

虚拟切片扫描系统在生物医学领域的应用

尹伟

(浙江大学医学院公共技术平台, 浙江杭州 310058)

摘要: 随着生命科学研究的深入发展, 对高通量、大面积、大视野样品的分析越来越需要。玻片扫描系统是利用全自动显微镜扫描系统, 结合虚拟切片软件, 把传统切片进行扫描、无缝拼接, 生成一整张全视野的数字切片。为促进虚拟切片扫描类大型仪器给教学和科研工作提供更好的共享服务, 通过介绍 OLYMPUS VS120 虚拟数字切片扫描系统的硬件配置、成像特点和软件功能, 结合具体使用实例探讨该仪器在组织病理学、神经生物学、发育生物学等研究领域尤其大视野拼图的重要应用。总结仪器使用过程中遇到的问题, 分析造成的原因, 提出解决方案, 为数字切片扫描系统的共享使用提供了借鉴和参考。

关键词: VS120; 虚拟切片扫描系统; 大视野拼图;

中图分类号: Q 334

文献标识码: A

Application of virtual section scanning system in biomedicine

Yin Wei

(Zhejiang university school of medicine, Zhejiang university, Hangzhou)

Abstract: With the further development of life science research, the analysis of large-flux, large-area and large-field samples is increasingly needed. The slide scanning system uses a fully automatic microscope scanning system, combined with a virtual slicing software, to scan and seamlessly splicing traditional slices to generate a full-field digital slice. In order to promote virtual slice scanning instruments to provide better sharing services for teaching and scientific research, the hardware configuration, imaging characteristics and software functions of OLYMPUS VS120 virtual digital slice scanning system were introduced, and its application in the large-Image Stitching in the fields of histopathology, neurobiology and developmental biology was discussed with practical examples. Summarize the problems encountered during the use of the instrument, analyze the causes, and propose solutions, and provide reference for the shared use of the digital slice scanning system.

Keywords: VS120; Virtual section scanning system; Large Image Stitching;

1 引言

目前,图像拼接技术在现代医学研究领域发挥了巨大的作用,由于组织切片或者活体动物较大,使用高倍物镜时分辨率高,但视野狭窄,低倍物镜相对视野大,但分辨率低,只能观察样本局部,很难了解整体。而利用图像拼接技术,可获取一个高分辨率的完整组织图貌。激光共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope,简称 CLSM)的拼接功能解决了在高放大倍数下,在单帧显微图像中无法获取所观测对象全貌的问题。2008年,曾毅波^[1]等将激光共聚焦显微镜技术应用于微机电系统中,在悬臂梁的形貌分析中获得清晰的三维图像,运用拼接功能获得 $384\text{ um}\times 288\text{ um}$ 的视场面积。2009年,Paul M.Kulesa^[2]等结合拼图技术,在8个视野中利用共聚焦技术和双光子技术进行光活化和多点扫描,提供了一种更有效率,减少侵入性的技术来跟踪斑马鱼细胞的运动,但是这些传统方法耗用的时间较长。随着细胞生物学、神经生物学和发育生物学等学科的发展,对大视野拼图的成像速度提出了越来越高的要求。

虚拟切片(Virtual slides)又叫数字切片(digital slides),是利用计算机结合显微镜摄影技术,将一张传统的组织切片转化为全视野的数字化虚拟切片,并保持完整性和真实性^[3-4]。虚拟切片技术应用广泛,可应用于常规 HE 染色、特殊染色、荧光染色的组织切片。VS120 是奥林巴斯为全视野大面积扫描和高分辨率图像采集专门设计推出的数字切片扫描系统,可用于明场和荧光观察,能满足快速大视野无缝拼接和高分辨率细节成像,是组织病理学、神经生物学、发育生物学等众多学科都需要的重要工具,能大大提高荧光成像的质量和速度,存储方便检索迅速,随意选择放大倍率,实现精确的图像处理和分析,从而提高了研究人员的工作效率。对 VS120 虚拟数字切片扫描系统的硬件配置和软件功能进行详细介绍,结合具体使用实例探讨该仪器的重要应用。由于该仪器实行校内外共享服务,是浙江大学医学院公共技术平台中使用频率较高的仪器之一,在管理和维护方面需要达到更高的标准。总结使用过程中遇到的常见问题,分析造成的原因,并提出对策,以期为数字切片扫描系统的共享使用提供重要借鉴和参考。

2 配置参数及成像特点

2.1 相机

采用 2/3 英寸 500 万像素彩色高分辨率 CCD(相机, Charge Coupled Device,简称 CCD)成像,色彩还原性优异。

2.2 显微镜

研究级 BX61 显微镜，高精度电动载物台，可实现全视野样品的自动化精确无缝图像拼接，复眼透镜呈现更均匀明亮的荧光。标配有 2 倍、10 倍、20 倍和 40 倍四款尖端物镜，并有 60X、100X 多款油镜可供选择。

2.3 滤色片

配置高速荧光激发及吸收滤色片转轮 8 孔位，最多可进行 13 通道成像，切换时间约 58 ms，每一通道可单独调整曝光时间和 Z 轴焦平面位置，保证最佳焦平面激发。

2.4 切片加载系统

VS120-S6-W 切片加载系统允许手动加载 1 至 6 片标准切片。为了高通量研究和病理学，VS120-L100-W 系统配有一个高度可靠、强劲的，可装载高达 100 张切片的装载系统。

