医师，主要从事肿瘤病理及组织芯片方面的研究。电话：(023)68765459

通讯作者：卞修武，电话：(023)68752247，E-mail：bianxiuwu@263.net

收稿日期：2006-01-11；修回日期：2006-03-20

神经外科，病理诊断为间变性星形胶质细胞瘤（WHO Ⅲ级）。常规病理切片和 HE 染色，并经过胶质纤维酸性蛋白（GFAP）免疫组织化学染色反映其分化程度。显微镜下观察病理切片，确定需重建的区域。对照组织蜡块，在蜡块上用细针垂直扎 3 个孔，作为后期切片对位的基准点。连续切片的间距为 5 μm，切片展开的水温及捞片时间基本相同，以排除操作误差。

1.2　免疫组织化学染色

具体步骤为：①切片常规脱蜡至水。②3% H_2O_2 室温孵育 10 min。③ 蒸馏水冲洗，2 min，3 次。④ 复合消化液（中山公司）消化 10 min。⑤PBS（0.1 mol/L）冲洗，5 min，3 次。⑥10% 正常山羊血清封闭，室温孵育 10 min，倾去血清，分别滴加中山公司兔抗 FⅧ-RAg 及 GFAP 工作液，4 ℃过夜。⑦PBS 冲洗，5 min，3 次。⑧滴加中山公司山羊抗兔二抗工作液，37 ℃孵育 30 min。⑨PBS 冲洗，5 min，3 次。⑩加 SABC，20 min。⑪ PBS 冲洗，5 min，4 次。⑫DAB 显色（中山公司）。⑬自来水冲洗，苏木精复染，封固。

1.3　图像采集及拼接

利用显微图像实时采集系统 Motic Images Advanced 3.0 进行图像采集。每张切片均进行连续采图，相邻图片之间图像有 1/6 重叠，然后通过图像重叠部分的完全重叠，把图像拼接起来组成 1 张更大的至少包含有 2 个基准孔的图片。具体图像拼接方法：①打开 Photoshop 6.0，新建 1 个空白图像，大小为 5 000 像素 × 4 000 像素，分辨率设为 300 PPi。②按照采图的顺序依次打开同一切片的多张图片，通过复制、粘贴等功能把它们拼接在空白图像上。在拼接时打开标尺，根据标尺和总体最佳匹配原则，按图像采集顺序依次拼接好，组成合成图像。

1.4　合成图像对位及裁切

利用 Photoshop 6.0 软件，把所有合成图像的基准孔重叠在一起，然后进行统一裁切。在这个过程中，将涉及到合成图像的平移及旋转。具体操作步骤如下：①选第 1 张合成图像作为标准。②另建 1 个空白图像，把第 1 张合成图像的 2 个基准孔的位置记录下来。③其他每张合成图像的 2 个基准孔都以此为参照，或平移，或旋转，反复多次，直到与两个基准孔都完全重合。④所有合成图像对位完成后，选取需重建的区域进行统一裁切。

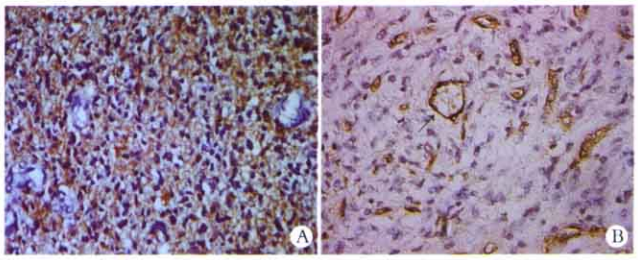
1.5　肿瘤微血管的三维重建

把对位后经统一裁切的图片输入计算机中。打开三维重建软件，对需要重建的每张图像上的微血管依次进行勾勒，最后经过计算机的处理，就得到了肿瘤微血管的三维立体图像。

2　结果

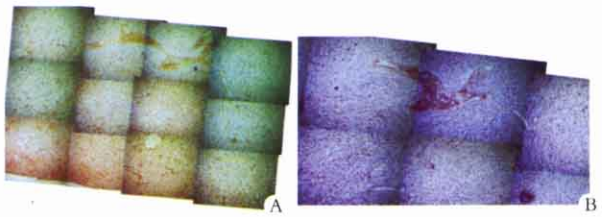
所选用病例光镜下组织学形态为：瘤细胞密度中等，大小不等，界限不清，核呈卵圆形或不规则状，可见核分裂像；微血管丰富，管壁较薄，管腔不规则。免疫组织化学染色：大多数瘤细胞质 GFAP 明显阳性，所有微血管内皮细胞质及细胞膜 FⅧ-RAg强阳性（图 1）。

