

细胞形态 立体计量学

郑 富 盛 著

05

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社

细胞形态立体计量学

郑富盛著

责任编辑 樊景禹、方积乾

*

北京医科大学 联合出版社出版
中国协和医科大学

(地址: 北京医科大学院内)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经销

北京医科大学印刷厂印刷

开本: 850×1168 毫米 1/32 印张 8.25 数字 240 千字

1990年4月第一版 1990年4月第一次印刷 印数: 1—3000册

ISBN 7-81034-017-4/R·18

4.85 元

前 言

郑富盛同志离开我们已经半年多了。从1953年我和他在一起共事，先在北医物理教研室，1959年开始又一同调出来创建生物物理教研室。卅六年来我们始终在一起工作。为北医这两个教研室的创建和发展历尽艰辛。我无论如何也想不到，今天我竟不得不为比我年轻的他的遗著“细胞形态立体计量学”这本书来写一篇前言！

老郑是从清华大学物理系毕业的。1959年时北医引进了一台小型的电子显微镜，这也是全国医学院校中最早的电镜之一。在既无外国专家协助，又缺乏生物学知识的条件下，他毅然承担起安装、调试和运转的全部责任。整天钻研线路，研究结构、学做标本。不出三个月，这台电镜就在他刻苦钻研的基础上开始工作起来。为了使它在医学院能更好地发挥作用，他又自学了生物学、细胞学、组织学和病理学等有关知识，努力使自己成为一个内行。现在，虽然这台小型电镜已经退役了，但是全校现有的近十台各种电子显微镜能够顺利地投入运行，不能使人忘怀他对我校的贡献和付出的巨大劳动。

生物物理学对细胞的研究毕竟不能局限在对形态的观察上，作为物理学出身的他并没有满足于已有的成绩，而是开始探索一条新的研究工作途径。他认为：生命科学的研究已经从定性转向定量，从单纯形态转向形态与机能的结合。因此电镜工作也应该向更为精密的科学发展。这就是为什么最近十余年来他转向细胞形态立体计量学研究的原因。这本书就是他近年来研究工作和教学工作的结晶。

和开始从事电镜工作一样，关于立体计量学的研究也是他独

自探索的结果。他不仅研究了国外的同类文献,而且他从不盲从。他以严格、严密的态度,纠正了一些不够科学的推理和公式,独创性地提出了更符合实际的方法,发表了多篇论文。为了更有效地进行这方面的工作,他从头学习计算机,学会了自行编制程序,以便能更容易地向全国的同行们推广。特别是他考虑问题非常实际,把他的那些方法用很容易获得的微机来完成,而不是去依靠大型的计算机。他的工作总是针对着我国的实际情况,努力推广他行之有效的方法。为此他专门办了两期讲习班。他不但自己承担了全部讲课任务,而且努力创造条件,手把手地教会了来自全国各地的学员。他唯一的目的就是把全部知识教给他们,让他们很快掌握,并能立即回去应用,以提高全国电镜工作的水平。要知道1988年第二次办班时他已经重病在身,但他毫不犹豫,仍然全力以赴,当时他那奋不顾身的精神,曾经感动全班学员,而在听到他不幸去世的消息时,又有多少人为之痛哭失声!

他曾经立志要写一本更为详尽的著作,可惜天不假年,重病已经不允许他承担繁重的任务了。这本书就是在两次讲习班所用教材的基础上经过樊景禹和方积乾同志精心编辑而成的。读者们如果能从这本书得到启示,并应用于实际,使我国的细胞形态立体计量工作水平得到更进一步的提高,我相信富盛同志将得到极大的安慰,也是对他最好的纪念。

林克椿

1989年9月

序 言

细胞形态计量学 (Cell Morphometry) 是对细胞及其结构成分的形态进行定量分析的学术领域。

不同细胞具有不同的形态特征。细胞由细胞膜、细胞质及细胞核组成。细胞质内有各种细胞器及包涵物。细胞核中有核仁及染色质。所有这些结构成分，其大小、多少、形状、分布，均随细胞而异。同一种细胞，在不同的生理、病理或实验条件下，其形态特征可能发生变化。对于细胞的形态特征及其变化，传统的研究方法，多是进行定性的描述。由于数学、电子计算机及有关学科的发展，已经有可能对细胞的形态进行定量的分析。细胞形态计量学就是细胞形态的研究从定性发展到定量的产物。

