

Q954.6
0599

定量组织学 实验技术

施履吉著

定量組織学实验技术

施 履 吉 著

科 学 出 版 社

1 9 6 4

內 容 簡 介

本书介绍了定量組織学的动物实验方法,实验数据的处理,显微镜观察必需的知識,显微镜测量的原理和方法等。对組織结构元素的計数法,相对体积的測定,內表面积の測量等現代原理和方法都有相当詳細的叙述。可供一般生物学、医学和农业工作者,特别是研究工作者参考。

定 量 組 織 学 实 驗 技 術

施 履 吉 著

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝陽門大街117号

北京市书刊出版业营业許可証出字第061号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店經售

*

1964年11月第 一 版 开本:850×1168 1/32

1964年11月第一次印刷 印张:8 3/16

精裝:1—288 插頁:3

平裝:1—4,612 字數:212,000

統一書号:13031·2003

本社書号:3081·13—4

定价:[科六] 精裝本 1.80 元
平裝本 1.30 元

敬以此书献给党和热心于我国社会主义建设的生物
学、医学和农业工作者。

序 言

現代生物學的各部門都逐漸地由定性的研究過渡到定量的研究，由描述的工作進入到實驗的工作。組織學也不例外。一個新型的定量組織學已逐步的形成。由於其他學科和組織學本身的发展，過去不能作定量和實驗的形態特性的研究，目前已可能這樣做。但是進行這種工作除組織學的基础外還需要一些其他的基本知識，包括：數據的處理，實驗設計，測量的技術以及其他與顯微鏡測量有關的知識。其中有一些例如數據的處理，實驗設計等雖不是定量組織學所特有的，但卻是一切實驗和定量生物學所必需的；因此作定量組織學工作的人員除需具備與組織定量研究直接有關的知識外也是需要知道以上這些知識的。目前一些希望作組織形態定量工作的人所需的資料都分散在各種文獻和專著中。對一個初作定量工作和實驗工作的人來說從廣泛的文獻中收集必要的知識不是沒有困難的。何況有些知識尚很少見之于文獻。因此對這類工作人員來說，最好能有一本比較全面地介紹定量組織學實驗及測量技術的書籍以作引玉之磚。Eränkō (1955) 曾寫過一本類似這樣的書籍。這本書雖不失為一本好書，但嫌過於簡潔，在許多方面不但沒有提及原理而且在組織形態定量技術方面並沒有作全面的介紹，顯然是不能適應于需要的。實際上這本書並不是定量組織學技術的專著；它的另一內容是組織化學的技術，因而論及定量組織技術的篇幅就占得不多，當然就不夠全面。

在我國，定量組織學的工作尚待開展。因而有一本定量組織學實驗和測量技術的導論更屬必要。這是促成我寫這本小冊子的原因之一。另一原因是就作者所知有許多初參加實驗工作的同志在怎樣進行正確動物實驗方面常遇到困難，結果雖花費了許多寶貴時間，所得的結果無幾，有時甚至僅得了一批無實際價值的資

料。对这批同志来说，似乎能有一本或其中一部分比较具体介绍怎样进行实验的引论是属必要的。可是这种书籍目前是不多的。但在具体介绍实验过程时必需有一个主题才不泛空洞。组织学是一般生物学工作者和医学工作者所熟知的学科，而且这学科的应用面也颇为广泛。因此以它来为主题似乎是合宜的。除此而外，在我国科学界中目前似乎有一个偏向，即是非用大型昂贵仪器不能进行有意义的合于时代的工作。这种偏向往往致成了置手边现有优良设备于不顾，反而等待另一些昂贵设备。近年来组织形态定量化的工作（定量组织学），它的技术和它的发展是一个很好的例子说明这种偏向是片面的。定量组织学中主要工具是显微镜和切片机；这些设备，在我国解放后由于党对科学的重视差不多遍地皆是。然而这新兴学科的研究对象是合于现代科学主流的；它的工具和技术在某种意义上来说虽是简单的，但是先进的，深入而现代化的。这是促使我想写这本小册子的又一原因。

