

色素痣三维结构的实现与研究

马慧军¹⁾ 赵广²⁾ 孟如松²⁾ 姜志国³⁾

1) 第四军医大学99 硕士队, 陕西西安 710032

2) 空军总医院皮肤科, 北京 100036

3) 北京航空航天大学图象中心, 北京 100083

摘要: 对临床已确诊的 2 例皮内痣进行连续切片, 痣细胞和基底膜的表达分别采用 S-100 多克隆抗体和 IV 型胶原单克隆抗体 LAB-SA 免疫组化染色法。采用显微图像自动拼接技术显示皮内痣组织的全貌结构。结合三维可视化及测量系统软件, 以体素重建法, 结合插值拟合与光照处理技术, 对手术切除的皮内痣进行三维重建, 旨在真实反映基底膜和痣细胞的立体形态、空间位置和相互毗邻关系。对临床色素痣的教学和治疗提出新的方法和思路。

关键词: 色素痣; 三维重建; 免疫组化

ISSN 文章编号: 1004-4140 (2002) 01-0026-04

中图分类号: R758.5⁺1 TP391.41

文章标识码: A

Achievement and Study of Three-Dimensional Structure to Pigmented Nevus

MA Huijun¹⁾, ZHAO Guang²⁾, MENG Rusong²⁾ and JIANG Zhiguo³⁾

1) 99 Postgraduate department of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

2) Dermatology department of Airforce General Hospital, Beijing 100036

3) Image center of Beijing Aviation and Spaceflight University Beijing 100083

Abstract: Taken from 2 paraffin embedded tissues, pigmented nevi were cut into serial histologic sections. The expression of nevus cell and basement membrane were respectively applied by S-100 and IV collagen antibody with LAB-SA immunohistochemical technique. Information was inputted into computer after the processes of spelling and recognizing. By the technique of reconstruction, the 3D stereo pigmented nevus models were retrieved from 2D digital data. Maybe it will provide a new method and thought for teaching and therapy to pigmented nevus.

Key words: Pigmented nevus; 3D reconstruction; Immunohistochemistry

1 引言

色素痣是一种常见的良性皮肤肿瘤, 其细胞巢有完整的基底膜包绕, 自七十年代中期, 人们利用各种染色方法在形态学水平对色素痣中基底膜的分布特点进行了研究, 并在超微结构水平进行了三维重建, 从而认为无论哪种类型色素痣, 其痣细胞巢周围均有较连续的基底膜包绕, 即仍位于表皮内, 并没有真正突入真皮^[1]。提出色素痣是一种表皮内结构, 基底膜在色素痣的发展中起双重的调节作用, 其完整性与日后色素痣的恶变相关的理论^[2,3]。由于受当时技术和方法的限制, 并没有得到直观的色素痣三维图像, 仅获得一模式图。其理论的可靠性值得商榷, 后来的学者也没能进一步证实此结论。

随着计算机技术的突飞猛进, 科学计算可视化 (Visualization in Scientific Computing) 已成为当前计算机学科的一个重要方向。直观地讲, 科学计算可视化是研究如何把科学数据转换成可视的、便于理解的信息计算方法。体视化 (Volume Visualization) 是科学可视化的一个重要分支, 它研究体数据 (Volume Data) 的可视化问题^[4]。三维可视化系统的研究工作是近年来计算机界中最引人注目、发展最快的领域之一。目前三维可视化及测量系统的研究走向实用, 随着微型计算机图像技术的迅猛发展, 在微机的 Windows 或 NT 平台上开发三维可视化软件已经成为可能^[5]。

基于计算机上进行三维重建技术的可行性, 本文对手术切除的完整色素痣进行连续组织切片,

S-100 蛋白和 IV 型胶原常规免疫组化染色。并获得色素痣序列切片完整二维断面图。应用计算机三维可视化及测量系统软件重建色素痣的三维结构。进一步探讨痣细胞和基底膜的空间关系, 以期对临床色素痣的治疗和教学提出新的思路和方法。

2 色素痣切片图像的三维重建

2.1 研究对象:

