

- [31] Torrey, J. G. and D. E. Fosket., 1970, *Amer. J. Bot.* 57, 1072-1080.
- [32] Tran, T. V. M., et al., 1976, *Can. J. Bot.* 53, 553-559.
- [33] Trewavas, A. J., 1979, The dynamics of meristem control by growth substances. In "Differentiation and The Control of Development in Plants, pp. 39-56. Ed. George, E. C.
- [34] Vilma Vasil and Indra K. Vasil., 1981, *Bioscience*, 31, 246-248.
- [35] Wachok, Z. S. and Wetherell, D. F., 1972, *Experientia (Basel)*, 28, 104-105.
- [36] Walker, F. A., Poli, C. Yu, Shirley, J., Sato and E. G. Jaworski. 1978., *Amer. J. Bot.* 65, 654-659.
- [37] White, P. R., 1939. *Amer. J. Bot.* 26, 59-64.
- [38] Wright, K. and Northcote, D. H., 1973, *Cell Sci*, 12, 37-53.
- [39] Zee, S-Y, et al., 1978, *Z. Pflanzenphysiol.* 90, 115-163.
- [40] Zeroni, M. and M. A. Hall., 1980, *New Series*, 9, 511-586.

细胞超微结构的立体学定量分析技术进展

戴志强 胥彬

(中国科学院上海药物研究所)

立体学(stereology)是一门既年轻而又古老的方法学科。它起源于二千多年前的天象观察;基本原理是十九世纪法国地质学家Delesse和英国显微镜学家Sorby各自在几何概率论和拓扑学基础上提出的。第一届国际立体学会议(1961)对其命名所下的定义是二维图像的三维解释或二维空间的三维推断^[1,2]。近二十年来,立体学与电子显微术相结合,在冶金、生物、医学等领域的形态定量研究中占据了重要的地位。

随着近代细胞生物学的深入,对细胞超微结构电镜图像的解释已日趋复杂。通常进行的定性观察有一定的局限性,往往伴随程度不一的主观偏差,有时必须结合其它实验手段获得的资料,才能说明问题^[2]。为此,用电子计算机作图像处理的三维重构技术(傅利叶重塑法、连续切片等)相继引入电镜术。但相比之下,立体学定量分析技术更为简便而实用。它不需要昂贵的投资和复杂的运算技术,只要满足若干制样条件,选用适当的测试系统(test systems 见图1),对一定数量的细胞电镜图像所包含的二维信息作点、线、面数学测定,而后按立体

学公式运算,便可用表积、体积、长度、厚度、数量、大小分布等十几种参数来描述有关细胞器的特征^[2-4](部分立体学公式测算举例见图2)。近年来,立体学在细胞超微结构定量研究中获得较广泛的应用^[5-7]。现将其主要进展分述如下:

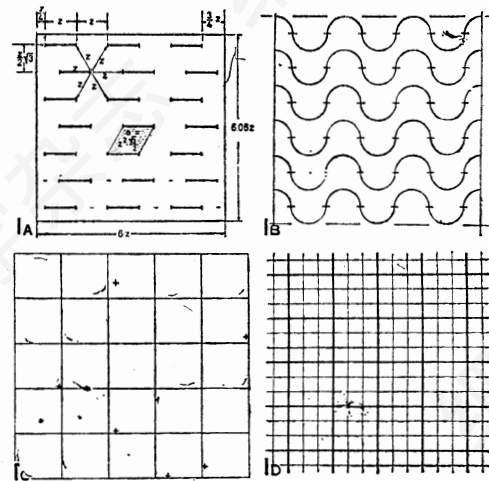


图1 立体学定量分析测试系统

- A. 多用测试系统
- B. 曲线测试系统
- C. 随机点方格测试系统
- D. 双重方格测试系统

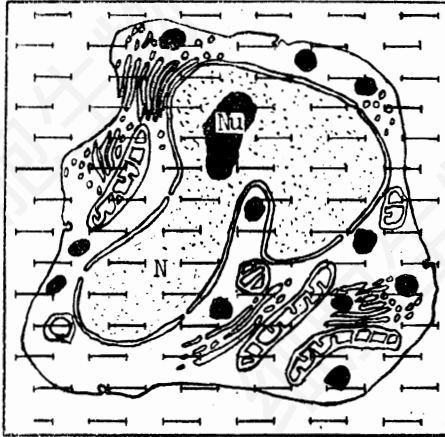


图2 动物细胞超微结构定量分析所用部分立体学公式测算实例

单位核体积所含有的核仁体积: $V_v = P_{Nu}/P_N$
 单位核体积所含有的核膜表面积: $S_v/V_v = 4N_i/ZP_N$
 核膜的平均厚度: $\bar{T} = ZP_N/2N_i$
 其中 P_{Nu} : 落在核仁区内(Nu)的测试线端点数
 P_N : 落在核内(N)的测试线端点数
 (包括击中核膜)
 N_i : 与核膜相交的测试线数
 Z : 测试线长度

实验设计及其效率

1. 最佳取样效率 Weibel(1966)曾探讨了细胞形态立体学定量分析结果的精确度与三级实验样本数(包埋块或切片数 n_1 ; 摄片视野数 n_2 ; 测试点数 n_3)的密切关系。为了减小平均统计差异,以增加 n_1 为优, n_2 次之, n_3 效果最差。但是三者的相对单位综合费用是 0.5:0.3:0.001 弱。因此,较高级别取样数的增加应该根据研究课题的需要,同时考虑到费用的开支问题^[4]。

Sokol 等(1969)提出了某一级 n_i 值(i 为正整数)的最佳选定公式:

$$n_i = (S_i^2 \cdot C_{i-1} / S_{i-1}^2 \cdot C_i)^{1/2} \quad (1)$$

其中 C_i 为各级单位综合费用; S_i 为各级标准差。显然 S_i^2/S_{i-1}^2 项对 n_i 的影响大。当 $i=2$ 时,视野间的差异(S_2)越大或包埋块间的差异(S_1)越小,是决定视野拍摄数 n_1 增大的主要因素。Gundersen(1981)将(1)式用于大鼠肾小球毛细血管基膜厚度的立体学分析时,设计了列

线图解表示法,较为简明^[8]。所得单位实验动物的各级取样最佳数 $n_1:n_2:n_3$ 为 1.2:14:250。

对于实验动物的最佳选用数 n_0 , Shay(1975)作了较详细的论述^[9]。其结果可归纳为下列公式:

$$n_0 = C \cdot S_0^2 / d^2 \quad (2)$$

其中 S_0 为标准差; d 为要求检测的差别; C 值与显著性界限和把握度有关。作者在研究家兔视网膜感觉细胞缺氧、葡萄糖效应的实例中,经过预初试验求得 S_0^2 约 $0.0018 \mu^2$; d 取 0.1μ ; 显著性界限和把握度分别定为 0.05 和 0.90 (从作者所示的倍增表中可查得相关的 C 值是 8.6); 最后按(2)式计算,可得 n_0 的最少选用数为 3。

通过预初试验选定的各级取样最佳比值,能获得一定人力、物力条件下的最经济分配。目前已为立体学工作者所重视,在细胞超微结构各种特征参数 V_v (组分体积/单位参照体积)、 S_v (组分表面积/单位参照体积)、 L_v (组分线度/单位参照体积)、 N_v (组分数量/单位参照体积)等的定量分析中都得到了运用。

2. 测试系统的比较 立体学定量分析的测试系统运用最广的是相干多用测试系统^[2] (coherent multipurpose test system 图 1A)。对于某些各向异性结构切片的电镜图像,采用半圆曲线测试系统(图 1B)有其长处^[10]。当结构显示某种周期性排列时,有人提倡使用随机点方格测试系统(图 1C)。但一般认为,随机列阵统计误差稍大。为此可增加随机点数目以及旋转测试系统与电镜照片的重叠方向,以两次以上的测试平均值为准^[11]。

