

体视学与激光共聚焦显微镜图像分析黑色素瘤细胞三维形态学参数的变化

张莹¹ 胡纳¹ 汪曩¹ 杨春梅¹ 杨立² 胡新华³ 冯远明^{1,4}

¹ 天津大学精密仪器与光电子工程学院天津市生物医学检测技术与仪器重点实验室, 天津 300072

² Department of Internal Medicine, Brody School of Medicine, East Carolina University, Greenville, NC 27858, USA

³ Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858, USA

⁴ 天津医科大学肿瘤医院放射治疗科, 天津 300060

摘要 体视学是由形态学与数学交叉形成的一门新兴学科,通过二维结构信息定量测量和分析三维形态结构特征。采用体视学点计数方法,对肿瘤细胞 B16F10、B16/Vector 及 B16/GPR4 各 20 组的共聚焦显微镜图像进行测量,定量分析了其三维形态参数的差异。对比三类细胞的体视学参数发现,对照组 B16/Vector 和原始细胞 B16F10 没有明显差异,实验组 B16/GPR4 的细胞比表面及相对形状因子参数与另两类细胞相比均表现出了显著性差异(p 值分别小于 0.05 和 0.02,即 B16/GPR4 细胞形态光滑,没有较多的突触和伪足),与前期 Transwell 小室细胞侵袭及迁移实验研究结果相吻合,体现出 B16/GPR4 细胞中 G 蛋白耦联受体 4(GPR4)基因对细胞迁移性抑制的生物特性。研究表明,体视学和激光扫描共聚焦显微镜细胞图像的结合,可以实现细胞三维结构参数的快速测量,是细胞生物学尤其是细胞形态学分析的有效研究方法。

关键词 医用光学;肿瘤细胞三维形态;体视学;激光扫描共聚焦显微镜;B16F10 黑色素瘤细胞;G 蛋白耦联受体 4
中图分类号 R318.51 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0917001

Stereological and Laser Scanning Confocal Microscopic Analysis of 3-Dimensional Morphology of Melanoma Cells

Zhang Ying¹ Hu Na¹ Wang Yan¹ Yang Chunmei¹ Yang Li²
Hu Xinhua³ Feng Yuanming^{1,4}

¹ Tianjin Key Laboratory for Biomedical Measurement Technology and Instrumentation,
College of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering,
Tianjin University, Tianjin 300072, China

² Department of Internal Medicine, Brody School of Medicine, East Carolina University,
Greenville, NC 27858, USA

³ Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858, USA

⁴ Department of Radiation Oncology, Tianjin Medial University Cancer Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract Stereology is an interdisciplinary method for 3D morphological study developed from mathematics and morphology. And it is widely used in medical image analysis and cell-biology studies. The laser scanning confocal microscopic images (LSCMI) of tumor cells are quantitatively analyzed by using stereological point counting method. Three groups of cells, B16F10, B16/Vector and B16/GPR4 cells suspended in culture media, are studied and 20 image sets of each are taken and used in the experiments. The results show that the control group B16/Vector has no significant differences as compared with the parental B16F10 cells, while the experimental group B16/GPR4 shows

收稿日期: 2012-02-16; **收到修改稿日期**: 2012-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(81041107, 81171342)资助课题。

作者简介: 张莹(1988—),女,硕士研究生,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: zhangyingmagic@gmail.com

导师简介: 冯远明,男,博士,教授,主要从事医学物理学、放射肿瘤学临床及细胞光学等方面的研究。

E-mail: ymfeng@tju.edu.cn(通信联系人)

significant differences in the stereological parameters of the cellular surface area to volume ratio (R_{sv}) and the relative cellular form factor (f) ($p < 0.05$ for R_{sv} , and $p < 0.02$ for f , respectively), suggesting that B16/GPR4 cells have less surface protrusions and reduced irregularity. This is in line with the previous observations that GPR4 inhibits migration and invasion of tumor cell in the transwell assay. The combination of stereology and laser scanning confocal microscopic imaging techniques provides a quick and useful method in cell biology, and especially in cell morphology studies.