我院门诊手术切除的较完整的先天性色素痣 2 例。标本用 10% 福尔马林固定, 常规脱水, 浸蜡、石蜡包埋。连续病理切片, 切片厚度 $6\mu\text{m}$, 每间隔 $30\mu\text{m}$ 保留一张切片, 并按相同方向捞片, 按顺序进行编号。后经苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin HE) 染色证实均为皮内痣。例 1, 男性, 57 岁, 取材部位: 右侧腰部; 例 2, 女性, 45 岁, 取材部位: 左鼻侧。

2.2 材料

2.2.1 仪器

OLYMPUS (BX50) 三目显微镜配有自动拼图软硬件装置 (北京普利生公司和清华大学共同研制); Photoshop6.0 图像处理软件; 北航医学图象分析与三维图像可视化系统 CMIAS2000 型; 主机: Pentium IV 1.2G, 内存 768M, Windows98 操作平台。

2.2.2 试剂

LAB-SA 免疫组化染色常规试剂; 鼠抗人 IV 型胶原单克隆抗体; 兔抗人 S-100 蛋白多克隆抗体双染试剂盒 (以上产品均为美国 Zymed 公司生产, 中山生物技术有限公司提供)。

3 三维体数据的获取

3.1 切片图像数字化

切片采用 LAB-SA 免疫组化染色法。IV 型胶原单抗 (即用型) 于 4°C 冰箱内过夜, AEC 显色, S-100 蛋白多抗 (即用型) 37°C 恒温孵育 60 分钟, BCIP/NBT 显色, 苏木精复染。用 PBS 代替一抗做阴性对照, 用正常皮肤组织做基底膜阳性对照。IV 型胶原在交界区和痣细胞巢周围及内部显示线状分布紫红色颗粒, S-100 蛋白在痣细胞膜显示兰紫色颗粒。对染色后的切片在自动显微镜下拼接采集每张组织切片的全貌二维图像 (图像分辨率为 2953×1772); 考虑到图像数据量过大三维重建难以顺利进行, 将图像按比例缩小 (分辨率为 1024×768); 并在原全貌图相同位置剪切局部图 (分辨率为 488×488), 均以 BMP 的格式按顺序存储。

3.2 序列切片图像的层间配准

由于制片和图像采集等原因, 序列数字切片图像的每层间都会存在错位现象, 即旋转和平移等变形。要建成三维体数据, 首先就要对上下两层切片图像进行配准。本文采用内定位法, 应用 Photoshop6.0 软件, 首先在大体重建的切片中寻找两层间的定位点, 然后将下一层切片图像拷贝到上一切片图像的新建图层中并使之透明化 (透明度 40% 左右), 将新建图层的图像进行调整直到与上一切片的图像基本吻合, 保存新建图层的图像, 重复上述步骤实现下一切片的配准。

3.3 图像兴趣区分割:

在经过灰度转换和图像配准后的图像上, 对拟重建的结构进行边界提取和图像分割。对拟重建的基底膜和痣细胞分别采用兰色和绿色图形体分割, 保存三维重建后所需的图像信息, 舍弃无关的图像信息。