计划写这本书的想法虽有三四年之久，但一直未能执笔。今年才算能坐定，在工作的余暇断续的写就了它。这有这样的起因。我曾承诺去一个医学院去作演讲，迫之于形势不得不预备一些讲义。其后生物物理所两位同志希望在组织形态定量化方面进行一些工作，为了使他们能获得较为全面的知识和训练，于是就在已写就的讲稿基础上加以修改，写成了此书。因为原先的讲稿是以医学工作者为对象的，所以在内容方面偏重了动物的材料，仅偶尔提及植物的组织。其实本书的内容许多都适用于植物的。

与定量组织学实验及测量技术有关的知识范围很广。其中有些资料在许多常见的书籍中已有相当详尽的论述。为了避免不必要的重复起见，对这类资料本书仅述其梗概，或对一般书籍讨论不足之处加以补充。这样安排的结果，使本书的章节在篇幅上极不平衡，有些很长，有些则非常之短。考虑本书原属参考性质的，这种篇幅上的不平衡似无伤大体，因此在定稿时就让它停留在这种状态了。原先想在必要的章节末都附上例子，但后来，因其他的原因终于放弃了这种想法。

这类书籍的内容涉及的面相当广，作者知識有限而且写这类书籍的經驗又不足，因此书中錯誤和安排不当的地方定然很多。敬希讀者随时指出，以便有机会时可以更正。但愿这本不十分成熟的小册子在我国科学建設事业中真能起拋砖引玉的作用。

这本书的价值虽然尚待今后的考驗。即使如此，我之所以能写成它肯定是受到以下三个因素之惠的。第一是有一个安定的生活，即使在連續三年的，历史上少有的自然灾害中这种生活也能得到保証。这是与党多年来领导我国人民与国内外剝削者和大自然作斗争的辛勤劳动分不开的。第二是老师們对我多年来教导之力，其中特别是竺可楨，談家楨，貝时璋和陈鴻逵諸教授。第三是年青科学工作者对社会主义建設的热情給与我的鼓励。因此将这一本书，我的第一本篇幅比較大的写作献給他們，以略表我內心的感激。

在本书的书写过程中承蒙許多同志多方面的协助。在脫稿时承友人吳文俊教授审閱了第三部分，吳仲賢和楊紀珂教授审閱了第一和第三部分。又蒙馮文慧、劳为德、薛吉年等同志和倪祖梅大夫抄写了原稿，并提出了許多宝贵意見，对这些同志作者深表感謝。

施 履 吉

一九六三年冬于中国科学院生物学实验中心

引 論

定量組織學是用量來描述組織特性的學問。許多細胞學及組織學的工作僅作質的描述就夠了。可是有許多這類工作僅作質的描述已不足說明問題，還需要作量的記載。近年來實驗細胞學和實驗組織學的日益進展，這種量的描述就變得更为迫切了，這種需要是很容易理解的。首先，目前參加細胞學和組織學工作的科學工作者已不僅限於訓練有素的細胞學者和組織學者。例如許多現代的放射生物學工作者是研究輻射對細胞或組織的形態效应的，而他們的“出身”卻不一定是細胞學者和組織學者甚至不是生物學者。因此以往在細胞學或組織學所用的這一類詞藻象“大的”，“小的”，“粗的”，“細的”，“疏松的”，“致密的”等，已不象以前那樣僅用於訓練有素的細胞學者和組織學者的團體時那樣相對的明確和有意義。在此範圍以外的人員，常各自有其自己的“大的”或“小的”的概念。如果不作量的描述，則在相互交流研究成果方面會日見困難。其次，更为重要的理由是在實驗細胞學和組織學工作中許多形態的變化在質變之前先有量變。在這種情況下，僅作質的觀察常失去重要的資料。在過去的工作中，因為作了量的檢定，掘發出新的資料的事例是不少的。例如眾所周知的白血球分類計數，細胞核-細胞質比率，細胞核體積的頻率分布等。