Key words medical optics; 3D morphological pattern of tumor cell; stereology; laser scanning confocal microscope; B16F10 melanoma cells; G protein-coupled receptors 4

OCIS codes 170.3880; 170.1530; 170.1790

1 引 言

近 30 年来,癌症的发病率一直呈上升趋势,成为对人类生命健康危害最大的疾病之一。肿瘤的病理学检查是极其重要的肿瘤诊断方法之一,病理学家可以通过血液细胞或组织样品的二维形态结构等给出肿瘤的性质、分级等关键信息,为临床治疗提供重要的依据。显微镜下观察组织涂片,肿瘤细胞的形态较正常细胞有明显的区别,如细胞体积增大、形状不规则、核增大、核质比增大和异常分裂增殖等,而恶性肿瘤由于其易迁移、侵袭及转移等性质,其细胞有更多明显的形态学变化。传统的病理学检测只是依据二维空间的信息,单一方向的二维投影丢失了大量的形态信息,同时也缺乏客观的定量标准,现代病理检测需要更全面、准确的形态信息,从二维发展到三维空间信息。

体视学是由二维结构信息定量推论三维结构信息,由形态学与数学之间交叉形成的新兴学科,具有无偏、快速、无伤和重复性高等特点^[1]。从概率统计的意义上来说,一个三维体的二维切片包含其三维结构的定量信息。对二维取样设定一定的限制性条件,可以实现三维形态信息的准确估计。因此体视学测量要求对所测样本以任意位置开始、任意等间距取样,即满足均匀随机抽样原则。体视学技术是基于卡瓦列里(Cavalieri)原理和德莱塞(Delesse)原理发展起来的,目前已有多种测量方法,最常用的是点计数方法^[2]。该方法在获取的样本图像上叠加,包含了无偏分布的点或线等几何图形的测量图,统计样本图像和几何图形之间的联系,如计数结构内点的个数等,然后根据已有的体视学参数公式得到有用的三维形态学参数。

在临床医学领域中,体视学已经应用于各种医学图像[如计算机断层扫描(CT)、核磁共振成像(MRI)、放射性核素扫描(ECT)、超声等]分析,对组织、器官进行三维结构定量研究,并依据结构和功能的一致联系性,为疾病诊断提供帮助^[3~5]。另外,目前体视学方法也被用于细胞层面的多种测量,如结

合光学显微镜图像,实现三维目标计数,测定细胞密度^[6]。而少有细胞三维形态结构分析方面的应用研究。激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)以其高对比度、高分辨率、无损断层成像等优点被广泛应用于细胞等各种生物微粒的研究。由于 LSCM 获取的二维图像为景深极小的“光学切片”,在沿与切片平面垂直方向连续移动样品时可获得样品不同深度层次的二维图像,可以任意选择成像位置及成像间距,得到细胞的二维均匀随机取样断层图像,所得二维图像组数据满足体视学运用条件。使用体视学方法对同细胞系多个细胞的共聚焦显微图像数据进行处理和统计分析,获得其三维结构参数,具有重要意义,可用于表征该类细胞的三维形态学特征。因此将体视学与激光扫描共聚焦显微镜成像测量结合,实现细胞三维结构的快速定量分析。目前已有国外研究人员将体视学方法应用于生物研究的不同领域,如胚胎学、组织学等。采用共聚焦显微体视学研究器官、组织等结构和分布以及实现细胞计数^[7]。本文采用前期细胞生物实验所用小鼠黑色素瘤高转移细胞株 B16F10 及其基因表达改造后的细胞株 B16/GPR4 及 B16/Vector 进行悬浮细胞激光扫描共聚焦显微图像采集,并尝试运用体视学方法进行细胞三维结构特征测量、统计基因改造前后细胞三维结构参数、分析细胞三维形态变化。作为迁移性较强的肿瘤细胞,B16 类细胞很有可能脱落、侵袭进入血液循环,以悬浮细胞形式变为循环肿瘤细胞,因此研究悬浮状态下肿瘤细胞三维形态对肿瘤早期诊断及细胞生物学研究均具有重要意义。并将形态学测量结果与前期肿瘤细胞侵袭及迁移实验结果进行对比,以验证体视学方法结合激光扫描共聚焦显微成像技术用于细胞三维结构分析的有效性。

2 材料与方 法

2.1 细胞图像获取

本研究工作所用的细胞来源于美国模式培养物

集文库(ATCC)的小鼠黑色素瘤高转移细胞B16F10。实验组B16/GPR4细胞是将人类G蛋白耦联受体4(GPR4)基因片段稳定转入和表达小鼠黑色素瘤高转移细胞B16F10中所得的细胞,实验中的对照组B16/Vector细胞是将空白基因表达载体转入到B16F10细胞中所得的细胞。详细的基因表达实验过程参见文献[8]。对B16F10、B16/GPR4、B16/Vector三类肿瘤细胞分别进行体外细胞培养^[8,9]。贴壁生长的B16细胞经胰蛋白酶/EDTA分离后重新悬浮在培养液中用于共聚焦成像研究。