3.4 序列切片图像层间插值: 为便于直接做体视显示, 需要对间距较大的切片图像间进行插值处理, 以得到沿 x, y, z 各方向均等间距的体数据。

4 结果与讨论

4.1 色素痣的二维图像: HE 染色显示为皮内痣 (图 1)。免疫组化染色提示皮内痣中交界区基底膜完

整,真皮内痣细胞巢周围有连续的基底膜样物质包绕,单个痣细胞周围也有类似结构(图2)。

4.2 色素痣三维重建全貌效果: 痣细胞巢周围及内部均有基底膜物质,且未见与表皮交界区基底膜相融合(图3-4)。

4.3 色素痣三维重建局部效果: 痣细胞巢周边及内部痣细胞被大量的基底膜包绕,未见基底膜与交界区基底膜相融合(图5-6)。

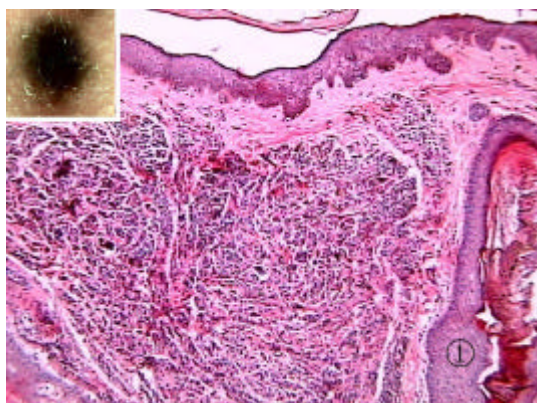


图1 真皮内痣细胞成巢分布,真表皮交界区未见痣细胞 病理诊断为皮内痣 H·E ×10
左上图为本例色素痣的大体照片 ×2

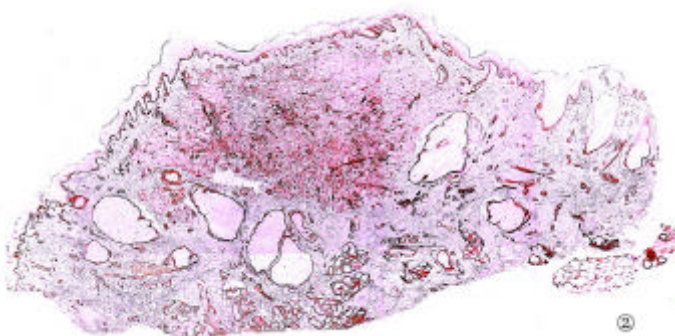


图2 免疫组化 S-100、IV型胶原染色显微镜自动拼接显示,色素痣组织结构全貌二维断面图 ×10

4.4 讨论: 传统上将色素痣分为皮内痣、交界痣和混合痣。但八十年代后期 LEA 从超微结构观察和超微结构的三维重建以及基底膜成份等方面对色素痣做了大量的研究,认为无论哪种类型的色素痣均是一种表皮内结构,看似与表皮无关的痣细胞巢周围的基底膜,在连续切片上最终都要与交界区的基底膜融合^[1, 2, 6]。但由于受当时技术和方法的限制未能获得直观的组织三维图像,不能对其理论有一个直观的解释。当前,随着计算机技术的不断发展,医学图像可视化技术日臻完善,在微机上进行三维重建已成为不争的事实。组织切片的图像三维重建难点在于解决组织切片二维图像的全貌显示、切片层间配准、切片变形、各个切片间均匀数字化采集等问题。本文较好地解决了以上问题,采用直接体视重建显示方法和组织序列切片二维全貌图像自动拼接技术,实现了色素痣免疫组化序列切片图像的可视化,得到较为满意的色素痣三维图像。无论对教学还是在临床中都将带来一种新的思路和方法。本实验中两例皮内痣均未显示与表皮融合的倾向,不支持 LEA 的理论。

近年来发展的显微 CT 微米级成像,将为本文的研究,提出佐证的内容,并为某些部位的色素痣结构,给出三维显示。另外,色素痣的治疗一直是困扰临床医生的一个问题,有人研究认为基底膜的完整性与色素痣的恶变相关,即痣细胞周围基底膜较完整(从图中看到)的不易恶变,反之易恶变。本实验两例皮内痣痣细胞周围均有较完整的基底膜包绕,这与临床上认为皮内痣不易恶变的理论相一致。本实验未对交界痣和混合痣进行三维重建故还不能完全推翻 LEA 的理论,基底膜