二十世纪六十年代初期，欧美一些学者将金相学中对金属结构的分析方法及地质学中对岩石矿物的分析方法引入到生物组织及细胞结构成分的分析中来。这些不同领域中的问题的共同点，在于直接观察的对象是物体的剖面，得到的是二维图像，而所要分析的物体本身具有三维空间结构。从二维图像推导三维空间结构，要用到几何概率等一些数学方法，这一套方法，称为立体学 (Stereology)。将立体学的方法用在细胞形态的分析上，就是细胞形态计量学。

这本书主要介绍细胞形态计量学的方法，亦即结合细胞分析的特点，介绍立体学的方法。描写细胞及其结构成分形态特征的量，称为结构参数。就形态特征而言，细胞的有形成分可以分为三类，一为膜结构，包括质膜、核膜、线粒体膜、内质网膜、高尔基体膜等；二为颗粒结构，包括线粒体、溶酶体、微体、各种分泌颗粒等；三为纤维结构，包括微管及各种微丝。任何一种结

构成分，在空间都占有一定体积，膜结构具有一定的面积，颗粒结构具有一定的大小、形状及数目，纤维结构具有一定的长度。因此，细胞及其各种结构成分的体积、面积、长度、数目等，是细胞最基本的结构参数。这些结构参数的测算方法，也就是这本教材最基本的内容。

我国细胞形态计量学的工作，发展得比较慢。60年代初期，施履吉先生写了一本《定量组织学实验技术》(科学出版社，1964)。但国内这方面的工作开展得很少。这几年，随着医学生物学电子显微镜工作日愈普及，形态定量分析越来越受到重视。同时，微型电子计算机的应用迅速深入到各个学科，也促进了细胞形态计量学工作的开展。

这本书，吸收了我们几年来的工作经验与研究成果，有些内容，是尚未正式发表过的。编写这本书的目的，希望能对我国形态科学从定性到定量的发展起一点推动作用。书的体裁，前后不求完全统一，以把问题讲清楚，具体实用为原则。书中的内容，难免有疏漏错误，欢迎提出宝贵意见。

郑富盛

1987年3月

目 录

第 一 章 形态立体定量的意义	1
§ 1 二维图像与三维结构.....	1
§ 2 定性与定量.....	2
§ 3 抽样与统计.....	3
§ 4 立体计量方法的可行性.....	4
第 二 章 二维图像的测量	6
§ 1 面积的测量.....	6
1.面分析法 2.线分析法 3.点分析法	
§ 2 曲线长的测量.....	9
§ 3 颗粒截面的计数.....	11
§ 4 测试格.....	12
1.正方测试格 2.短线测试格 3.测试格的制作	
§ 5 颗粒截面的平均面积与平均周长.....	16
1.平均截面积 2.平均周长	
第 三 章 体积的相对测量	19
§ 1 参照系.....	19
§ 2 体密度的意义.....	19
§ 3 体密度的面分析.....	21
§ 4 体密度的线分析.....	22
§ 5 体密度的点分析.....	23
§ 6 核质比的测算.....	23
§ 7 抽样误差的计算.....	24
§ 8 照片的拍摄与张数.....	26
§ 9 照片的放大倍数.....	27

1.放大倍数的选择	2.放大倍数的校正	
§ 10	测试格网孔大小与测量误差	29
1.	用正方格测量体密度的误差	
2.	测量误差对抽样误差的影响	
§ 11	偏性抽样时核体密度的校正	33
第四章	膜面积的相对测量	36
§ 1	面密度的意义	36
§ 2	面密度与截线长的关系	37
§ 3	比表面的测量	38
§ 4	平均截距与比表面	40
§ 5	比膜面与面密度	42
§ 6	面密度测量中的几个问题	42
1.	用测试格测量截线长的误差	
2.	对放大倍数的要求	
3.	截线的方向性	
4.	切向膜漏测问题	
第五章	颗粒的形状	45
§ 1	凸形颗粒与非凸形颗粒	45
§ 2	颗粒截面形态的定量描述	46
§ 3	颗粒的圆球度	48
§ 4	一些规则的立体形状及其圆球度	50
§ 5	由二维图像推断颗粒的立体形状	53
1.	由截面形态特征分析颗粒的立体形状	
2.	由圆球度分析立体形状	
第六章	颗粒大小的测量	56
§ 1	平均外径的测算	56
1.	平均截距法	
2.	比表面法	
3.	平均截面积法	
4.	用平均周长法测算颗粒的平均外径	
§ 2	平均体积的测算	64
1.	平均截距与平均体积	
2.	比表面与平均体积	