接着在悬浮状态下对三类细胞分别进行双荧光染色。利用SYTO 61染料(S11343, Invitrogen, Oregon, USA)对细胞核染色,在激光扫描共聚焦显微镜下被波长为633 nm的入射激光束激发,所产生的荧光在通过边缘为650 nm波长的高通滤光片后由光电倍增管探测,其12 bit图像数据存于输出彩色图像文件的红色通道内;用MitoTracker-orange染料(M-7510, Invitrogen, Oregon, USA)对线粒体染色,其在波长为543 nm的入射激光束激发下所产生的荧光在通过560~615 nm波长的带通滤光片后由光电倍增管探测,其12 bit图像数据存于输出图像文件的绿色通道内。这两种荧光染料在细胞质区域内都会产生弱荧光信号,但明显弱于细胞核高亮红色和线粒体高亮绿色荧光。以细胞外任意位置起始,固定采样间距,采用激光扫描共焦

显微镜(Zeiss LSM510, Zeiss, Germany)对全细胞进行三维“光学层切”成像,获得一组细胞二维图像(如图1所示)。图像组采集参数设定为:Z方向采样间距为0.5 μm , X、Y方向像素长度为0.07 μm ,图像尺寸为512 pixel \times 512 pixel。由于细胞形态尺寸的复杂性,单个细胞的有效共聚焦断层图像层数范围为40~70张。图2为B16/Vector细胞和B16/GPR4细胞的激光扫描共焦显微图像,从图中可以看出,B16/Vector细胞有较多的突触和伪足,B16/GPR4细胞形态光滑。

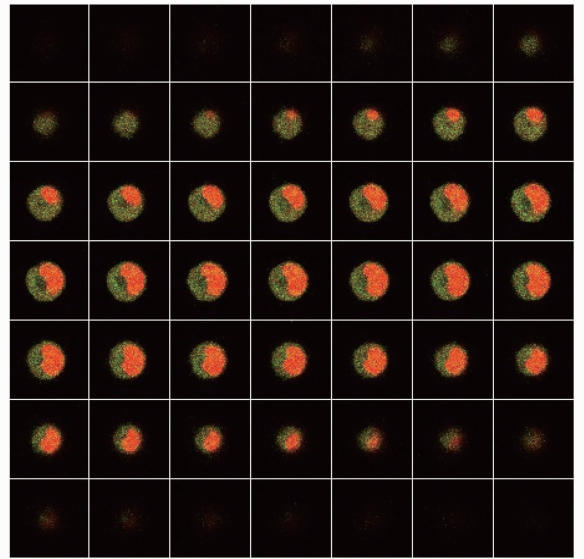


图1 B16/GPR4细胞LSCM图像

Fig.1 LSCM images of B16/GPR4 cell

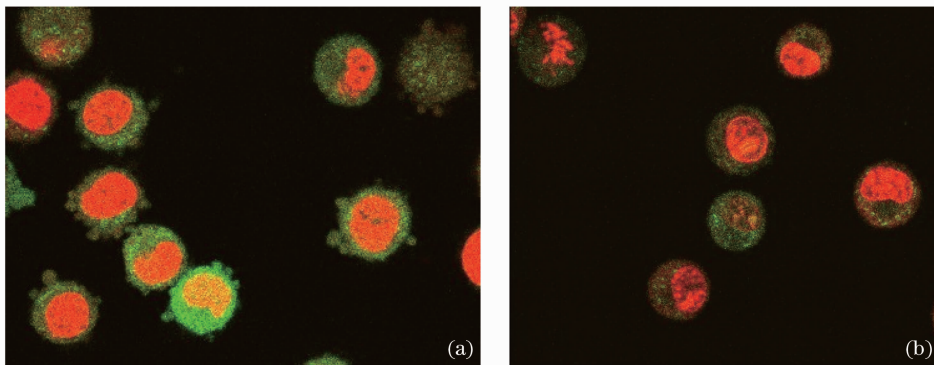


图2 细胞LSCM图像。(a) B16/Vector细胞;(b) B16/GPR4细胞

Fig.2 LSCM images of cells. (a) B16/Vector cells; (b) B16/GPR4 cells

2.2 细胞图像预处理

如图3所示,LSCM得到的细胞图像是双通道伪彩色图像,特异性荧光标记物使得图像对比度较好,可对所有图层进行灰度直方图统计,选择直方图谷点作为阈值,去除图像背景荧光。由于成像系统及数据采集系统性能的制约等原因,图像上会有一