2.5 软件

软件具有注释、测量、景深扩展、XYZ 三维序列扫描、不同倍率图层扫描、Zoom 时标尺自动改变等多种功能。直观人性化的软件界面可以高效地控制全电动显微镜，完成自动聚焦和图像采集设置。有多种扫描模式可供选择，如简单的快速扫描和全程控制的专家扫描。多通道荧光图像采集可以自动叠加，并轻松查看任意通道的图像。

2.6 成像特点

Smart Scan 扫描方式，明场成像，自动聚焦“地形图”，智能化的“边缘侦查”，透射光成像，平滑无缝隙图像拼接、优异的自动和半自动对焦功能。

3 VS120 在组织病理学、神经生物学、发育生物学等生物医学领域的应用

VS120 可以在两分钟内快速扫描完一张切片，创建一个数字“虚拟切片”，由于能数字化分享实验室、教室里的切片，VS120 成为研究、疾病诊断等远程会诊、病理、切片资料归档、课堂教学数据共享方面应用的完美之选，在组织病理学、神经生物学、发育生物学^[5-11]等研究领域得到广泛应用。R Tyagi^[12]，Wang^[13] 等将 VS120 应用于神经科学研究，绘制了全脑神经地图，K Ohara^[14] 等将 VS120 应用于肿瘤方法学，研究一种多重注射针对胰腺肿瘤药物分布的改善。在实际应用中，VS120 日均预约量达 8 小时以上，服务医学院内外 100 余个课题组，样本量大，处于供不应求的状态，列举几个具体案例并就感兴趣区域进行细节放大，包括样本类型、拍摄条件、拍摄参数等，拍摄图片如下：

3.1 样本类型：神经荧光脑片

拍摄条件：FL（荧光，Fluorescence，简称 FL） Red – 20 ms，FL Green – 158 ms，FL Blue

-42 ms; 10X物镜, 图像大小: 10 mm×7 mm, 拍摄时间:47 s; 具体效果见下图1。

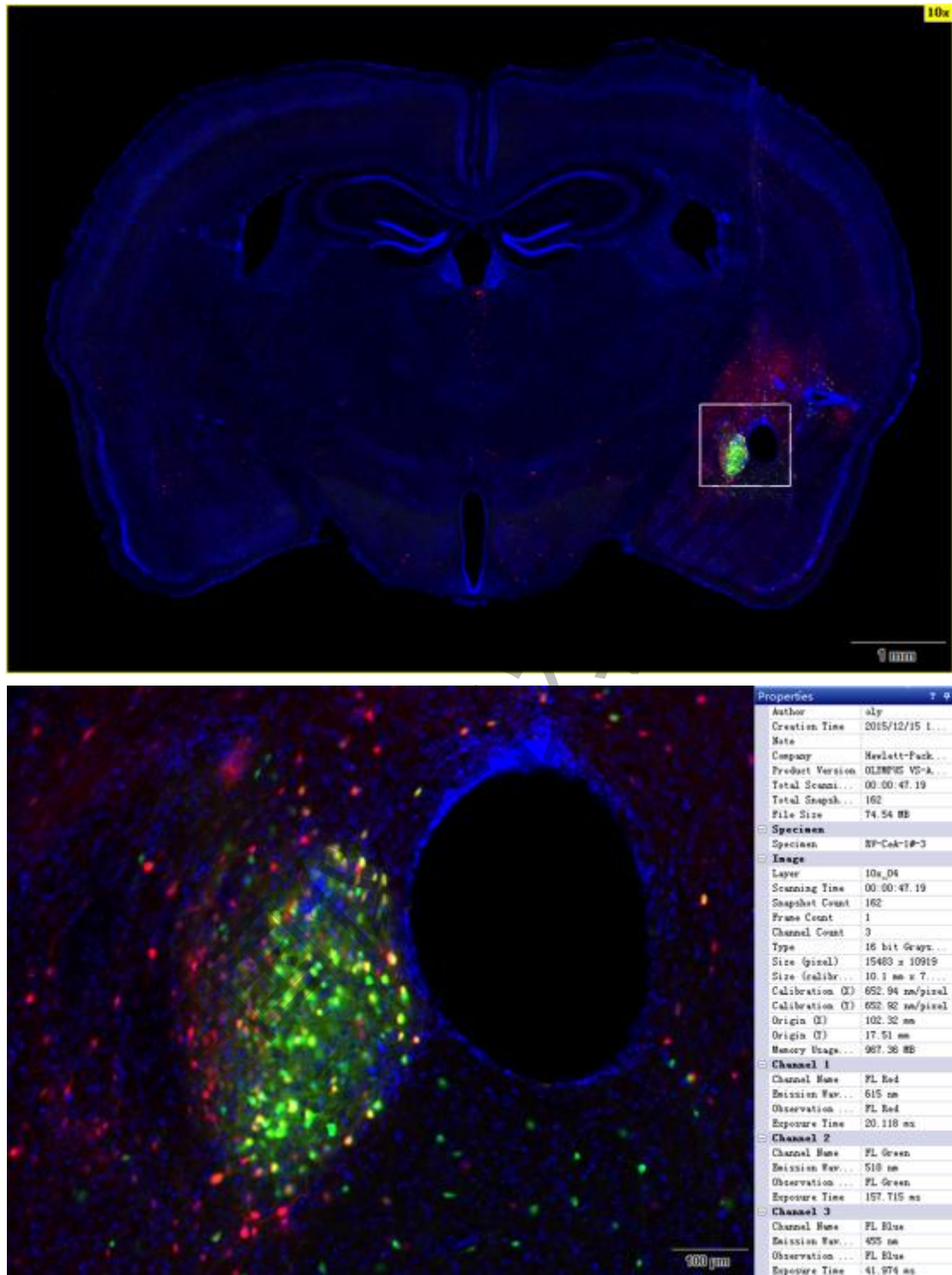


图1 神经荧光脑片成像图 (10X)