	3. 平均截面积与平均体积	4. 用平均周长法测算颗粒的平均体积	
§ 3	颗粒不均匀的影响		69
	1. 与 f_d 有关的校正	2. 与 f_v 有关的校正	
	3. 与 β 有关的校正	4. 圆球度的校正	5. 最大平均外径的测算
§ 4	颗粒平均轴长的计算		76
§ 5	细胞及细胞核的平均体积		77
§ 6	任意形状颗粒的体积		78
	1. 凸形颗粒的体积	2. 非凸形颗粒的体积	
§ 7	颗粒基本几何参数之间的关系		82
	1. $\bar{V}$ 与 $\bar{S}$ 由比表面 δ 或平均截距 $\bar{l}$ 相联系		
	2. $\bar{V}$ 与 $\bar{D}$ 由平均截面积 $\bar{A}_x$ 相联系		
	3. $\bar{S}$ 与 $\bar{D}$ 由平均周长 $\bar{B}_x$ 相联系		
§ 8	颗粒的平均表面积		83
	1. 平均截距法	2. 比表面法	3. 平均截面积法
	4. 平均周长法		
第七章	颗粒数目的测量		85
§ 1	数密度的意义		85
§ 2	面数密度的测算		86
§ 3	球形颗粒的数密度		87
§ 4	非球形颗粒的平均外径与数密度		88
§ 5	由平均体积计算数密度		89
§ 6	任意形状颗粒的数密度		91
	1. 面数密度作图法	2. 剖析器测试法	
	3. 任意形状颗粒的基本几何参数		
§ 7	由线数密度及正投影面积求数密度		94
	1. 球形颗粒的 $\bar{A}_m$	2. 凸形颗粒的 $\bar{A}_m$	

3. 用线数密度求 N_v 的四种具体方法	
§ 8 其它计算数密度的公式·····	96
§ 9 各种计算数密度公式的比较·····	98
§ 10 颗粒的绝对数目及组织体积的测量·····	99
第 八 章 切片厚度对颗粒结构参数的影响·····	101
§ 1 颗粒基本几何参数之间的关系·····	101
§ 2 二维图像上直接测量的参数的校正·····	102
1. 面数密度 2. 平均截面积 3. 截面平均 周长	
§ 3 由测量参数直接计算的参数的校正·····	106
1. 体密度 2. 面密度 3. 比表面 4. 平均 截距 5. 圆球度	
§ 4 颗粒大小参数的校正·····	109
1. 平均外径均值 2. 平均表面积 3. 平均 体积	
§ 5 数密度的校正·····	111
§ 6 考虑小截面漏计效应时, 球形颗粒参数的 校正·····	112
§ 7 超薄切片厚度的测量·····	116
第 九 章 球形颗粒参数的测量·····	118
§ 1 平均直径的测量·····	118
1. 算术平均法 2. 调和平均法	
§ 2 由截圆直径计算的参数·····	123
§ 3 平均体积的计算·····	124
§ 4 从截距大小分布求颗粒大小分布·····	124
1. 均匀球截距的大小分布 2. 按截距数计 算均匀球的数密度 3. 不均匀球的数密度 4. 不均匀球的大小分布	
§ 5 从截圆大小分布求颗粒大小分布·····	132

§ 6	两种颗粒混合体的分析	137
第十章	膜面上结构的测量	138
§ 1	核孔的测量	138
§ 2	桥粒的测量	140
§ 3	微绒毛的测量	140
§ 4	球形细胞帽的测量	142
§ 5	膜面上小颗粒的测量	145
第十一章	线长与壁厚的测量	146
§ 1	曲线结构长度的测量	146
§ 2	薄板结构厚度的测量	147
	1. 算术平均厚度 2. 调和平均厚度	
	3. 由断面宽度求薄板厚度	
第十二章	有关立体定量的几个问题	151
§ 1	关于样品的制备	151
	1. 各级样本大小的确定 2. 组织收缩的校正	
§ 2	误差问题	154
	1. 三种误差 2. 抽样误差的运算	
§ 3	一般的形态定量步骤	155
§ 4	关于电镜与光镜的配合	157
§ 5	关于电子计算机的应用	157
§ 6	电镜图像分析方法的发展	158
第十三章	形态计量学的数学基础	159
§ 1	曲线长	159
	1. 抛针问题 2. 平面曲线长 3. 薄切片中空 间随机曲线长 4. 随机空间曲线的线密度	
§ 2	曲面面积	164
	1. 薄切片中随机曲面的平均宽度 2. 面密 度公式的证明 3. 平行圆柱结构的面密度	