些杂散噪声,使用中值滤波可有效抑制脉冲噪声和椒盐噪声,并能较好地保护细胞图像的边缘。

2.3 体视学方法

体视学方法是基于几何概率理论的形态定量研究技术,是从切片或截面影像中获得三维显微结构的定量工具。点计数方法使用和样本图像相同大小

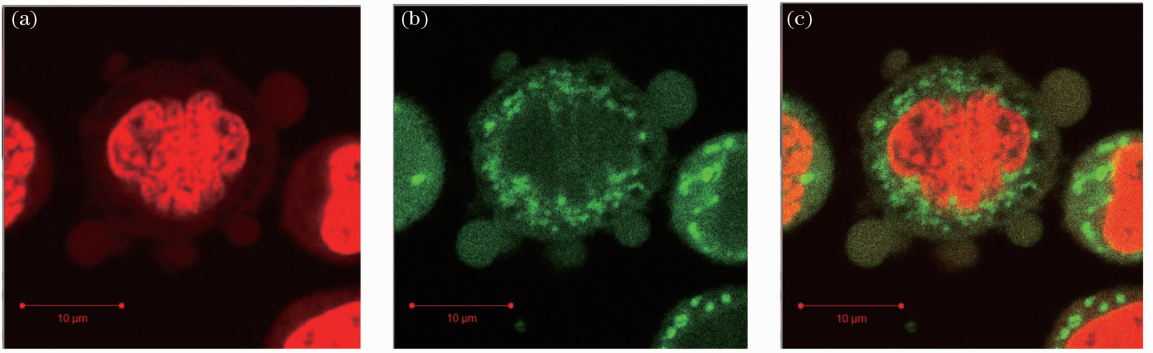


图 3 B16/vector 细胞 LSCM 图像。(a)红色通道显示细胞核；(b)绿色通道显示线粒体；(c) (a)和(b)重叠图像
Fig. 3 LSCM images of B16/vector cells. (a) Red channel image with nuclei marked; (b) green channel image with mitochondria marked; (c) overlapped image of (a) and (b)

的测量图,在其上均匀分布中心对称的几何图形(如图 4、5 中符号×),每个几何图形在二维图上占据一定的面积,三维空间则代表一定的体积,称为体视格。将测量图覆盖到细胞 LSCM 断层图像上,通过计数结构内点的个数完成对形态参数的估计,如截面面积,轮廓周长等,如图 5 所示,继而推知三维参

数。为了保证参数估计的准确性,计数必须遵循一定的原则,即有效体视格点必须满足体视格全部在目标结构范围内,或几何图形中心点被右向包围(即中心点右侧有目标结构像素点),如图 4 所示。遵照计数原则可以实现体视格的自动计数。

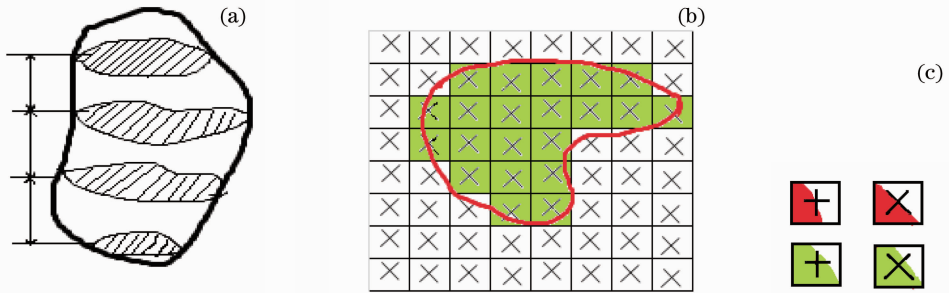


图 4 体视学点计数示意图。(a)均匀随机取样；(b)点计数；(c)有效格点示意,其中第一行上的两个点被判定为无效格点,第二行上的两个点被判定为有效格点

Fig. 4 Schematic diagram of stereology point counting. (a) Uniform random sampling; (b) point counting; (c) schematic diagram of valid grid points, the 2 points in the upper row are invalid while the 2 points in the lower row are valid