曾有一些人認為有許多形態上的特征是很難用數量來表示或描述的，這種見解是有其一部分道理的，舉例來說，細胞和組織學結構時常是非常複雜的。用量的描述來表示這類局部區域的繁複性質，在過去技術水平的基礎上，曾一度感到極端的困難。如當我們比較不同處理的同一組織時，只能用這樣的詞句來描述，比如說，這種處理的組織結構比另一種處理的較為疏松或致密，可是，在現代的技术條件下，許多兩種不同處理的組織之“疏松”和致密

度的比較就可以用体积/空間的比率来作量的描述。但就目前情况而言,还有許多細胞学和組織学的特征难以用量的描述来表达。但相信借助于今后的技术发展和新概念的產生,定能逐渐解决这些困难。

定量組織学的工作內容有两个方面。第一是比較組織学的定量部分,例如两种不同生物物种同一組織間异同的研究。第二是实验組織学的定量部分,例如研究某种內分泌素或某种物理因素对某种內分泌腺的影响等。有些研究工作常同时包括这两个方面。因此定量組織学技术也包括了两个內容,即是組織测量技术和实验技术。

定量組織学无疑始于血球的計数工作,由那时到現在已經历了一段漫长的历史。它的测量技术基本上是长度及由其导出的度的显微测量和显微鏡下的計数。在过去定量組織学的发展史中,这些技术都有了长足的进步;但是許多重要进展都大多是近几十年的事。这些进展是由各方面工作者共同努力的結果,除了組織学家本身而外,物理学家,化学家,岩石学家,金属学家,統計学家等都有其貢獻,其中尤其是岩石学家。例如目前定量組織学中有一些仪器原来就是为岩石学家所应用的。它的实验技术同样也是許多領域的科学工作者共同的成就,其实这不仅是定量組織学技术所特有,也是許多現代科学技术所共有的特征:

定量組織测量技术在生物学、医学以及农学中应用甚广。过去学者們应用这种技术曾經获得不少的成果,生物学中的微生物学、內分泌学、胚胎学等文献中,常可发现它們的蹤迹。医学的各部門尤其是病理学的工作中,这种技术应用得更广。在农业研究和农产品的检定中,这些方法也有許多用处。

本书的內容包括有四部分。第一个部分是与定量組織学实验和观察有关的一些基本知識。第二部分是介紹显微鏡下基本測定的。第三部分是論述現代組織形态特性定量測定的。最后一个部分是有关于計算时所需的表格。

目 录

序言	vii
引論	xi
第一部分 与定量組織学实验有关的一些基本知識	1
第一章 数据的基本知識	2
(一) 数据的变异性	2
(二) 数据頻率分布曲綫	4
(三) 定量組織学中重复测量数据的整理和表示法	13
第二章 动物的取样和动物的簡單实验	22
(一) 引言	22
(二) 比較定量組織学工作中的动物	22
(三) 实验定量組織学中簡单的动物实验	24
(四) 兩組测量和計数結果的比較——显著性的檢定	26
(五) 配对的两組实验	34
(六) 多組的实验	36
(七) χ^2 檢定	45
(八) 两个量的相互关系	47
总结	54
第三章 实验后动物处理和标本制备	55
第四章 有关于观察的事項	61
(一) 显微镜	61
(二) 显微镜的机械装置	61
(三) 光学系統	62
(四) 載玻片和盖玻片	70
(五) 照明法	72
第二部分 显微镜下标本的基本測定	78
第五章 显微镜下的长度測量	78
(一) 引言	78
(二) 显微測量标尺的校正	79