3.2 样本类型: 荧光肠切片

拍摄条件: FL Red -183 ms, FL Green -158 ms, FL Blue -126 ms; 10X 物镜, 图像大小: 2.8 mm×3.4 mm 拍摄时间: 16.75 s; 具体效果参考下图 2。

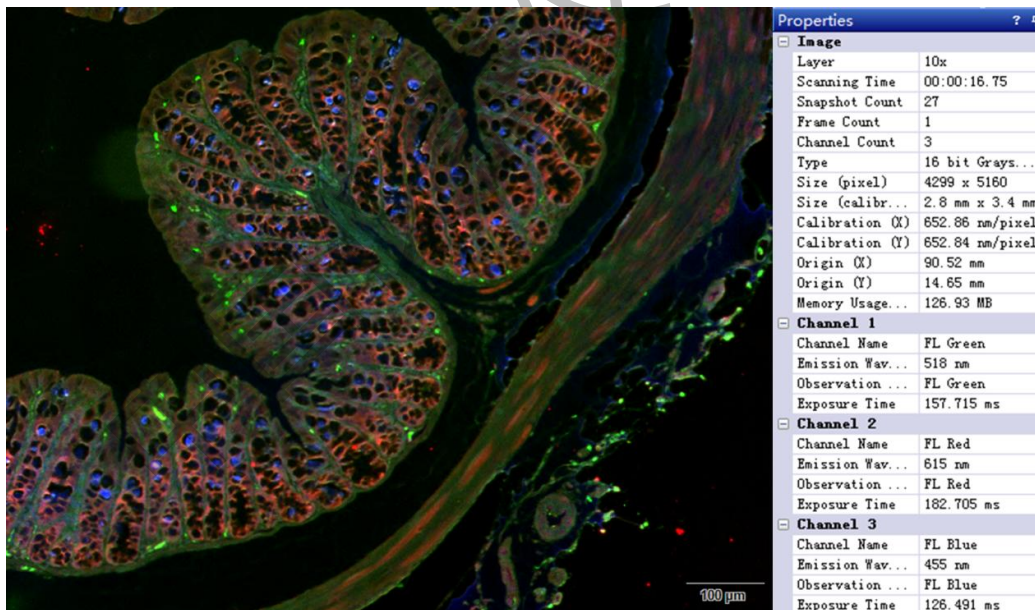
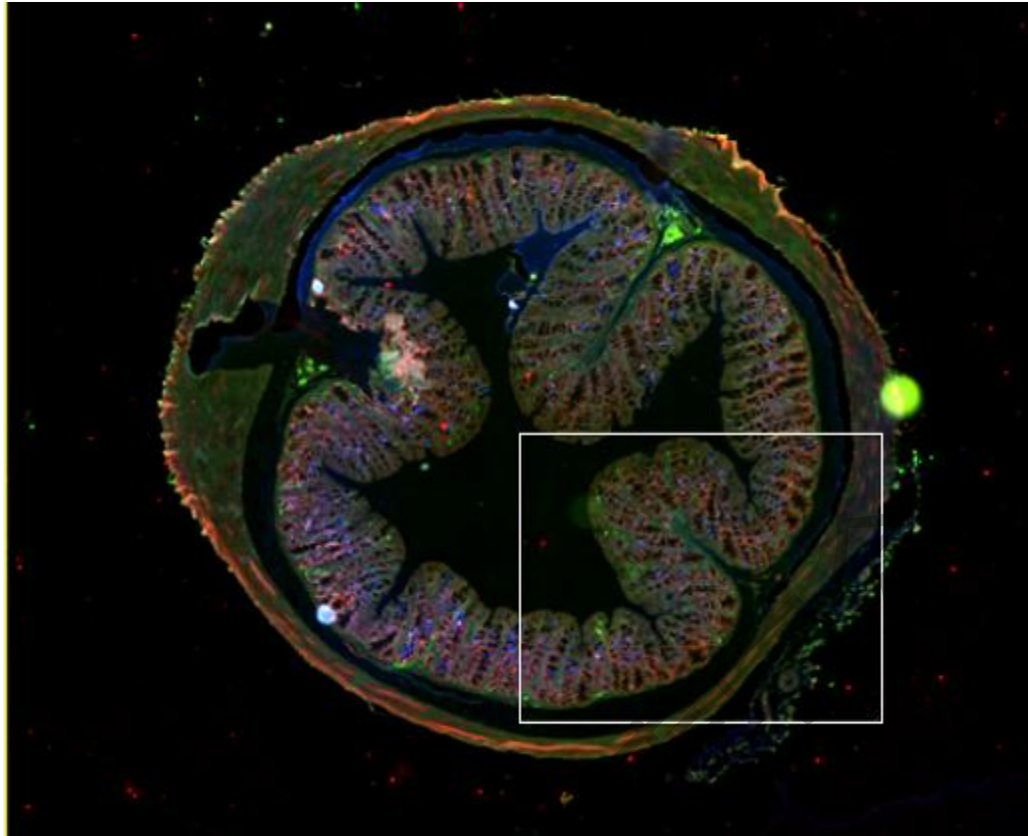