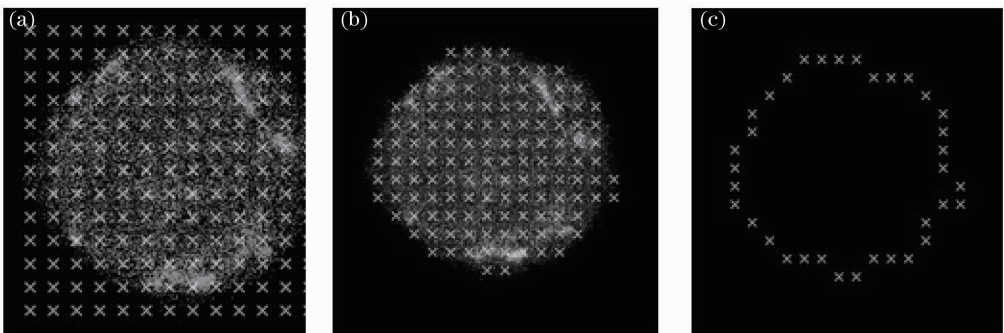


图 5 覆盖于一幅细胞图像上的体视格和记数格点。(a)在一幅细胞图像上放置上体视格；(b)落在细胞内的有效格点；(c)由落在细胞边缘的有效格点确定的细胞轮廓线

Fig. 5 Stereological grids and valid counting grid points on one slice of a cell image. (a) One slice of the cell image covered by stereological grids; (b) valid grid points in the cell; (c) the contour of the cell defined by valid grid points on cell's edge

2.3.1 体视学准确性检测

悬浮状态的细胞取向各异,随机选择细胞,自下而上断层扫描,多样本数据统计分析满足概率统计均匀随机取样原则,可以应用体视学方法统计细胞三维参数。采用误差系数 ϵ 来衡量参数估计的总误差。目前公认的标准为当 ϵ 值小于5%时认为参数估计结果是可靠的^[10]。本文采用点计数方法,误差主要由两部分组成:一是体视格有效点计数造成的误差(ϵ_{noise}),另一项则是因采样间距不同带来的误差(ϵ_{SRS})。在本实验所用细胞LSCM断层图像采样中,固定步长设置为 $0.5\ \mu\text{m}$,体视学则可以均匀抽取不同数量断层图像进行点计数,如选用所有图层的全计数、间隔一层取样的二分之一计数等,均满足均匀随机取样原则。结果的准确性和体视格大小及切片间距相关,断层图像间隔越大,或体视格越大,点计数结果和真实结构差别越大,准确性越低,但相应的计算时间减少。对数据准确性的检测,体视学有基于概率统计的检测标准,误差计算公式为

$$\epsilon_{\text{noise}} = 0.0543 \frac{b}{\sqrt{s}} \sqrt{n \sum_{i=1}^n P_i}, \quad (1)$$

式中参数 $\frac{b}{\sqrt{s}}$ 为形状系数,其中 b 为待测量结构平均周长, s 为平均面积。参数 n 为采样层数,而 P 为该层面上有效点数:

$$\epsilon_{\text{SRS}} = \frac{3(A - \epsilon_{\text{noise}}) - 4B + C}{12}, \quad (2)$$

式中 $A = \sum_{i=1}^n P_i P_i$, $B = \sum_{i=1}^{n-1} P_i P_{i+1}$, $C = \sum_{i=1}^{n-2} P_i P_{i+2}$, P_i 代表在第 i 张截面上体视格有效点的数量:

$$\epsilon = \frac{\sqrt{\epsilon_{\text{SRS}} + \epsilon_{\text{noise}}}}{\sum_{i=1}^n P_i}. \quad (3)$$

2.3.2 体视学参数选择

体视学用各种参数来表征三维结构,如表征大小的尺寸参数、表征分布的密度参数、表征结构的形状参数等。参数的选择依研究目的而定。本实验分别测量和计算了三类细胞的平均体积 V_c 、细胞核的平均体积 V_n 、细胞比表面 R_{svc} 和细胞形状因子 f 等。

细胞比表面是细胞表面积 S_c 与体积 V_c 之比,可以表示结构的尺寸大小,甚至和细胞生理情况相关。细胞形状因子是另一个体视学常用的反映细胞形状的参数,单层细胞截面图像的形状因子可以表示截面形状与圆相差的程度。圆的形状因子为1;越不规则,形状因子越大。统计所有取样截面上细