	4. 平行圆柱结构纵切图像上正方测试格的使用	
	5. 平行胶囊形结构	
§ 3	圆与均匀球.....	170
	1. 圆的平均截距 2. 球的平均截距 3. 球截圆直径的算术平均 4. 球截圆直径的调和平均 5. 球截圆的平均周长 6. 球截圆的平均面积 7. 球截圆直径的概率分布	
§ 4	切片厚度对球参数计算公式的影响.....	174
	1. 对截圆直径算术平均的影响 2. 对截圆直径调和平均的影响 3. 对截圆平均周长的影响 4. 对截圆平均面积的影响 5. 对体密度的影响 6. 对面密度的影响 7. 对比表面的影响 8. 对球平均截距的影响	
§ 5	非均匀球.....	180
	1. 球平均直径的校正 2. 球平均体积的校正 3. 不均匀球的数密度 4. 不考虑切片厚度时球的大小分布 5. 考虑切片厚度时球的大小分布	
§ 6	非球形颗粒.....	190
	1. 体积、表面积与平均外径 2. 平均截距与形状因子 f_d 与 f_v 3. 平均截面积与形状系数 β 4. 截面的平均周长与颗粒的圆球度 5. 不均匀校正因子 6. 最大平均外径 7. 球形颗粒帽	
§ 7	薄板结构的厚度.....	204
	1. 算术平均法 2. 调和平均法	
§ 8	偏性抽样的校正.....	208
	1. 核与细胞为同心球 2. 核与细胞不同心 3. 核在中心与贴边之间随机分布 4. 细胞	

的其它参数

主要参考国外文献.....	213
国内形态立体计量方面的文献.....	214
附录一 主要符号及其意义.....	217
附录二 从剖面圆分布 (n_j) 计算球大小分布 $(N_v)_i$ 的系数 C_{ij}	219
附录三 从剖面圆分布 (n_j) 计算球数密度 N_v 的 系数 C_j	245
后记.....	247

第一章 形态立体定量的意义

长期以来，对于细胞形态的研究，都是采用定性描述的方法，甚至只是对切片的二维图像进行“镜下所见”的描述。这种方法，有很大的片面性，而且有时会发生错误。

§1 二维图像与三维结构

为了显示细胞内部的细微结构，通常采用超薄切片的方法。在透射电镜下所见的图像，只是细胞某一剖面的形态，是一种二维图像。

细胞本身具有三维空间结构。细胞及细胞器在空间具有一定的体积，在二维图像上显示为截面，具有一定的面积。膜结构在空间具有一定的面积，在二维图像上显示为截线，具有一定的长度。纤维结构在空间具有一定的长度，如果纤维的方向是随机分布的，则在二维图像上显示为一些截点，截点的数目与纤维的长度有关。总的说来，二维图像上，结构的“维”数，比三维结构中原来的“维”数少一。

从结构的形状来看，二维图像也只显示三维结构的各种剖面。例如，一群长椭球形的颗粒，在二维图像上显示为大小不同的圆形、椭圆形颗粒截面。就是一群大小均匀的球形颗粒，它的截面全是圆形，但大小也不相同。

从结构的数目看，二维图像一般只能显示三维结构的一部分。例如，若一个细胞有几千个线粒体，在二维图像上，一个细胞截面中一般也只能看到几十个。有些结构，数目少，在细胞中分布不均匀，在二维图像上，往往看不到。

由此可见，在二维图像上所见的细胞形态，其中各种结构的形状、大小、多少都发生了变化。单纯地描述镜下所见，是很片面的。

研究二维图像的目的，在于更细致地了解细胞的三维结构。如何由二维图像组合成三维结构？有两种方法可以达到此目的，一是连续切片法，二是立体计量法。

连续切片法，可以将不同截面的形态堆积起来，得出细胞的空间结构。实际做起来，这种方法比较困难。就是做成功了，也只得到个别细胞的结构。由于在同一个细胞群体之中，各细胞之间存在着差异，要对整个细胞群体的结构特征做出结论，是比较麻烦的。