图2 荧光肠切片成像图 (10X)

3.3 样本类型：视网膜荧光片

拍摄条件：FL Green -110 ms；20X 物镜，图像大小：6 mm×5.8 mm，

拍摄时间：38.57 s；具体效果参考下图 3。

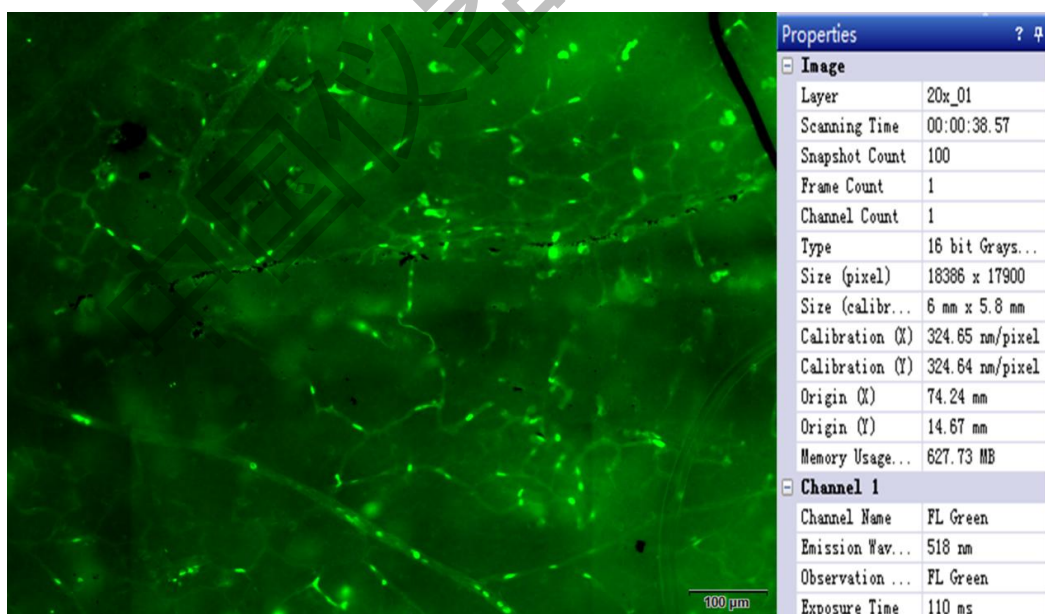
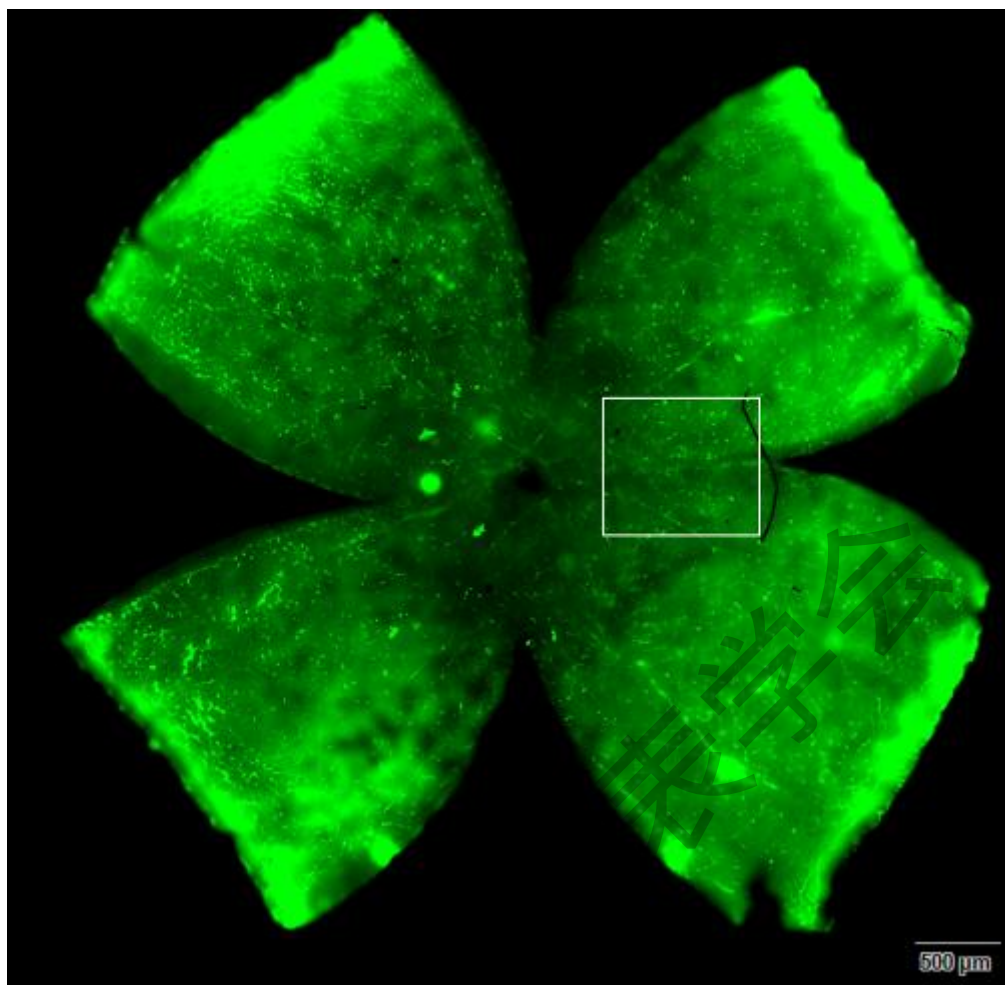