胞的形状因子可以表征细胞三维形状的不规则性。本研究无需计算细胞形状因子绝对数值,因此以20组B16/GPR4细胞的平均形状因子为参考标准,测量和计算所有细胞的相对形状因子。上述体视学参数的计算公式为^[10,11]

$$V_c = d \sum_{i=1}^n (P_{ci} a^2), \quad (4)$$

$$V_n = d \sum_{i=1}^n (P_{ni} a^2), \quad (5)$$

$$S_c = \frac{4}{\pi} d \sum_{i=1}^n B_{ci} = \frac{4}{\pi} d \sum_{i=1}^n \left(\frac{\pi}{2} P_{ci} a \right), \quad (6)$$

$$R_{\text{svc}} = \frac{S_c}{V_c} = \frac{\frac{4}{\pi} \sum_{i=1}^n B_{ci}}{\sum_{i=1}^n (P_{ci} a^2)}, \quad (7)$$

$$f = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \frac{B_{ci}^2}{4\pi P_{ci} a^2}, \quad (8)$$

式中 d 为截面图像间距, P_{ci} , P_{ni} 分别为第 i 层细胞和细胞核的有效格点数, a 为像素点的实际边长, a^2 为像素点的面积; B_{ci} 则为第 i 层细胞等效周长,用几何概率可以证明,实际细胞周长和有效格点周长 $P_{ci}a$ 存在 $\pi/2$ 的比例关系,而细胞实际表面积 S_c 和切片周长之间有比例系数 $4/\pi$; N 为有效细胞图像层数。

3 实验结果

3.1 准确性估计

分别对本研究选用的B16F10、B16/GPR4、B16/Vector三类细胞的全细胞和细胞核图像取不同大小的体视格,即设置相邻体视格中几何图形中心点间隔分别为10~30 pixel不等,计算估计值的误差系数 ϵ 值。表1为对包含细胞质、细胞核等结构的全细胞图像 ϵ 值的计算结果,表2为对细胞核图像 ϵ 值的计算结果。实验数据显示,几种情况下的 ϵ 值都远远小于5%,即应用体视学方法,在所列相邻体视格中几何图形中心点间隔范围为10~30 pixel之间时,测得的三维结构参数数据均可靠。由表1可见,当选取的间隔越小,所得 ϵ 值越小,亦即测量精度越高,但有效格点判断的复杂程度以及计算时间会相应增加。实验研究表明对应于间隔为30 pixel和10 pixel时计算时间相差5倍。为平衡复杂程度和测量结果的准确性,实验中采用间隔30 pixel和间隔15 pixel的体视格分布分别计算形态学参数,并求取平均值作为最终结果。

表 1 对包含细胞质、细胞核等结构的全细胞图像 ϵ 值计算结果

Table 1 Calculated ϵ values of different stereological grids for cells containing cytoplasm and cell nuclei

Cell	Interval of adjacent grids /pixel				
	30	25	20	15	10
B16F10 /%	0.695	0.522	0.378	0.222	0.209
B16/GPR4 /%	0.534	0.447	0.365	0.298	0.260
B16/Vector /%	0.653	0.598	0.516	0.328	0.204

表 2 对细胞核图像 ϵ 值计算结果

Table 2 Calculated ϵ values of different stereological grids for cell nuclei

Cell	Interval of adjacent grids /pixel				
	30	25	20	15	10
B16F10 /%	1.338	1.042	0.752	0.558	0.344
B16/GPR4 /%	1.019	0.786	0.542	0.392	0.246
B16/Vector /%	1.070	0.982	0.753	0.574	0.316

3.2 体视学参数数据

对上述三类细胞分别随机选取 20 组(以单个细胞所有三维断层图像为一组)细胞激光扫描共焦显微镜三维断层扫描图像进行体视学统计分析,获得

体视学参数数据如表 3 所示。为检验用体视学方法计算所得数据的正确性,将前期细胞三维重建测量形态研究中得出的相应数据列于表 4,以便比较和分析。

表 3 细胞三维参数体视学测量结果及统计分析

Table 3 Measured values of 3D cell stereological parameters and statistical analysis