对于 V_v 、 S_v 等常用特征参数的估算,使用相干双重方格测试系统 (coherent double lattice test system) 最为方便^[12] (图 1D)。方格测试系统单位面积的测试点数可按相对标准误(RSE)的要求及特征参数的预初估计值,根据下列公式

$$P_T = 1 - V_v / (RSE) \cdot V_v \quad (3)$$

求出, P_T 为临界测试点总数,实际使用中,

(3)式所得 P_T 值偏大,可乘上校正常数 0.453^[2]。Burri 等(1968)曾用一个累进平均的图解方法求 P_T 值,但顺序较繁,使用者很少。

由于一个大数总体样本,特征参数的标准误主要取决于各级样本间的差异系数。因而,有些学者对临界测试点的处理比较简单,电镜照片测算 30—100 张;覆盖的测试系统测试点在 100—400 之间^[3]。

Mathieu 等(1981)最近在计算瞪羚膈肌线粒体贫乏区域纤维在全部肌纤维中体积比(V_v)时,使用 $4 \leq P_T \leq 900$ 的不同密度的方格测试系统,发现在同组切片的单位测试时间内,使用 100 点方格测试系统,相对标准误最小,效率最高。特别使人感到有趣的是对于一组可供 Quantimet 720 自动图像分析仪识别的模拟照片,100 点方格测试系统与自动图像分析仪在估算 S_v 和 V_v 时达到了同样的水平^[13]。

3. 特征参数的选择 在细胞膜表面突触、桥粒、微绒毛等结构的形态学研究中,用立体学定量分析方法估算它们在单位参照表面或单位参照体积中的数量及表面积已获得有意义的结果^[14]。有人提出,从结构与功能的相关性出发,对这些特征结构在膜单位表面积中的度量描述优于在组织单位体积中的测算^[15]。但两者未作统计学比较。

Mayhew (1981)新近报告^[16],以志愿者的前臂角质层上皮细胞为实验材料,在取样条件、分析时间及过程相同的情况下,对上皮细胞质膜上的桥粒结构分别估算 N_s (组分数量/单位参照面积)、 N_v 以及 S_s (组分表面积/单位参照面积)、 S_v 四个特征参数,估算效率用差异系数 C_v 和相对标准误 RSE 作比较: N_s 与 N_v 的 C_v 值分别为 25.3% 及 39.4%; RSE 值分别为 0.040 及 0.062。而 S_s 与 S_v 的 C_v 值分别为 29.1% 及 41.8%; RSE 值分别为 0.045 及 0.065。从而证明在研究桥粒结构时,一个表面上的组分密度估算明显较在体积中的组分密度估算效率高。当 N_v 和 S_v 要达到与 N_s 及 S_s 同样 RSE 值时,测算的电镜照片应分别增

加 2.4 倍及 2 倍。

Mayhew 的工作并没有采用最佳取样,但整个实验中只以参照体系为影响效率的唯一相对因素,所以实验结果还是富有指导意义的。已有人在田鼠颊囊上皮细胞半桥粒的定量分析和其它实验中得到了同样的结论。

系统误差来源探讨

1. 切片厚度的影响 严格地说,只有当切片厚度无限小时,估算特征结构体积密度(V_v)和表面积密度(S_v)的立体学公式才能成立^[2]。当被研究细胞器的平均直径的 $1/12$ 小于切片厚度时,应考虑霍姆效应(Holmes effect)的影响,对测算结果要作误差校正^[3]。这类系统误差往往导致正向偏差;在同样的切片厚度下,还与研究对象的形状、大小有关。校正因子可根据细胞器的形状、排列,从模拟结构推算出^[17]。

实际选用的超薄切片,切片干涉色控制在灰白至金色之间,尽可能地保持切片厚度均匀不变。为此有人专门设计了测量切片厚度的干涉显微镜。由此而引起的误差一般都很小,因而可不作校正,特别是作相对比较实验时。

近年 Ohno (1980)提出了不同的见解^[18]。他用大鼠肾脏组织超薄切片环氧树脂再包埋、垂直方向重新切片方法验算了超薄切片的实际厚度。结果发现,在操作条件完全一致的情况下,即使超薄切片的干涉色相同,实际切片厚度并不一致。切片越薄,相对误差越大;当切片为 500 埃时,相对误差达 42%。此外,他还以实验证明球形细胞器的尺寸分布定量分析采用厚切片在高压电镜下检测,较采用超薄切片结果更为精确,而且不需要作复杂的校正。理论上,此方法也为某些立体学公式所支持。