图3 视网膜荧光片成像图 (20X)

3.4 荧光内脏切片

拍摄条件: FL Green- 150 ms, FL Blue -200 ms; 10X 物镜,

图像大小: 5.8 mm×5.8 mm, 拍摄时间: 24 s; 具体效果参考下图 4。

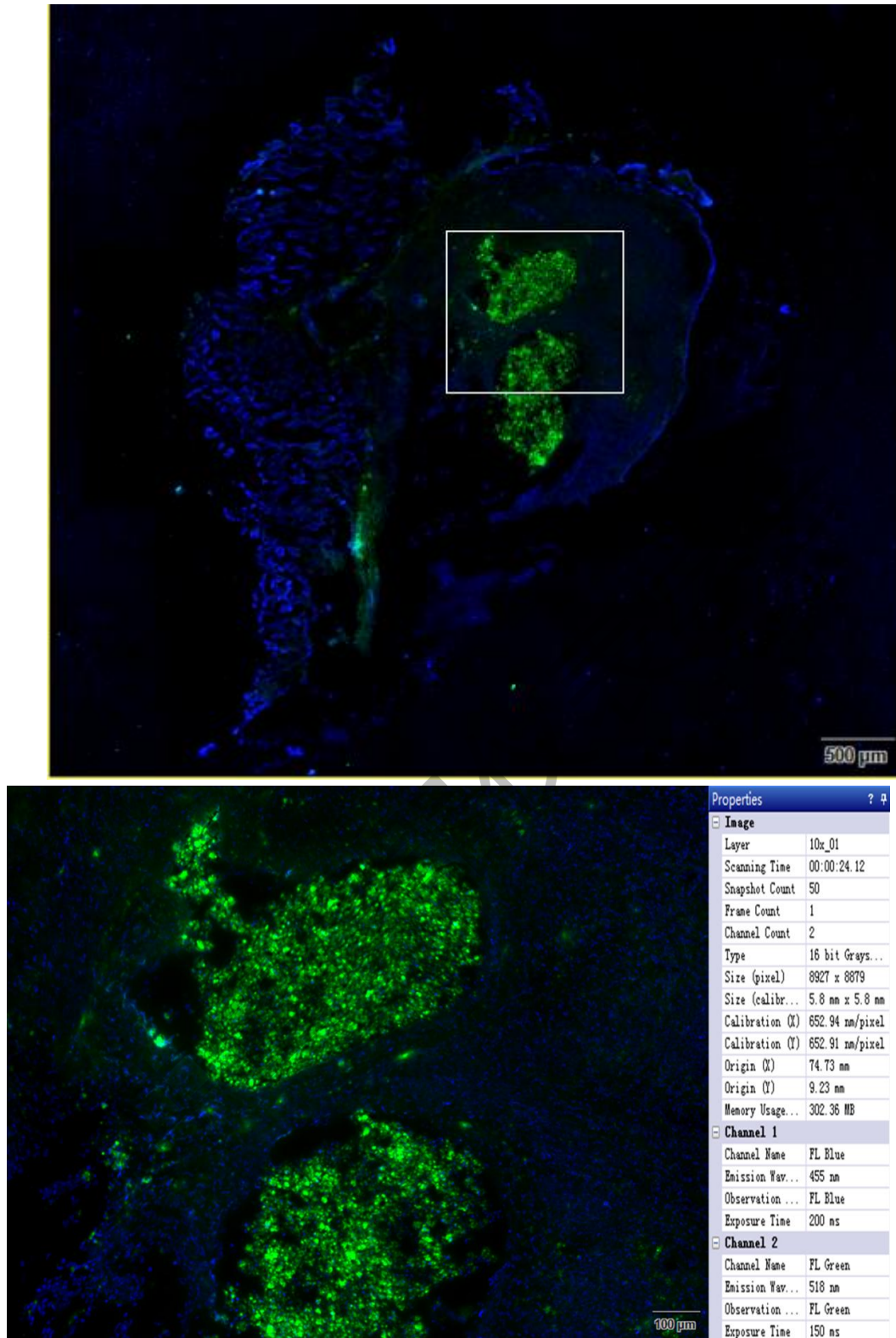


图 4 荧光内脏切片成像图 (10X)