(三) 长度测量	88
第 六 章 显微切片标本的常数测定	100
(一) 引言	100
(二) 組織切片厚度的測量	101
第 七 章 面积和“面积乘厚度”的体积測量	109
(一) 引言	109
(二) 面积的測定方法	109
(三) 体积的測量	118
第 八 章 定量組織学的計数技术	120
(一) 引言	120
(二) 悬浮液中細胞及其它組織元素的計数	120
(三) 固体組織元素的勻浆計数	132
第三部分 組織形态特性的定量測定	135
第 九 章 組織的样式分析	135
(一) 引言	135
(二) 組織結構元素相对面积的測定	137
(三) 相对体积和 Delesse 氏原理	161
第 十 章 切片中組織元素的計算	164
(一) 引言	164
(二) 糾正公式及其应用	164
(三) 不用糾正公式的切片計数法	180
第十一章 組織的內表面积和組織結構元素外表面积的測量	182
(一) 引言	182
(二) 組織內表面积測定的原理	183
(三) 結構元素本身体积的表面积測定	186
第十二章 片狀組織平均厚度的測定	195
第十三章 球状元素的平均大小(平均体积)	201
第十四章 組織形态特性測量的运用	207
第四部分 附录表	215
参考文献	248

第一 部 分

与定量組織学实验有关的一些基本知識

在这一部分內我們將介紹与定量組織学有关的基本知識。首先我們介紹一些在定量組織学中常用的簡單統計方法。这些知識是定量組織学工作者起碼應該具备的。即使只作簡單的长度測量，也有許多不能被我們控制的独立因子即所謂偶然因素来影响我們的測量。定量組織学的对象是生物材料。很多多少是独立的因子影响着生物的特性。在生物工作中許多这类偶然因素要比在純粹物理系統工作中更加难以控制，因而随机誤差更为严重。再者，在定量組織工作中，大多数的数据都是用采取样本的方法来获得的、这又更加增加了数据的誤差。以上情况都要求定量組織工作者具有一定的統計知識，使他們在实验工作和数据处理的过程中能作适当的实验設計和有效的数据分析来确定被測定“量”的最近于真实的数值，并能估計出这个数值的可靠程度，以及能根据这些数据作出最可靠的結論。

在介紹統計方法以后，我們就談一些与实验动物有关的事項。这些事項是一切进行动物实验的工作者所应具备的。許多初作实验的工作者尚未对它們作应有的注意，而且目前尚缺少这一类的文献供給他們作参考。其后我們就談一些在定量組織工作中作組織制备和应用显微鏡时应注意的一些事項。

第一章

数据的基本知識

(一) 数据的变異性

定量組織学所得的数据总是参差不齐的一羣数字，其实这并不是定量組織学研究数据所特有的現象，一切定量研究資料都是如此。这种数字参差不齐的現象可以称为数据的变異性。即使是在极其简单的长度測量数据中，这种变異性也是存在的。表 1.1 中所列的資料就是对一个已知长度的綫条作了 51 次測量所得的結果。在生物測量中(定量組織学的測量就是其中的一种)这种数据的变異性尤为显著。这是由于除了測量本身的变異性之外，还加上了生物量本身的变異性。

表 1.1 对一长度測量 51 次所得的數值

測 得 值 x (毫米)	出 現 的 次 数	測 得 值 x (毫米)	出 現 的 次 数
1.01	1	1.07	8
1.02	3	1.08	4
1.03	6	1.09	3
1.04	8	1.10	0
1.05	10	1.11	1
1.06	7	測量总次数	51

在測量物体的某一个量例如物的长度的过程中，虽然尽可能地控制了能影响物体长度測量的因子，但是仍有許多因子是无法控制的，这些因子常是相互独立的，但每一个因子对物体长度、測量仪器和測量工作者的影响并不大，可是多个因子共同作用时就能产生可察觉的作用，而且它們在每次測量时出現的組合常不

相同，結果就造成了多次測量常各不相同的現象。對一個生物單元的某一生物量作多次測量的情況也是如此，例如對一羣細胞（如組織培養的細胞純系）中的一個細胞的直徑作多次測量所得的數值就常常是不一致的。當我們對眾多的生物單元構成的樣本中每一單元各作一次測量時，所得的數據除了測量本身所造成的變異性外，其中還存在着由於生物材料的變異性而產生的數據變異。生物測量如細胞的直徑，常常是受多個遺傳因子所決定的，而各個細胞所具有的遺傳因子的組合又不盡相同（由於遺傳物質的變異性）。這個生物量即在同一培養皿中的細胞純系，即使其內因是同一的，各個細胞所處的環境也不完全相同，這是造成羣體生物量變異性的外因。