目前有关细胞超微结构立体学定量分析的文献,还是普遍采用超薄切片的制样标准^[6-7]。然而,随着高压电镜的逐渐普及,Ohno 的与众不同的论点将会引起不同的反映。

2. 放大倍数的校正 作立体学定量分析

的电镜照片, 实际放大倍数常用光栅复型等标准样品作校正; 考虑到电镜成像的畸变效应, 取中心与四周的平均值为准^[3]。全部切片可在一个固定的放大倍数下摄取视野。不同放大倍数的选用与系统误差的关系是以往许多专著所忽视的^[1-3]。

自1976年以来, 在文献中^[19], 不同作者估算大鼠肝细胞膜以及内质网和线粒体内、外膜的表面积密度明显不同⁽²⁰⁾, 最大相差三倍。其解释也不一, 不同动物种系、年龄、营养状况, 以及组织处理、实验室习惯等都是不可忽视的因素。Bolender(1978)^[21]在Keller等(1976)发现光镜分辨力提高引起肺泡表面积也随之增大的工作基础上, 提出了新假设, 认为不同作者的实验室采用了不同的放大倍数可能是最重要的原由。而后, Paumgartner(1981)^[22]引用了分数维度(fractal dimension)的概念, 论证了因放大倍数不同引起的估算误差。当放大倍数增大时, 标尺测量长度单位相应变小, 对电镜图像上膜轨迹(曲线)所作的测量精度就提高, 相应的估算值就增大(图3)。当放大倍数超过了130,000倍时, 估算值不再有明显增加, 此放大倍数称为临界放大倍数。在任一放大倍数下的测算值均可经分辨力校正至临界放

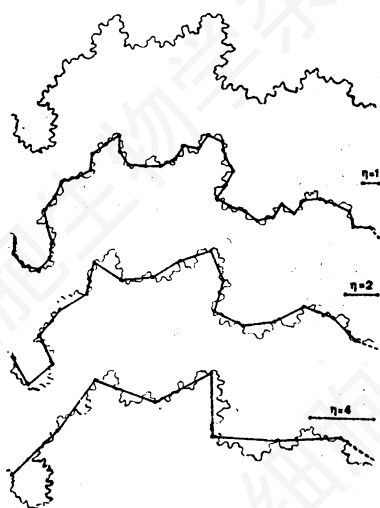


图3 不同标尺长度 η 对曲线长度的近似测量

大倍数下的测算值, 校正因子可用不同放大倍数下的预初估算值作图求出。分数维度解释的提出, 为细胞超微结构立体学定量分析避免出现较大系统误差提供了有效途径。

细胞空间结构(spatial organization)分析

1. 不同细胞器非随机相对定位 立体学定量分析技术首先是在材料科学领域用于研究不同特征结构的空问关系。由于细胞器的相对位置与材料结构不同, 对于两个亚细胞结构空问关系的定量分析需要作特殊的考虑^[23]。近年, Hemon等(1981)^[24]在检测某个细胞器在细胞切片的一定区域内(或膜切割线上)的非随机出现位置有所突破。其解析的途径是将该细胞器和一特定参照点(区域质心、最近点等)之间的距离换算为相关的两个区域面积比(见图4), 而后将比值的统计分布与各特定分布作比较。作者曾以浆母细胞为例, 估测到核仁在近核中心出现机率显著超过在整个核内随机分布的机率; 而中心体则倾向于在核附近出现。从而用定量分析的数据证实和支持了前人的定性观察结果。该方法的独到之处, 是对细

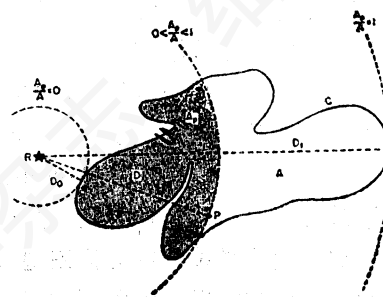


图4 直线距离(D)换算成两个相关区域的面积比(A_P/A)^[24]