3.5 明场骨切片

拍摄条件：40X 物镜，图像大小：3.8 mm×3.2 mm，拍摄时间：42 s；具体效果参考下图 5。

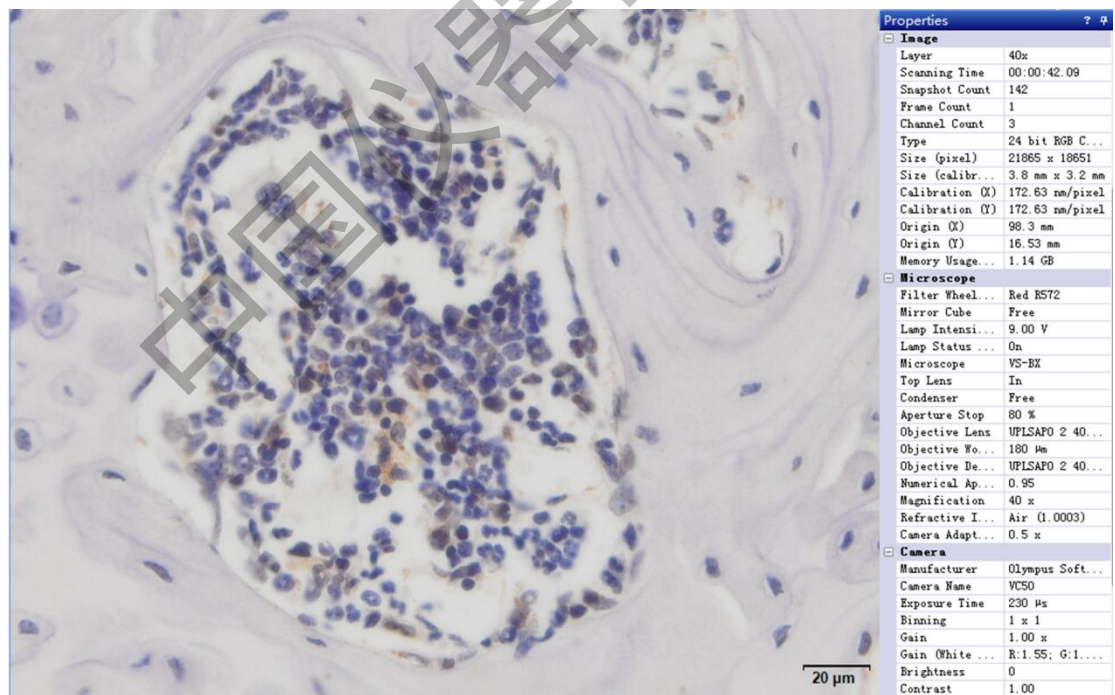
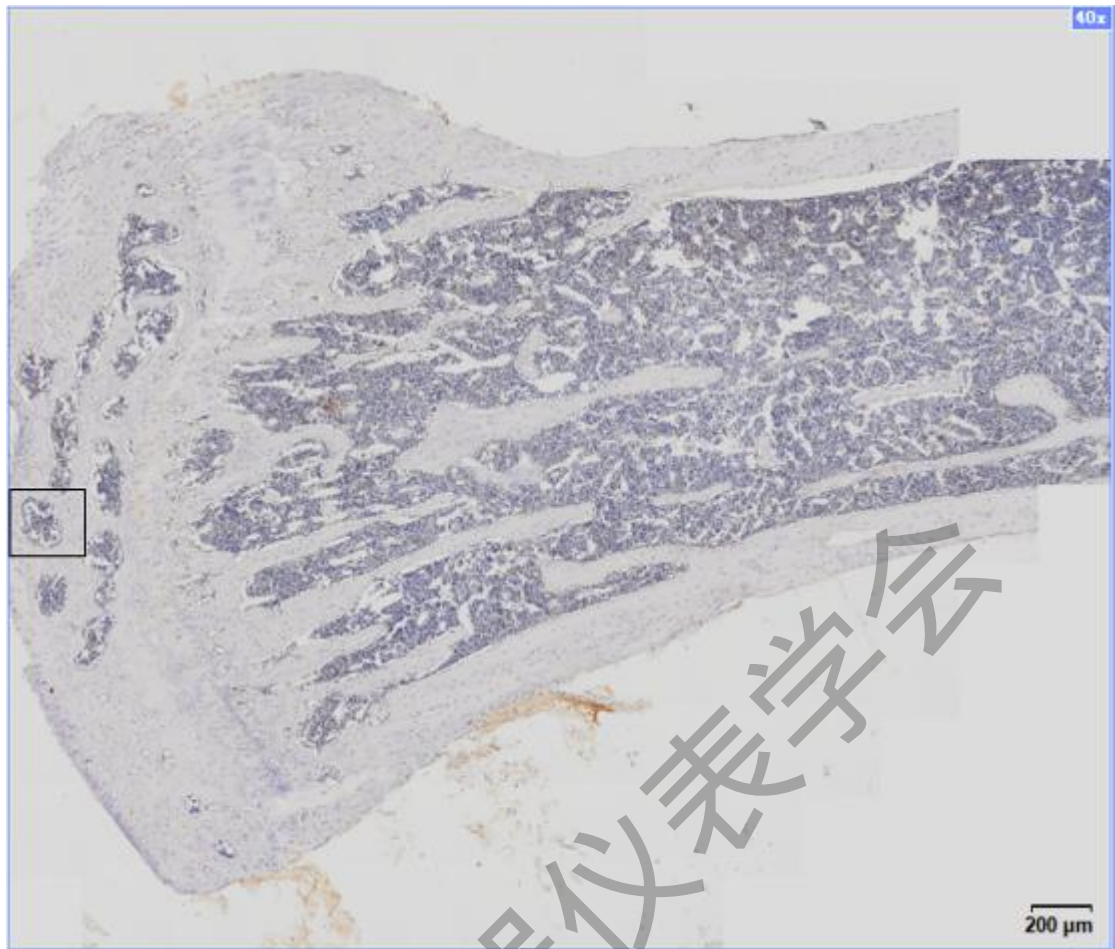


图5 明场骨切片成像图 (40X)