許多定量組織測量或計數中，我們不可能將整個生物材料全部都作測量和計數。實際上也沒有這種必要。例如在求得某一個人血液中紅血球的平均直徑大小時，照理說真實的數值應是將此人血液所有的紅血球加以測量之後，求出紅血細胞的平均值。但是這樣做是不可能的，因為以每秒測量四個細胞的速度來計算，就需要一個人每天 24 小時地工作 200 年！何況要將一個活人的全部血液取出來測量也是不可行的！唯一可行的方法是以這個人的血液中取出一定數量的血液作為樣本，測量樣本中的細胞求出它們的平均值來代表這個人全部血液中紅血細胞的平均直徑，即是說從樣本中求出一個數值作為整個羣體的估計值。

在定量組織學的計數工作中已如前述在許多情況下我們只能從樣本中求得一個數值來對一指定整個生物材料或羣體作一估計。這個數值常與整個羣體（或稱理想羣體）的實際值之間存在着一些差異。這是由於測量時的隨機誤差和生物材料中另一種變異性，即空間分布的變異性。例如在計數某一動物的每單位體積血液所含有的紅血細胞數，或每單位體積肝臟中細胞核的數目時，由於各個區域的血液或肝臟組織每單位體積所含有的紅血細胞或細胞核數目常各不相同，因此從取出之樣本中所求得的每單位體積中的數目常與從整個血液或肝臟中所求得者不同。

因为实验所得的数据具有变异性，在处理数据时也就产生了一系列的问题。其中主要的有以下三个。首先是怎样才能概括性地叙述我们所得的一大群的数据资料的问题，因为我们总不能，也没有必要在每次叙述时将上百个数字都说出或写出来，其次就是怎样确定我们所得数据的可靠性，因为在一般情况下被测定的量是未知的，而所测得的数据又是有差异的。最后，当测量两个群体获得了两组数据后，我们既已知道它们各自都有变异，若要将它们进行比较，怎样才能更可靠的判断它们之间是没有差别的、有差别的或者说差别是显著的。对这些问题的统计方法可以帮助我们得到合理的解决。

(二) 数据频率分布曲线

测量或计数的数据虽具有变异性，但是也并不是没有规律可循的。数据的规律性常可以从数据频率分布组织图中看出。所谓频率分布组织图就是以测量所得的各个数值作横坐标而以各个数值出现的频率作纵坐标所作的图。例如图 1.1 就是表 1.1 所列数据资料的频率分布组织图。这种图都是由一系列长方矩形构成的。其中每个矩形底边的中点是从测量或计数所得的数值，而这个边的宽度则比例于数值的单位如 1 微米或一个红血细胞等。长方矩形的高度是比例于每个测量或计数所得数值出现之分数频率的。当测量数据是由许多测量数字构成，或当计数的单位数目极大，同时频率分布组织图横坐标轴的长度又保持不变时，则矩形的

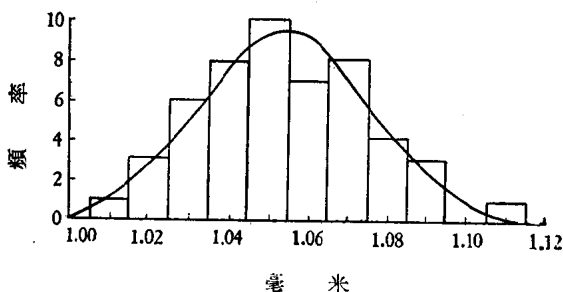


图 1.1 对一长度测量 51 次所得数值的分布

寬度變得非常小。這時頻率分布組織圖的上方成梯階形的外廓就隨之而變成曲綫。這曲綫就稱為頻率分布曲綫。

在定量組織學中所遇到的量有兩種，即是連續量和不連續量。長度或大小一類的量都是連續的量，因為從一單位到另一單位之間有中間數值的存在。例如在 1 微米和 2 微米之間有 1.1, 1.2, 1.3……微米等等數值。計數所得的量是不連續的量，因為在挨近的两个數目間沒有中間值的存在，例如在一個紅血細胞與兩個紅血細胞間（就是在 1 和 2 之間不存在 1.2 或 1.3 個細胞）。連續量構成的頻率分布曲綫稱為連續頻率分布曲綫，反之不連續量構成的頻率分布曲綫則稱為不連續頻率分布曲綫。