图中R是特定参照点; P为细胞器在C区域(面积A)中的出现位置; A_P 是以R为圆心, RP为半径的圆弧与C相交而分割的面积(阴影部分)。当 $A_P/A \rightarrow 0$ 时, P点位置靠近R; 当 $A_P/A \rightarrow 1$ 时, P点位置则远离R。把 A_P/A 的统计平均值与0.5作t检验, 即可确定P、R间是否呈非随机相对定位。

胞切片的大小、形态的不均匀性不作限制而仍能保持结果的正确性。需要注意的是二维切片中的偏向分布有时不能直接延伸到三维结构。上述提到的中心体倾向分布中,靠近细胞核的中心体较远离核的中心体容易被切到的因素,应在二维测算结果作三维推断时予以谨慎的考虑。

2. 相同细胞器的群集分析 (cluster analysis) 群集分析较早就在生态领域得到应用。而后,也见有少数光镜水平的生物材料分析报告。七十年代有人在冰冻断裂材料上进行了群集分析,借以探讨核孔在核膜上的分布规律^[25]。1979年 Baudhuin 等^[26]采用了 Berthet 等(1976)提出的二维图像群集分析的分级分配法 (division method of classification) 首次将立体学方法用于电镜水平的细胞超薄切片结构的群集研究。在解析过程中引进了平均自由程 (mean free distance) 函数,根据其斜率变化确定实际群集数;对研究的细胞器群集作了圆凸形假设,为较多细胞器的研究所适用。作者分析了培养肝癌细胞有丝分裂末期及 S 期溶酶体的群集分布情况。结果是有丝分裂细胞中溶酶体占整个细胞的 3.7% 体积;每个集组的平均数为 13 个。而在 S 期,溶酶体体积为整个细胞的 5.7%;集组平均溶酶体是 6 个,获得了肝癌细胞超微结构特征和分化规律的部分定量资料。实际测算时,还采用了 Fortron IV 语言编排顺序,由微型计算机运算输出结果。

细胞超微结构研究从定性到定量是一个质的飞跃。目前,立体学技术在动物细胞及植物细胞的超微结构研究中已成为主要的定量手段之一。它是一个值得注意的发展方向。它的发展也推动了各种图像分析仪的运用。但后者对较复杂的生物电镜图像往往无能为力,还不能完全代替人力的测算^[2,13]。可以预料,随着立体学定量分析技术的不断完善,它在电子显微术中的地位将日益突出,在细胞生物学定量研究以及细胞超微结构变化机理的定量探索中将发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Elias, H. et al., 1971, *Physiol. Rew.*, 51: 159.
- [2] Weibel, E. R. et al., 1973, In "Principles and techniques of microscopy" (M. A. Hayat ed.), 3:239-283. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- [3] Williams, M. A., 1971, In "Practical methods in electron microscopy" (E. A. Glauret ed.), 6(2):6-80. Horth-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- [4] Weibel, E. R. et al., 1966, *J. Cell Biol.*, 30:23-37.
- [5] 王祖武、戴志强、胥彬, 1979, *生物化学与生物物理学报*, 11(1):73-78.
- [6] 钟慈声、陈细法、俞永富、陈启明, 1980, *中华物理医学杂志*, 2(4):223-225.
- [7] Mori, H. et al., 1980, *J. Electron Microsc.*, 8:21.
- [8] Gundersen, H. J. G. et al., 1981, *J. Microsc.*, 121(1):65-73.
- [9] Shay, J., 1975, *Amer. J. Path.*, 81:501-511.
- [10] Merz, W. A., 1968, *Mikroskopie.*, 22: 132-142.
- [11] Williams, M.A., 1968, IN "Advances in optical and electron microscopy" (R. Baret ed.), 3:219. Academic Press, London.
- [12] Weibel, E. R., 1969, *Int. Rew. Cytol.*, 26:235.
- [13] Mathieu Odile. et al., 1981, *J. Microsc.*, 121(1):75-88.
- [14] Mayhew, T. M., 1979, *J. Anat.*, 129:95-105.
- [15] Kaiserman-Abramot, I. R. et al., 1972, *Brain Res.*, 43:527-544.
- [16] Mayhew, T. M., 1981, *J. Microsc.*, 122 (1):7-14.
- [17] Weibel, E. R. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77:584-597.
- [18] Ohno, S., 1980, *J. Electron Microsc.*, 29 (3):230-235.
- [19] Reith, A. et al., 1976, In "Critical review in toxicology" (L. Goldberg ed.), 4:219-269.
- [20] Weibel, E. R. et al., 1969, *J. Cell Biol.*, 42:68-90.
- [21] Bolender, R.P. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77:565-581.