3.6 明场肾切片

拍摄条件：40X 物镜，图像大小：9.2 mm×10.3 mm，拍摄时间：2 min 09 s；具体效果

参考下图 6。

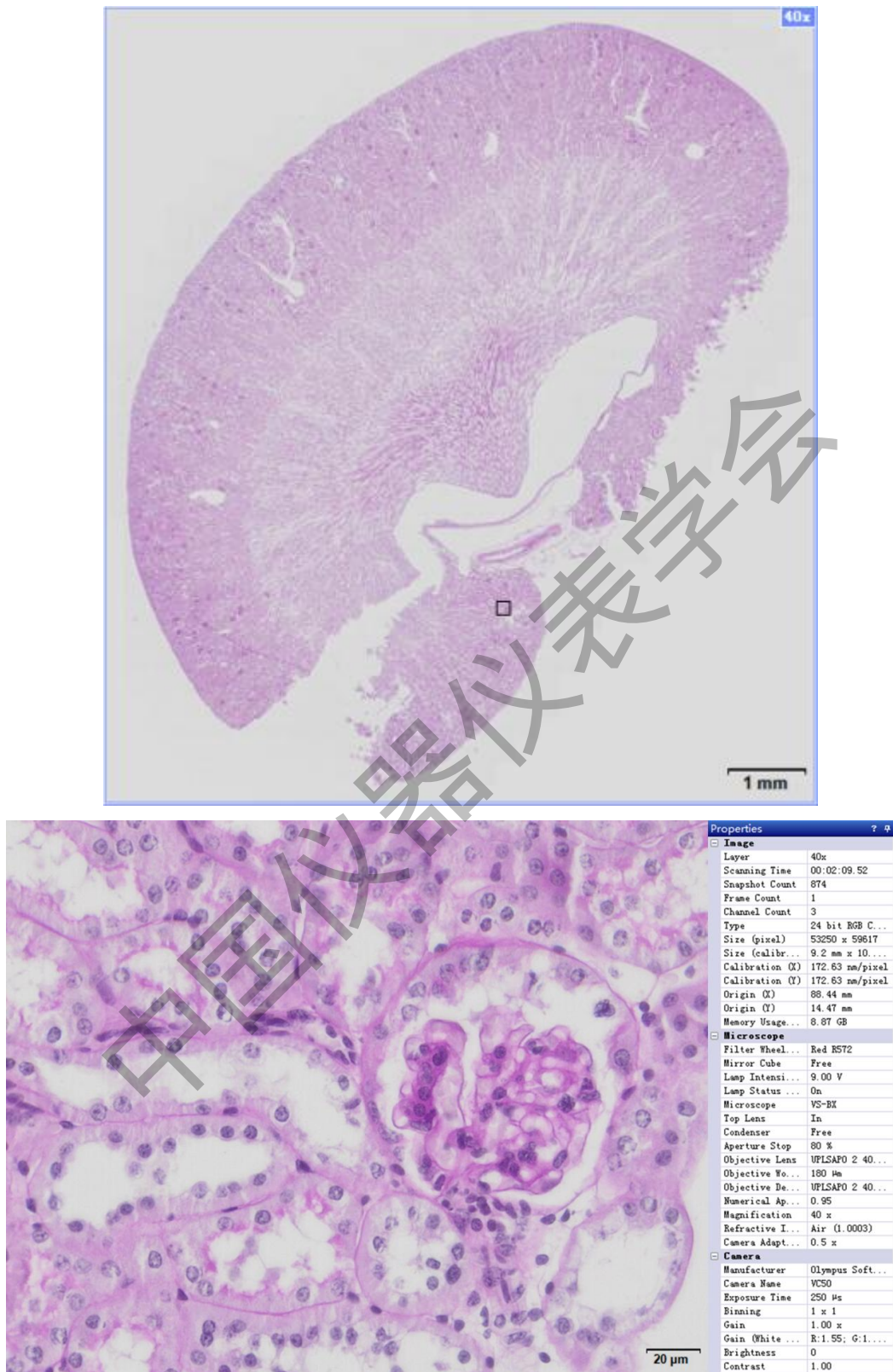


图 6 明场肾切片成像图 (40X)

4 VS120 使用过程中遇到的问题、造成原因及解决方案

4.1 问题：预览扫描和实际扫描会因为超出扫描界限而弹出报错提示：

造成原因：在扫描过程中，利用 stage navigator 来进行多次重复定义预览区域时，如果第二次预览定义的区域小于上次定义的区域容易出现该提示。

解决方案：取消扫描，在采集模块校准界面里重新做一次预览区域定义校准，即可解决。

4.2 问题：切片最右边的区域位于扫描区域以外

造成原因：软件系统在设计预览边界时，为了尽可能避免扫描的错误和节省时间，特意避开了夹片器支撑玻片的区域，所以会出现最右边一小块区域位于扫描界限之外。

解决方案：建议制备样品时尽量预留出周围的区域，既可以便于指甲油封片不影响样品成像，也可以避免样品位于扫描区域之外。

4.3 问题：vsi 格式的读取和另存方案

造成原因：VS120 进行全视野扫描的数据量十分巨大，超出了 Java 系统读图的限制，所以常规 Windows 读图软件无法读取超大数据量的.tiff 和.jpg 格式的文件。VS120 软件自身生成的格式.vsi 可以很有效的存储数据又节省空间，但是其他软件一般情况下无法读取。

解决方案：1) 扫描过程中设置自动存储，直接存成.tiff 格式文件。2) 使用 Fiji + vsi reader 进行.vsi 数据读取和另存 3) 使用奥林巴斯提供的免费看图软件 OlyVIA。4) 加配图像批量转换插件，可对图像进行批量格式转换和另存，可与图像扫描同时进行。