	$V_c/\mu\text{m}^3$	$V_n/\mu\text{m}^3$	R_{svc}	f
B16F10	3556±1152	995±236	0.520±0.080	1.084±0.055
B16/Vector	3786±940	1102±307	0.513±0.061	1.109±0.007
B16/GPR4	3874±608	1056±239	0.474±0.042	1.000±0.011
p value (B16F10 versus B16/Vector)	>0.1	>0.1	>0.05	>0.05
p value (B16/Vector versus B16/GPR4)	>0.1	>0.1	<0.05	<0.02
p value (B16F10 versus B16/GPR4)	>0.1	>0.1	<0.05	<0.02

p : probability to reject the assumption that two independent samples are significantly different

表 4 细胞三维重建后形态参数测量结果及统计分析

Table 4 Measured values of cell parameters through 3D reconstruction and statistical analysis

	$V_c/\mu\text{m}^3$	$V_n/\mu\text{m}^3$	R_{svc}
B16F10	2819±710	858±229	0.517±0.078
B16/Vector	2914±889	887±262	0.517±0.066
B16/GPR4	3107±758	979±221	0.470±0.048
p value (B16F10 versus B16/Vector)	>0.1	>0.1	>0.05
p value (B16/Vector versus B16/GPR4)	>0.1	>0.1	<0.05
p value (B16F10 versus B16/GPR4)	>0.1	>0.1	<0.05

p : probability to reject the assumption that two independent samples are significantly different

由于体视格几何图形形状及分布的不同会有偏差,绝对数值的参数,如细胞平均体积(V_c)、核平均体积(V_n)等,通常用作参考。而且,本实验的三种细胞本质属于同种细胞,全细胞绝对体积及细胞核绝对体积数据区别不明显($p>0.1$)。对照细胞三维重建后参数数据,体视学方法对细胞及细胞核体

积计算有较大数值差异(大于 20%),但与重建后细胞参数保持一致的特征,即三类细胞体积结果没有明显区别($p>0.1$)。

细胞比表面(R_{svc})反映细胞膜表面的光滑程度,表 3 数据表明,B16F10 和 B16/Vector 差别不明显($p>0.05$),而 B16/GPR4 的 R_{svc} 显著小于

B16F10 和 B16/Vector 的 R_{sv} ($p < 0.05$)。表 4 中相应三维重建后细胞比表面 R_{sv} 参数数据和体视学 R_{sv} 数值接近(小于 7%), 且特征一致。以 B16/GPR4 为标准的相对形状因子 f 可以表现三类细胞间的形状差异。实验数据表明, B16F10 和 B16/Vector 细胞的这个参数都大于 B16/GPR4 细胞的同一参数($f=1$), 与 B16/GPR4 相比均有明显差异 ($p < 0.02$), 表明它们的三维形态更不规则。

4 讨 论

GPR4 是 G 蛋白耦联受体(GPCRs)的一种。G 蛋白耦联受体是一类特殊的蛋白质家族, 是细胞跨膜信号传导的介质。它可以与激素、神经递质、光和气味分子等小分子物质发生相互作用, 将信息传递到膜内, 对细胞功能的调节起着重要的作用。人类很多重大疾病的发生往往都与 GPCR 功能紊乱有关。研究证明, G 蛋白耦联受体的异常表达和失调与癌症迁移、侵袭及转移等密切相关^[13,14]。就形态学参数而言, 恶性肿瘤细胞分裂繁殖较快、迁移性较强, 三维形状不规则、会有较多的突出伪足等, 会有较大的细胞比表面及相对较大的形状因子。

本课题组研究发现, B16/GPR4 的细胞形态较规则、细胞膜相对更光滑, 更少突出或伪足等类似结构, 形状因子及细胞比表面等体视学参数均显著小于空白基因表达载体改造细胞 B16/Vector 和原始细胞 B16F10 的相应参数; 而将 B16/Vector 与 B16F10 比较, 形态学参数未发现显著差异。由图 3 可见, 伪足内部像素红色通道和绿色通道内的着色强度与细胞内部细胞质各自通道内的着色强度完全一致, 没有显示任何膜质存在于两者之间, 表明均为同一细胞内的细胞质的可能性很高, 基本排除伪足为残渣的可能性。根据结构和功能相关一致原理, 可以推测 GPR4 基因对细胞生理造成的影响, 可能抑制肿瘤细胞迁移、侵袭及转移等性质。这与前期 Transwell 小室细胞侵袭及迁移实验结果相吻合^[8]。

通过对体视学方法所得细胞形态特征参数(表 3)和三维重建后特征参数(表 4)数据比较可见, 用体视学方法测得的参数与前期采用三维重建测量所得参数, 在反映细胞形态特征上具有很好的一致性。体视学方法可以有效获得细胞形态特征参数。

