DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.s1.042

讲 座

细胞超微结构立体计量法

杨 恬（组胚教研室）

通常的超微结构形态观察主要提供定性的资料，这常会伴随不同程度的主观偏差，难以满足理论和应用研究中越来越精细和准确的要求。因此，随着生物医学科学的发展，细胞超微结构原位的、三维空间的定量问题日益突出。近年来，电镜工作者在获取定量资料方面已采用了若干新方法，其中，较为简便实用的立体计量法已成为细胞超微结构定量的重要手段。

基本原理

立体学（Stereology）是应用数学的一门分支，其理论基础是积分几何学和概率论，基本公式称为 Delesse 原理。第一届国际立体学会（1961）对立体学所下定义是二维图象的三维解释或二维空间的三维推断，即它是从结构的二维切面上测得的数据推断三维空间结构参数的科学。六十年代后立体学逐渐移植于生物医学并取得了迅速的发展，应用于细胞和组织结构的立体学定量研究方法称立体计量（Stereological quantitation）或形态计量（morphometry），经过二十多年的应用实践和大量模拟试验，细胞超微结构立体计量方法的可靠性已经得到公认[1][2]。

Delesse等证明：存在于物体T中某一结构i所占的体积比，等于经过物体T的任意切面上二者的面积比；也等于切面上穿过二者的测试线的长度比；进而等于分别落入切面上这两者图形内测试点的数目比。即

$$\frac{Vi}{V_T}=\frac{Ai}{A_T}=\frac{Li}{L_T}=\frac{Pi}{P_T}$$

（V、A、L、P分别表示体积、面积、测试线长度和测试点数目）。从这一基本公式先后推导演释出大量概念和公式，目前可在超微结构二维图片（电镜照片）上获得十几种参数的数值：表面积、体积、长度、厚度、数目、大小、直径、曲度、分布状况、定向程度等。从Delesse公式可知，首先得到的参数是无量纲的相对数，但如预先使用简单的物理学方法测量出所研究器官的重量与体积，可以很容易地把这些相对数换算成绝对数值。

立体计量所用工具叫测试板，由透明有机玻璃或塑料片刻上有规律的点、线制成（图1）。立体计量的主要程序是：①抽样：从所观察生物样品中随机抽取部分样本；②拍照：在电镜下随机拍摄样本的超微图象；③测量：将测试板随机地放置于超微图象上，测量所需数据；④计算：对所得数据进行统计学处理并应用立体学公式计算结果[3]。

常用公式及概念[4~11]

1. 体积密度（V_V） 指单位体积组织中某结构成份所占的体积。量纲可任意定为 $\mu m^3/\mu m^3$。一般可使用方格测试板按前述公式进行测算（图2）。

2. 表面密度（S_V） 指单位体积组织内膜性结构的表面积。量纲可定为 $\mu m^2/\mu m^3$。细胞内膜性结构的表面积与其功能密切相关。测量方法是，计数测试线与某膜性结构（如SER）形成的交点的数目（图3），若测试线总长度为L，交点数为N，照片总放大倍数为M，给定公式为：

$$S_V=2NM/L$$

此公式适合于任意构形的结构表面，若需计算紧贴的双面膜面积（如线粒体内、外膜），系数换为4即可。另一个有价值的参数是表面积/体积比（S_i/V_i），S_i/V_i不仅与结构的几何形状有关（球形、椭球形、不规则形），而且还可表明这一结构在不同状态下与外界环境的接触面积。Si/Vi比值可用多功能测试板方便地测出，公式为 $Si/Vi=4Ni/Z\cdot Pi$（Pi 落在结构 i 断面内的端点数，Ni 短线与 i 断面的交点数，Z 短线长度）。

3. 数目密度（N_V） 单位体积组织中某结构的个数。量纲可为个/μm^3。单位面积二维切面上结构i的数目（N_{Ai}）与单位体积内数目（Nvi）的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关系可由下式表示： $Nvi = NAi/\bar{D}i$，其中$\bar{D}i$是i的平均直径。在二维照片上直接测定$\bar{D}i$有一定困难，现常采用两种近似技术决定$\bar{D}$值：把剖面直径分类制成大小-频率分布直方图，然后按Underwood（1970）方法逐次推论或直接在Hennig（1971）编绘的实例曲线图上查到相应的$\bar{D}$值。这两种方法的理论推导和应用细节详见文献[8][9]。

另一种常用的计算数目密度的公式由Weibel提出，

$$N_{Vi} = Ki \cdot N_{Ai}^{\frac{3}{2}} / \beta_i \cdot V_{Vi}^{\frac{1}{2}}$$

V_{Vi}和N_{Ai}测法已如前所述，β是形状系数，K是大小分布系数，这两个值可通过预实验求出，也可从Weibel编制的曲线表上读得。此公式应用前提是对所测颗粒大小及形状有所了解。因简便实用，应用较广。