4.4 问题：40X 镜头成像清晰度差

造成原因：1) 40X 物镜上面有一个校正环，用于校准盖玻片的厚度。由于不同批次的盖玻片厚度略有差别，所以要结合校正环一起调节使用，才能得到最佳最清晰的成像。2) 数字切片系统是基于宽场成像的，与共聚焦的原理不同，成像时也会采集到非焦平面的图像信息，这是光学系统本身的特性。40X 物镜的数值孔径更高，景深更小，所以这种现象会更加明显。

解决方案：1) 针对不同的样品，对校正环进行调节，以获得在焦面位置最清晰的成像。2) 基于宽场成像的原理，建议可以制备更薄的标本，或者使用 VS120 的实时 EFI 功能进行成像。

4.5 问题：过厚的荧光样品和过弱的荧光样品采集出现拼接阴影

造成原因：1) 过厚的荧光样品在进行拍摄时，很难找到比较合适的焦面，如果多个聚焦点之间的 Z 轴相差太大，焦面移动过程中的背景荧光亮度整体会发生变化，这样就容易出现拼接阴影。2) 过弱的荧光样品在进行采集的时候，样品信噪比不好，为了拍摄出信号，需要提高曝光时间或提高荧光光源的功率，容易造成样品的淬灭。而且，此时采集到的图像中，背景荧光亮度大部分都是自发荧光，也容易出现淬灭。系统在拼图时需要重复拍摄边界区域

进行重叠拼接，样品淬灭则容易出现拼接阴影。

解决方案：1) 建议样品厚度不要超过 40 μm ，荧光样品进行焦面设置时选择手动调焦，以保证快速确定焦面，尽量避免荧光淬灭。由于样品比较厚，可以设置的焦面范围相对比较宽，建议尽量保持 Z 轴数值一致。2) 荧光信号过弱的样品信号较弱，信噪比较差，做数字切片扫描时背景信号相对被放大，容易有拼接阴影，建议改进样品制备方法。针对荧光观察，优先选择延长曝光时间，而非增加光源强度，尽量避免样品的淬灭。

5 结语

虚拟切片技术优势巨大，前景广阔，逐步作为形态学实验教学、科学研究和病理会诊的一种辅助手段，相较于传统激光共聚焦的大视野拼图技术，VS120 拼图速度更快更高效，且拼缝更小，几乎做到完美拼接，但其图像质量仍取决于组织切片的制作质量，因此传统切片还不能完全被取代^[15]。对于此类共享率高、使用量大的显微成像仪器，如何做好维护和管理并且合理地开发利用是仪器管理人员需要不断研究和深入的问题。

参考文献:

- [1]曾毅波, 蒋书森, 黄彩虹等.激光共焦扫描显微镜在微机电系统中的应用[J],光学精密工程, 2008,16 (7) :1241-1246.
- [2]Paul M Kulesa, Danny A Stark, Joseph Steen, et al.Watching the assembly of an organ a single cell at a time using confocal multi-position photoactivation and multi-time acquisition[J]. Organogenesis. 2009 ,5(4): 238-247.
- [3]范嘉盈, 张岚, 陈荪红. 虚拟切片技术在实验教学中的应用[J].实验室研究与探索, 2014, 33(5) : 72-76.
- [4]张国荣, 李丽, 王文奇.数字切片在组织学实验教学中的应用[J].实验室研究与探索, 2017,36 (6) 216-218.
- [5]AF Macaskill , JM Cassel , AG Carter. Cocaine exposure reorganizes cell type-and input-specific connectivity in the nucleus accumbens[J], Nature Neuroscience,2014,17 (9) :1198-207.
- [6] T Bachhuber, N Katzmarski, JF Mccarter, et al. Inhibition of amyloid- β plaque formation by α -synuclein[J].Nature Medicine, 2015 , 21 (7) :802-807.
- [7] Oldenburg, Ian , Sabatini, et al. Antagonistic but Not Symmetric Regulation of Primary

- Motor Cortex by Basal Ganglia Direct and Indirect Pathways[J].Neuron, 2015 , 86 (5) :1174-1181.
- [8] A Saunders, IA Oldenburg, VK Berezovskii, et al. A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex[J].Nature, 2015 , 521 (7550) :85-89.
- [9] NA Dymant, AP Breidenbach ,AG Schwartz, et al.Gdf5 progenitors give rise to fibrocartilage cells that mineralize via hedgehog signaling to form the zonal enthesis[J].Developmental Biology , 2015 , 405 (1) :96-107.
- [10] Cha, M, Um SW, KwonM,et al. Repetitive motor cortex stimulation reinforces the pain modulation circuits of peripheral neuropathic pain[J]. Scientific Reports,2017, 7, :1-13.
- [11] I Maeda, K Abe, H Koizumi, et al. Comparison between Ki67 labeling index determined using image analysis software with virtual slide system and that determined visually in breast cancer[J]. Breast Cancer, 2016 , 23 (5) :1-7.
- [12] R Tyagi.Neural Networks of the Mouse Neocortex, Cell 156, 1096–1111, February 27, 2014[J].Annals of Neurosciences,2015.
- [13] D Wang, X He, Z Zhao, et al. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons[J].Frontiers in Neuroanatomy , 2015, 9(40).
- [14] K Ohara, M Kohno, T Horibe, et al. Local drug delivery to a human pancreatic tumor via a newly designed multiple injectable needle[J]. Mol Clin Oncol , 2013, 1 (2) :231-234.
- [15]王进京, 孙保存, 赵秀兰, 等. 数字切片库结合网络在病理学实验教学中的应用[J].基础医学教育,2012, 14(12) : 935-937.