体视学和共聚焦显微镜细胞三维断层图像结合可以实现单细胞三维结构参数的快速测量。分析了经生物基因改造的黑色素瘤细胞功能性改变引起的形

态改变, 即应用体视学方法测量细胞共聚焦显微断层图像并有效统计分析单细胞形态结构。

5 结 论

体视学和激光扫描共聚焦显微镜细胞成像技术的有机结合, 提供了比二维投影更全面更丰富的形态结构信息, 和直接三维重建的三维分析相比计算时间要小得多。因此, 可以实现细胞三维结构参数的快速获取。而且, 基于概率统计规律, 体视学参数数据在较多样品量情况下可以获得细胞的特征参数。因此, 针对肿瘤细胞的体视学分析可以作为肿瘤细胞分析的辅助工具, 为肿瘤的诊断提供帮助。体视学和激光扫描共聚焦显微成像技术的多项优势结合, 将可以为细胞生物学及其它与细胞形态学分析相关联的研究提供一个有效的方法。

参 考 文 献

- Shen Hong, Shen Zhongying. Practical Technique of Biomedical Stereology [M]. Guang Zhou: Sun Yat-sen University Press, 1991. 1~3
申洪, 沈忠英. 实用生物体视学技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 1991. 1~3
- H. J. G. Gundersen, P. Bagger, T. F. Bendtsen *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**(7-12): 857~881
- S. Kabay, H. Ozden, M. Yucel *et al.*. Estimation of the tumor volume and volume ratio on computed tomography in patients with renal cell carcinoma: a stereology study [J]. *J. Health Science*, 2007, **53**(6): 664~670
- O. Yoruk, S. Dane, H. Ucuncu *et al.*. Stereological evaluation of laryngeal cancers using computed tomography via the cavalier method; correlation between tumor volume and number of neck lymph node metastases [J]. *J. Craniofacial Surgery*, 2009, **20**(5): 1504~1507
- G. Ak, M. Metintas, S. Metintas *et al.*. Three-dimensional evaluation of chemotherapy response in malignant pleural mesothelioma[J]. *Eur. J. Radiology*, 2010, **74**(1): 130~135
- C. Hercher, M. Parent, C. Flores *et al.*. Alcohol dependence-related increase of glial cell density in the anterior cingulate cortex of suicide completers[J]. *J. Psychiatry & Neuroscience*, 2009, **34**(4): 281~288
- L. Kubinova, J. Janacek, P. Karen *et al.*. Confocal stereology and image analysis: methods for estimating geometrical characteristics of cells and tissues from three-dimensional confocal images[J]. *Physiol. Res.*, 2004, **53**(S1): S47~S55
- R. D. Castellone, N. R. Leffler, L. Dong *et al.*. Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor[J]. *Cancer Letters*, 2011, **312**(2): 197~208
- A. E. Ekpenyong, Junhua Ding, Li V. Yang *et al.*. Study of 3D cell morphology and effect on light scattering distribution [C]. *SPIE*, 2009, **7367**: 7367_1J
- Zhen Fusheng. Cell Stereological Morphometry [M]. Beijing: United Press of Peking Medical University and Peking Union Medical College, 1991. 20~80
郑富盛. 细胞形态立体计量学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991. 20~80

- 11 Yang Jianru, Chen Yue, Guan Zengwei *et al.*. The study on the form factor of the breast cancer cell morphological quantitative analysis [J]. *Chinese J. Medical Imaging Technology*, 2000, **16**(2): 130~131
杨建茹, 陈 跃, 管增伟 等. 对乳腺癌细胞形态定量分析中形状因子参数的研究[J]. *中国医学影像技术*, 2000, **16**(2): 130~131
- 12 M. Mazonakis, K. Pagonidis, T. Schlosser *et al.*. Stereological estimation of left-ventricular volumetric and functional parameters from multidetector-row computed tomography data[J]. *Eur. J. Radiology*, 2008, **18**(7): 1338~1349
- 13 E. A. Ariazi, E. Brailoiu, S. Yerrum *et al.*. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2010, **70**(3): 184~189
- 14 L. S. Singh, M. Berk, R. Oates *et al.*. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, a new metastasis suppressor gene in prostate cancer[J]. *J. National Cancer Institute*, 2007, **99**(17): 1313~1327

栏目编辑: 韩 峰