图像拼接情况见图 2。合成图中可见通过拼接后的二维图片微血管结构完整，能反映血管全貌。统一裁切图片经过重建后的微血管三维结构见图 3。胶质瘤微血管三维图像比较圆滑，并且可以进行任意旋转、翻转。观察三维图像可见，恶性胶质瘤的微血管与一般血管不同，其走形并不完全遵从由大到小这个一般规律，一条大的微血管后可连着一段很小的微血管，再由小逐渐变大，而且在某段上，可见呈盲管状的局部膨出，部分微血管甚至为两端封闭的盲管。



A：GFAP 表达于瘤细胞质内；B：FⅧ-RAg 表达于血管内皮细胞内（箭头示）

图 1　间变性星形细胞瘤免疫组化染色　（SABC × 400 ）



A：第 22 张合成图像；B：第 14 张裁剪图像

图 2　图像样接及裁切

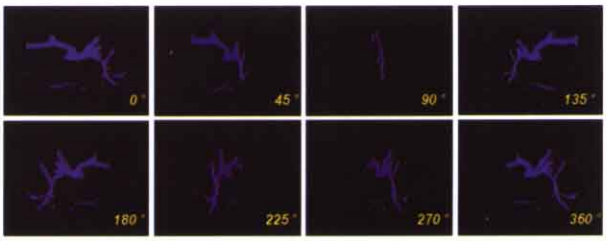


图 3　三维重建后以顺时针方向旋转图像观察微血管情况

3　讨论

肿瘤血管新生化的主要方式包括血管生成（angiogenesis）、血管发生（vasculogenesis）和套叠式生长（intussusception growth）等。肿瘤微血管不仅与成年正常组织（如卵巢黄体形成）和创伤愈合中的血管生成有明显不同，而且与慢性炎症血管生成也存在差别，这种差异性包括新生血管结构的成熟度、血供特性、形态、内皮细胞增殖程度和基底膜特点、内皮细胞的分子遗传学改变、构筑异质性、启动细胞和因子、血管形成参与情况、淋巴管生成情况、血管生成相关性病变及结局等[3]。我们根据肿瘤血管特点，把肿瘤间质中新生

微血管的密度、形态、结构(组成)及其随肿瘤演进在瘤组织内的三维分布统称为"肿瘤微血管构筑表型"(T-MAP)。随着肿瘤演进,瘤细胞异质性增加,T-MAP也会随之呈现多样性和差异性。我们把T-MAP的多样性和差异性统称为T-MAP异质性(T-MAP heterogeneity, T-MAPH)[5]。T-MAPH至少表现在微血管形态学、结构和组成、血管生成活性和功能特性、免疫学表型、血管属性和遗传学特性等方面。研究T-MAPH的分子遗传学基础不仅有助于进一步认识肿瘤血管生成机制,而且对判断其侵袭性等生物学行为、辅助分析预后和选择临床治疗方案尤其是确定以血管为靶标的治疗方法及其评价都具有十分重要的意义。