的完整性与色素痣恶变相关观点也有待于应用上述技术得到进一步证实。

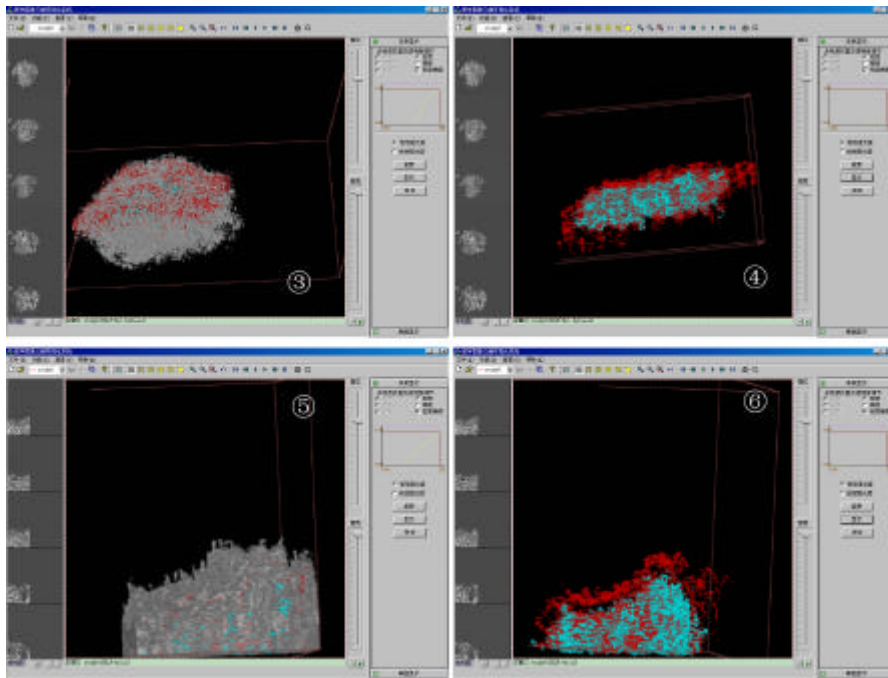


图3 三维重建组织全貌图侧面观（在原图像分辨率为 1024×768 的基础上，经抽检后分辨率为 400×213 的图像）红色为基底膜，绿色为痣细胞

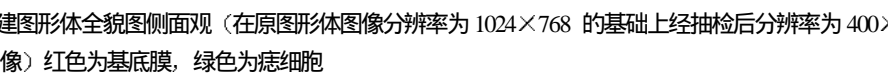


图4 三维重建组织全貌图侧面观（在原图像分辨率为 1024×768 的基础上经抽检后分辨率为 400×213 的图像）红色为基底膜，绿色为痣细胞

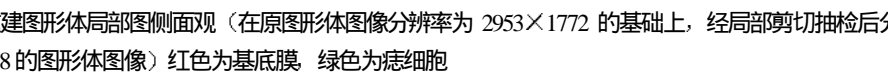


图5 三维重建组织局部图侧面观（在原图像分辨率为 2953×1772 的基础上，经局部剪切抽检后分辨率为 488×488 的图像）红色为基底膜，绿色为痣细胞



图6 三维重建组织局部图侧面观（在原图像分辨率为 2953×1772 的基础上，经局部剪切抽检后分辨率为 488×488 的图像）红色为基底膜，绿色为痣细胞

参 考 文 献

- [1].Lea PJ, Pawlowski A. Human melanocytic naevi. I. Electron microscopy and 3-dimensional computer reconstruction of naevi and basement membrane zone from ultathin serial section. Acta Derm Venereol Suppl Stockh, 1986; 127: 5-15
- [2].Lea PJ, Pawlowski A Human melanocytic naevi.II Depth of intradermal protrusion;comparative measurements of the basement membrane zone and diameters of intracellular microfibrils usinga micromputer analysis system. Acta Derm Venereo(stockh)1986:suppl.127:17-21
- [3].Natali PG, Nicotra MR, Citro G et al.Expression of glutathione transferse pi in benign and malignant lesions of the melanocytic lineage.Melanoma Res 1992;2(4),219-223
- [4].石教英等，科学计算可视化算法与系统，科学出版社，1996
- [5].姜志国 孟如松等，组织切片图像的可视化技术及应用，《第九届中国体视学与图像分析学术会议论文集》，中国体视学会，2001，9，32-39
- [6] Lea PJ,Pawlowski A.Human melanocytic naevi.III.Immunofluorescence and immunoelectron microscopy of the basement membrane zone.Acta Derm Venereol(stockh)1986;Suppl,127:23-30

作者简介：马慧军（1973—）男，回族，山西长治人，在读硕士生，医师，研究方向：色素性疾病。