立体计量法，是一种数学方法。取大量的二维图像，它们反映细胞的不同截面。在图像上进行面积、长度、数目等测量及计数，然后根据二维图像与三维结构的数学关系进行计算，最后得出细胞的三维结构参数。这种方法，虽然得不出细胞的具体形态，但可以得出较多定量的结构信息，而且可以避免主观性。这就是我们要详细论述的方法。

§2 定性定量

细胞及其中各种结构的形态，有些是很不规则的。同一种细胞在同一条件下，形态也是千差万别。就是定性描述，也需依靠有经验的专家。怎么能对形态进行定量分析呢？

有一个基本概念需要弄清楚，这里讲的定量，是指用统计方法定出的量，是代表一个细胞群体的量。就像人的身高、体重那样，虽有千差万别，但对一个人群而言，有一个统计平均值，还可找到一个标准差，用来表示这种量离散的程度，或用一个标准误差来表示平均值可信的程度。

这里所讲的细胞群体，是指在同一条件下的同一种细胞，这

群细胞在形态上基本是一致的。细胞群体的划分，可粗可细。例如有的作者将一种动物的肝实质细胞视为一个细胞群体。也有的作者将肝实质细胞划分为小叶中央、边缘及两者之间三个带，视为三个细胞群体。在肝损伤时，也可以按损伤程度划分为几个群体。此外，应该把分裂期细胞与间期细胞分开，而各时相的间期细胞，则很难从形态上区别开来，因而只能做为一个细胞群体。

同一个细胞群体，细胞之间虽然有差别，但形态的特征是相同的。用立体计量的方法得到的结构参数，就代表这个细胞群体的结构特征。

事实上，在定性描述中，通常也有量的描述。例如线粒体肿胀，代表线粒体的平均体积变大；内质网增生，代表内质网膜面积变大；核固缩，代表核的体积变小，等等。大小多少都是量的概念。在定性描述时，这种量是以很不确切的形式来表述的。而在立体计量中，结构的量是通过客观的测算，以具体的数值来表述的。

在实际工作中，我们往往要比较同一种细胞在不同生理、病理或实验条件下形态的变化。当外加因素比较强或作用时间比较长时，细胞形态的变化非常明显，定性的描述已很能说明问题。然而，形态的质变总是由量变积累而成。当外加因素比较弱，或作用时间比较短时，可能只呈现形态的量变。由于细胞群体内各细胞间的差异，不同实验组的细胞，形态结构的量（大小、多少）还可能有交叉。在这种情况下，若不用立体计量的方法，是很难得出确切的结论的。

§3 抽样与统计

一个细胞群体的细胞数目，往往是很大的。例如，一个动物的肝实质细胞，以亿计。小白鼠腹水癌细胞，每毫升至少有几千

万。而我们在光镜和电镜下能观察的细胞总是很少数，一般还不到总数的十万分之一。就是在电镜下看到的一个“完整的”细胞，实际上也只是一个细胞体积的几百分之一。因此，这种观察只是一种抽样观察。抽样观察要注意抽样的代表性，结果必须进行统计处理。在定性描述时，是用人的大脑进行综合，这也相当于一种统计处理。在形态定量时，就要对测量的数据，客观地进行统计运算。

抽样观察的结果总是有误差的。要想减小误差，只有增大样本含量。由于细胞结构参数的统计特性，在表示参数的数值时，一般应该写出平均值与误差。

如果一张光镜或电镜照片，基本上能够代表细胞的结构特征，则可以取为样本的一个单位。如果一张照片代表不了细胞的某种结构特征，则可以以一个组织块或一只动物的全部照片为样本的一个单位，在测算出一个单位内全部照片的数据之后，再用统计方法进行处理。

§4 立体计量方法的可行性

从以上的论述，我们可以看出对细胞形态进行立体定量分析的必要性、可能性以及细胞结构参数的统计性。

立体计量方法，是一种数学方法，有严格的科学性。对于形态学的工作者来说，要掌握立体学的理论，有一定的困难。但是立体学的结论往往是相当简单的，只要了解其应用的条件，具备一般的运算能力，是很容易掌握的。

细胞切片图像的立体定量分析，目前已有图像分析系统可资利用。图像分析系统是一种能把图像上的信息转换为数字并进行运算与处理的专用电子计算机系统，这种系统价格高昂，不易普及。由于电镜图像上的各种结构，目前还需要人来识别，因而利用图像分析系统，并不节约多少时间。没有图像分析系统，用