连续组织切片的三维重建是一种看似简单而实际操作比较复杂的实验方法,其结果受多方面的影响。主要有三维重建理论算法与计算机硬件设备影响,组织切片制备的影响、连续切片序列图像的配准对位的影响。研究表明,固定可引起组织收缩,甲醛使组织收缩30%,组织切片漂浮在水面也会引起变形,染色的次数和种类也影响结构形态。因此,我们在制片过程中应注意保证水温恒定,漂浮时间相同,以尽量减少变形的影响[6]。"配准"则是三维重建中的一大难题。一般来讲,在获得连续切片图像的过程中,切片之间必会出现平移和旋转。因此在三维重建中,首先要对连续切片图像进行配准。定位主要包括"硬"定位方法和"软"定位方法。"硬"定位方法是指在序列切片图像上找到一些基准点,通过基准点的对齐来达到定位效果[7]。主要有以下几种方法:①利用细针、激光或微电极穿孔。大多数定位是穿2~3个孔。利用这些基准孔,以实现切片对位。②根据对生物组织解剖学的先验知识而判别,此法简单易行,但需要有丰富的解剖学知识,且易使边界模糊。③把标本块所要切的面用修块机修平或用刀片切平,侧面修成平面。由于切面平行,因此在进行图像输入时就可以对图像进行定位[8]。"软"定位方法,是指通过一定的配准算法,利用计算机软件得到2幅连续切片图像间的配准参数[7]。目前,无论是硬定位还是软定位都有待完善,使其更易操作,定位更精确。在本研究中,运用连续采图再依次拼接起来的方法,克服了对位孔不能同时在高倍镜下观察所引起的对位不准,取得了很好的效果。

本实验观察到胶质瘤微血管可表现为盲管状的局部膨出,部分微血管为两端封闭的盲管。这说明肿瘤的微血管形成的复杂性。首先,在这个过程中血管生成起到重要的作用。血管生成是指从已有的微血管芽生出新的微血管,它的发生需要众多的细胞因子的参与,特别是血管内皮生长因子(VEGF)的参与。由于肿瘤细胞能分泌包括VEGF在内的众多细胞因子,因此,在大多数肿瘤组织中,微血管都比较丰富。本实验观察到的部分节段形成的盲管状膨出,可能为刚芽生出来的微血管。其次,内皮祖细胞可能也参与了肿瘤微血管的组成。来自骨髓或组织的内皮祖细胞在生长因子等多种因素的作用下,增殖、趋化、分化,形成微血管[9,10]。在其还未与原来已有的微血管相通时,就表现为两端不通的盲管。本实验从三维形态学的角度证明了间变性星形胶质细胞瘤微血管的丰富性及其组成的复杂性,为今后进一步研究针对肿瘤微血管的抗肿瘤药物提供了重要的理论基础。同时,星形细胞肿瘤微血管三维图像的构建与微血管组织芯片的构建相结合[11],为进一步构建数字化肿瘤微血管,以及研究星形细胞肿瘤微血管与血管生成因子间的数学模型关系奠定了基础。

参考文献:

[1] RYSCHICH E, SCHMIDT J, HAMMERLING G J, *et al*. Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis[J]. Int J Cancer, 2002, 97(6): 719-725.

[2] LORINCZ T, TOTH J, SZENDROI M, *et al*. Microvascular density of breast cancer in bone metastasis: influence of therapy[J]. Anticancer Res, 2005, 25(4): 3075-3081.

[3] BIAN X W, CHEN J H, JIANG X F, *et al*. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537-1547.

[4] BIAN X W, DU L L, SHI J Q, *et al*. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22(3): 267-274.

[5] 卞修武. 肿瘤血管生成研究进展与思考:微血管构筑表型异质性[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(3): 129-131.

[6] 张福奎, 宋继昌. 病理组织三维重建在肝脏病学中的应用[J]. 国外医学:生物医学工程分册, 2000, 23(3): 171-176.

[7] 陈 菁, 李兵仓, 黄 宏, 等. 大鼠坐骨神经损伤后显微及超微结构的三维重建[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(4): 345-346.

[8] 刘哲星, 董 武, 李树祥, 等. 连续组织切片图像的配准[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 825-827.

[9] ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, *et al*. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85(3): 221-228.

[10] TAMAKI T, AKATSUKA A, ANDO K, *et al*. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle [J]. J Cell Biol, 2002, 157(4): 571-577.

[11] 王清良, 卞修武, 章 容, 等. 人脑星形细胞肿瘤微血管组织芯片的构建[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 886-888.

(编辑 薛国文)