4．不同细胞器的非随机相对定位　这是指细胞器或细胞内结构在细胞中的空间位置问题。以往对这类问题多采用定性观察来解决，要把空间位置关系用数学概念表示出来比较困难。一种立体学方法是最邻近分析，即比较实验发现的分布特性与期望特性。若被测试物在二维空间中随机分布，设每点到其最邻近点的平均距离为$\bar{X}$，则：

$$\bar{X} = 1/2\sqrt{NA} \pm SE\sqrt{4-\pi/4\pi nNA}$$

这里n是集合体中的总点数。对于任意二维点集合体来说，如果最邻近点间的实测平均距离与计算值明显不同，集合体的分布显然为非随机的。已用此技术成功地证明了骨骼肌内纵列线粒体在肌纤维横切面上的非随机分布。由于三维空间问题的复杂性，虽已有专用公式，但最邻近分析尚难直接推广到三维判别上；而且，这是一种点总体分析，对难以近似为点的大体积结构的分布特性也并不完全适用。

另一可用以估计空间分布特征的参数是平均自由距离（λ），无论被测试物大小、形状、分布状况如何，均可应用[4]。

近年，Hermon（1981）在检测细胞器非随机相对定位研究中取得了进展。他的解析途径是将该细胞器和一特定参照点之间的距离换算为相关的两个区域的面积比（图4），然后将比值的统计分布与各特定分布作比较，从而确定二者之间的相对位置关系[10]。

目前，对细胞器空间结构分析（包括相同细胞器的群集分析cluster analysis）的问题远未解决，Hermon等提出的公式也还有待于数学和模拟实验验证。但空间位置定量是立体学家和生物医学工作者最感兴趣的问题之一。

应用中的几个问题

1．*抽样*　立体计量这一新的分析方法是通过抽取部分样品以推断整个结构的空间数值，因此，要取得足以代表总体的样本，需要采取严密的抽样步骤。立体计量常用抽样方法为多阶随机抽样（multi-stage random sampling），一般可分4步：

①随机抽取若干动物，动物数记为n_0；

②每只动物随机包埋若干个块，块数为n_1；

③每块随机照若干照片，照片数为n_2；

④每张照片使用同一个具若干点的测试板，测试点数n_3。

这里提出了实验设计中最佳抽样效率问题，在予取得到理想的高精确度的同时，应对工作量和实验周期进行仔细估算。若令上述4步间方差分别为S_0^2、S_1^2、S_2^2、S_3^2，则总方差公式[6]是：

$$V(x) = \frac{S_0^2}{n_0} + \frac{S_1^2}{n_0 n_1} + \frac{S_2^2}{n_0 n_1 n_2} + \frac{S_3^2}{n_0 n_1 n_2 n_3}$$

……

由公式可见，无论增大哪一步n值，均使总方差$V_{(x)}$减小，即平均误差减小。但以n_0（动物数）增加为最优，n_1次之，n_2再次之，n_3效果最差。

由于抽样是多阶的，n_0增大，势必造成后续各步n值增大。Shay（1975）[12]对动物数n_0作了详细推导，他提出的公式是：$n_0 = C \cdot S_0^2/d^2$，S_0 标准差；d 要求检测的差别，一般生物医学研究精度可取10%；C 与显著性和把握度有关，可从作者编制的倍增表上查得。

Gundersen（1981）进行肾血管球基底膜厚度立体计量分析时，设计了简明的列线图解表示法，他所推荐的各级最佳抽样数为$n_1:n_2:n_3 = 1.2:14:250$[13]。

综上所述，目前实用的抽样方针可考虑为：每组（每个时相当）动物数至少3～5只，每只包埋5个块，每块拍摄3～5张照片，每张照片上覆盖100～400个测试点。这样，每组电镜照片数45～75张，这个工作量在一般研究中是可以被接受的。

2．*随机性与有序性问题*　立体学分析的重要基础之一是结构分布的相对随机性。在显著不随机

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分布的各向异性组织中，计量过程就比较复杂。另外，生物结构的有序性问题正引起人们重视，已有资料表明，生物体各个层次（包括超微结构）中结构的配置很可能是有规律的。比如多数骨骼肌纤维中，线粒体的优势倾向在I带而不是A带出现，这种分布使肌纤维在纵向上成为各向异性。横切面上情况也类似。在测量V_V和S_V时，为补偿这类分布的不随机性，设计了一些方法，如增大横切面样本数；以肌节为对象，切出一定量的随机斜切片；推导新的专用计量公式；选用半圆曲线测试板以及在与方位轴平行及垂直两个方向上先后两次测算等等。这些方法已被采用，但这些解决方案还需从数学理论高度进一步完善并使之简化[4][14][15]。