根據前人的研究與生物有關之數據的變異規律，主要僅有幾種。就是說主要僅有幾種頻率分布；即正態分布，二項分布和 Poisson 分布。了解這些分布既有助於我們處理既得的數據，且有助於我們正確地設計實驗。我們首先要討論其中最基本的正態分布，然後再討論其他的兩種。

1. 正態分布或常態分布

已經談到過，當對某一個量作多次測量或對多個特定量各作一次測量時，所得到的往往是一羣分布在一定範圍內的分散數值。如果影響這個量的因素是很多的，而且是各自獨立的，則所獲得的分布就將是正態分布或稱高斯分布，它是連續分布的一種。圖 1.1 中所示的曲綫就是一個正態分布曲綫，呈鐘形。表 1.1 中的數據就是屬於這種分布。在實驗數據中所常遇到的分布很多都是正態頻率分布。正態頻率分布曲綫共有兩個特征數值，即是算術平均數值（或簡稱平均數）和標準偏差。如果我們已知數據是正態分布的，則根據這兩個特征數值就可以作出該數據的正態分布曲綫。一組數據是否作正態分布是需要用統計方法加以驗證的。可是在有些情況下往往可以假設一已知的數據是作正態分布的並求出這組數據的算術平均數和標準偏差。這樣的假設往往都是對的，因為正態分布的出現非常頻繁。算術平均數是將一組數據中各個數字

相加的总和，除以数字的个数而求得的。一般都用 $\bar{x}$ 表示算术平均数， x 表示各个测得数值（即是数据中的各个数字）， N 表示数字的个数， Σx 表示各个数字的总和，则

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{N} \quad (1.1)$$

若样本很大时，即是說 N 很大时，有时平均数用 μ 来代表而不用 $\bar{x}$ ， μ 与 $\bar{x}$ 的区别仅是理論上的。 Σ 表示和，以后我們还会談到。

在生物学工作中一般都用算术平均数来代表所测得的一組数据，它是表示数据的集中趋势的。当然，代表数据集中趋势的还有其它数值，例如中数，众数，但都不是生物学一般工作中常用的。

标准偏差是正态頻率分布的第二个特征数值。它是表示一組数据中，数据或观察值围绕平均数而作变异之分散程度的。在統計学中用作指示数据分散程度的数值也有好几种，不过标准偏差和它的平方（称为方差）用得最为广泛。計算数据的标准偏差时需先求出每个测得值与这組数据之平均数的差，然后将这些差的平方值相加得一总和，以测得值的个数相除得到的值即是方差，方差的平方根就是标准偏差，通常用 σ 来代表。即是：

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N}} \quad (1.2)$$

其中 x_i ， $\bar{x}$ ， N 和 Σ 的意义与公式(1.1)同。

当样本很小时，常用 S 来代表标准偏差而不用 σ 。 S 与 σ 的差别以后会談及。

钟形的正态分布曲綫方程式可以有不同的写法；下面的写法是用上述两个特征数值，算术平均数（平均数）和标准偏差 σ 来表示的。

$$y = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\bar{x}}{\sigma}\right)^2} \quad (1.3)$$

式中 y 表示一組数据中各个数字观察值或称 x 的出現頻率。

从方程式(1.3)可知分布曲綫对 $\bar{x}$ 是对称的，亦即是說如果我們將座标軸的原点移至 $\bar{x}$ 的位置时观察值与其平均数 $\bar{x}$ 的偏差有