- [22] Paumgartner, D. et al., 1981, *J. Microsc.*, 121(1):51-63.
- [23] Cruz-Orive, L. M., 1976, *J. Microsc.*, 107:1-18.
- [24] Hemon, D. et al., 1981, *J. Microsc.*, 121(1):29-37.
- [25] Markovics, J. et al., 1974, *Exp. Cell Res.*, 85:443-451.
- [26] Baudhuin, P. et al., 1979, *J. Microsc.*, 115(1):1-17.

免疫应答调节中独特型的专一性抑制及其抑制性细胞*

季永楠

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

抗原与免疫系统接触,能选择性地与相应淋巴细胞结合,并引起淋巴细胞克隆增殖和分化,产生抗体(体液免疫)或形成致敏淋巴细胞(细胞免疫),从而表达免疫系统的效应功能。这就是克隆选择学说的主要含义,也就是所谓免疫应答。

抗原与淋巴细胞的识别结构—受体—结合,引起的淋巴细胞增殖和分化必定受某些机制的调节控制,这样才能保持生物体的免疫自稳状态,否则在抗原刺激后,生物体必将为增殖的淋巴细胞和它们的产物所淹没。免疫系统具有双重性,如T、B淋巴细胞的功能部分是协同的,部分是对抗的;淋巴细胞识别抗原的应答可以是正的,也可以是负的;抗体分子和淋巴细胞受体可以识别抗原,也可以被其它抗体分子和淋巴细胞受体所识别;抗体分子和受体的结构又为细胞的基因所编码。因此免疫系统的功能要受到基因、细胞、体液等不同水平以及各水平之间的相互作用的极其复杂的调节控制。

本文就免疫应答中,抗体和淋巴细胞抗原受体的独特型决定簇(idiotypic determinant)在调节中的作用及其与抑制性细胞的关系,简略综述于下。

独特型决定簇和网络学说

约20年前,Kunkel等、Oudin和Michel描述了抗体的独特型(Id)。Id是指抗体分

子所具有的特异的抗原决定簇,也就是生物个体中各别抗体分子所具有的独特决定簇。虽然某些克隆抗体具有相同的抗体活性,即它们都识别同一抗原,但在不同克隆的抗体之间,它们的Id决定簇不一定是相同的。一般来说,一个生物个体针对某一抗原的抗体,就其Id来说是不均一的。因此,即使在同一品系的不同个体间,甚至同一个体的抗体的Id不尽相同。但是,在某些特殊的抗原实验系统中,同一品系不同个体的抗体或部分抗体具有相同或相似的Id决定簇,这类决定簇称为交叉反应性Id(cross reactive idio type, CRI)决定簇。Id决定簇具有免疫原性,可以引起异种动物、同种动物或自身产生相应的抗体,称为抗独特型抗体(抗Id抗体)。十多年来,人们利用抗Id抗体,对抗体分子的Id决定簇的免疫化学、分子结构与Id专一性的关系、抗体的Id表达及其多样性、抗体可变区的遗传控制、淋巴细胞表面Id决定簇等方面做了不少工作。现在人

* 本文承叶敏同志审阅,谨致谢意。

名词缩写: Id = 独特型; CRI = 交叉反应性独特型; 抗Id抗体 = 抗独特型抗体; Id⁺-抗体 = 具有某一Id决定簇的抗体; Id⁻-抗体 = 不具有某一Id决定簇的抗体; Id⁺-细胞 = 受体具有某一Id决定簇的细胞; Id⁻-细胞 = 受体不具有某一Id决定簇的细胞; 抗Id⁻细胞 = 具有能与某一Id决定簇结合的受体的细胞; Ar = 偶氮苯磺酸盐,一种半抗原; Ar~细胞 = 偶联Ar的细胞; Id⁺~细胞 = 偶联Id⁺抗体的细胞。