3. 立体计量与微型电子计算机应用　尽管在总体设计时经过仔细考虑，但立体计量应用中常见问题之一是工作量偏大，尤其是在对细胞进行综合观测时。目前常用微型电子计算机作测量、数据存储、计算、统计处理等工作，组成所谓半自动图象分析系统。比如在计算表面密度Sv时，可不采用交点计数法，而将图象置于微机输入端的数字转换板（digitizer tablet）上，用触笔顺次描绘所测结构的边界，各点坐标逐一输入机内，待曲线闭合，该结构的周长和面积数即出现于荧光屏上，并自动记录、打印。该数字转换板坐标分辨率为0.1mm，足以满足超微结构研究的精度要求。有人用BASIC语言编入一计算及统计程序，所有样品测量完后可同时绘出多项统计处理数据，工作效率大为提高；不规则颗粒表面积/体积比可用上述方法求出，并可迅速得到不同几何形状颗粒的形状系数β；应用微机可极为方便迅速地变换参照系统（细胞、胞浆或单位组织），使所获信息更加丰富。新型微机加上必要附件，可处理280×280mm的照片，还可直接应用于光镜下图象处理[3][16][17]。

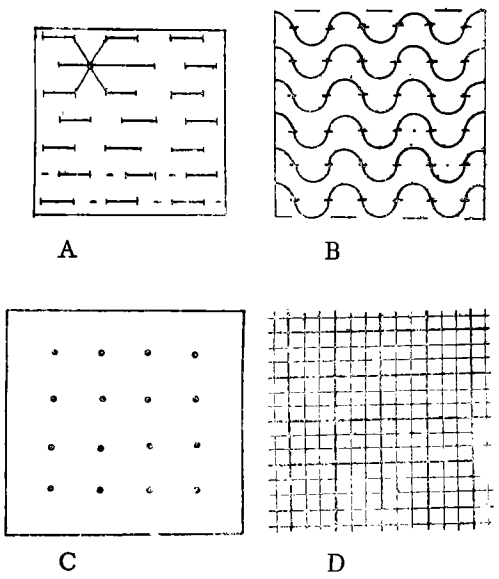


图1　立体计量测试板
A、多功能测试板　B、曲线测试板
C、点阵测试板　D、双重方格测试板

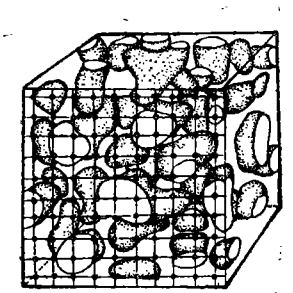


图2　计点法测量体积密度

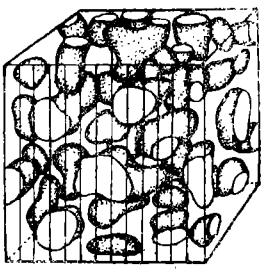


图3　用平行线测试板测量表面密度

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

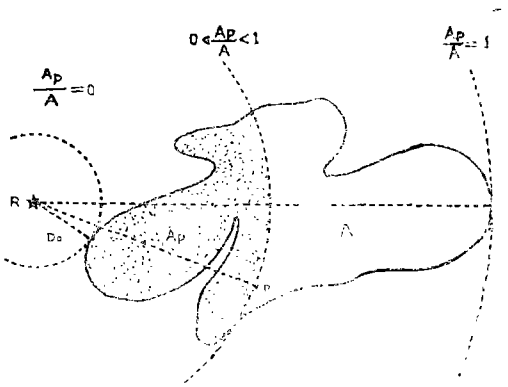


图 4　R是特定参照点；P是细胞器在面积为A的C区域中出现的位置，Ap是以R为圆心，PR为半径的圆弧与C 相交而分割的面积（阴影部分）。当AP/A 趋近于 0 时，P点位置靠近R；当AP/A趋近于1时，P点远离R。把AP/A 的平均值与0.5作t检验，即可 确定P、R之间是否呈非随机相对定位。

参 考 文 献

1. Weibel ER. Int Rev Cytol 1978; 26:235
2. Weibel ER, et al. in"Principles and techniques of microscopy" (Hayat MA ed.)Van Hostrand Reinhold Company, New York 1973; 3:239～283
3. Elias H, et al. A guide to practical stereology. Karger, Basel 1983
4. Meek GA and Elder HY. Anaytical and quantitative methods in microscopy. Cambridge University Press 1977
5. Wiliams MA. in"Practical methods in electron microscopy" (Gloert EA ed.)North-Holland Puolishing Company, Amsterdam. 1971; 6:6～80
6. Weibl ER, et al. J Cell Biol 1966; 30:23
7. Elias H, et al. Physiol Rev 1971; 51:158
8. Underwood EE. Quantitative Stereology, Addison-Weskey Publishing Company Reading, Massachusetts 1970
9. Hennig A, et al. J Microsc 1971; 93:101
10. Hermon D, et al. J Microsc 1981; 121:29
11. Cruz-Orive LM. J Microsc 1976; 107:1
12. Shay J. Amer J Path 1975; 81:501
13. Gundersen HJG, et al. J Microsc 1981; 121:65
14. Elias H, et al. Amer J Anat 1980; 159:412
15. Merz WA. Mikroskopie 1968; 22:132
16. 施鹏飞. 计算机数字图象处理。自然杂志 1985; 8:31
17. Weibel ER. Sterological methods, Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London 1979; 1

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net