

海马皮膜的扫描电镜观察与图象定量分析

张朝晖* 濮祖茂 徐珞珊 徐国钧 王 强
徐根兴* 吴立云* 陈进贵*

(中国药科大学, 南京 210009; * 海军医学高等专科学校, 南京 210099)

海马 *Hippocampus* 为名贵中药材, 具温肾壮阳、散结消肿之功效。历版《中国药典》均记载海马为海龙科动物线纹海马 *Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder 等 5 种海马的干燥体, 该类药材显微鉴定较困难, 本文首次对海马皮膜进行了扫描电镜观察与图像定量分析, 结果表明: 3 种海马皮膜上均有鳞片状突起物, 其表面有同心圆状纹理, 但鳞片状突起物在形状、大小、排列方式上有一定的差异; 从对 45 张扫描电镜照片以长径、短径、面积等为参数进行的图像定量分析发现, 同种海马不同部位的上述参数均无显著性差异, 而不同种之间除形状因子外均有显著性差异。为显微鉴定提供了参考依据。

材 料 与 方 法

大海马 *Hippocampus kuda* Bleeker(1992 年 8 月采自广东汕头竭石海马养殖场), 三斑海马 *H. trimaculatus* Leach(1992 年 8 月采自广东湛江草溪海域), 小海马 *H. japonicus* Kaup(1992 年 10 月采自辽宁锦西兴城海域)。以上标本均经本文作者王强教授和张朝晖副教授鉴定学名。新鲜样品经福尔马林液固定。

取以上福尔马林液固定样品用蒸馏水反复洗涤后, 在每一样品的腹面、背面、侧面取适当大小的皮膜, 用 2% 锇酸固定, 乙醇梯度脱水, 二氧化碳临界干燥, 粘于样品台上, 扫描电镜观

察并照相。

仪器 日本明石 SX-40 型扫描电子显微镜; HCP-II 临界干燥仪; IB-3 型离子溅射镀膜仪; XY-450 型医学彩色图象分析仪。

结 果

1 皮膜扫描电镜观察 对皮膜的表面进行扫描电镜观察(图 1)。

大海马: 皮膜上可见椭圆形、长圆形、圆形的鳞片状突起物, 排列松散、大小均匀, 长径 $0.75 \sim 19.5 \mu\text{m}$, 短径 $0.6 \sim 10 \mu\text{m}$, 表面有同心圆状纹理。鳞片状突起物下面可见网状纹理, 并形成较清晰的网格。

三斑海马: 皮膜上可见贝壳形、类多角形、椭圆形的鳞片状突起物, 排列较密集, 大小较均匀, 长径 $0.65 \sim 19.0 \mu\text{m}$, 短径 $0.60 \sim 16.5 \mu\text{m}$, 表面有同心圆状纹理。鳞片状突起物下面可见网状纹理, 并形成较清晰的网格。

小海马: 皮膜上可见类多角形、贝壳形、长圆形的鳞片状突起物, 排列疏密不等、大小悬殊, 长径 $0.25 \sim 17.5 \mu\text{m}$, 短径 $0.20 \sim 13.5 \mu\text{m}$, 表面有同心圆状纹理。鳞片状突起物下网状纹理不清晰。

从扫描电镜观察发现, 3 种海马皮膜上均有鳞片状突起物, 其表面有同心圆状纹理, 但鳞片状突起物在形状、大小、排列方式上有一定的差异。

2 皮膜扫描电镜的图象定量分析 本实验采用的参数: 细胞(将鳞片状突起物模拟为细胞)

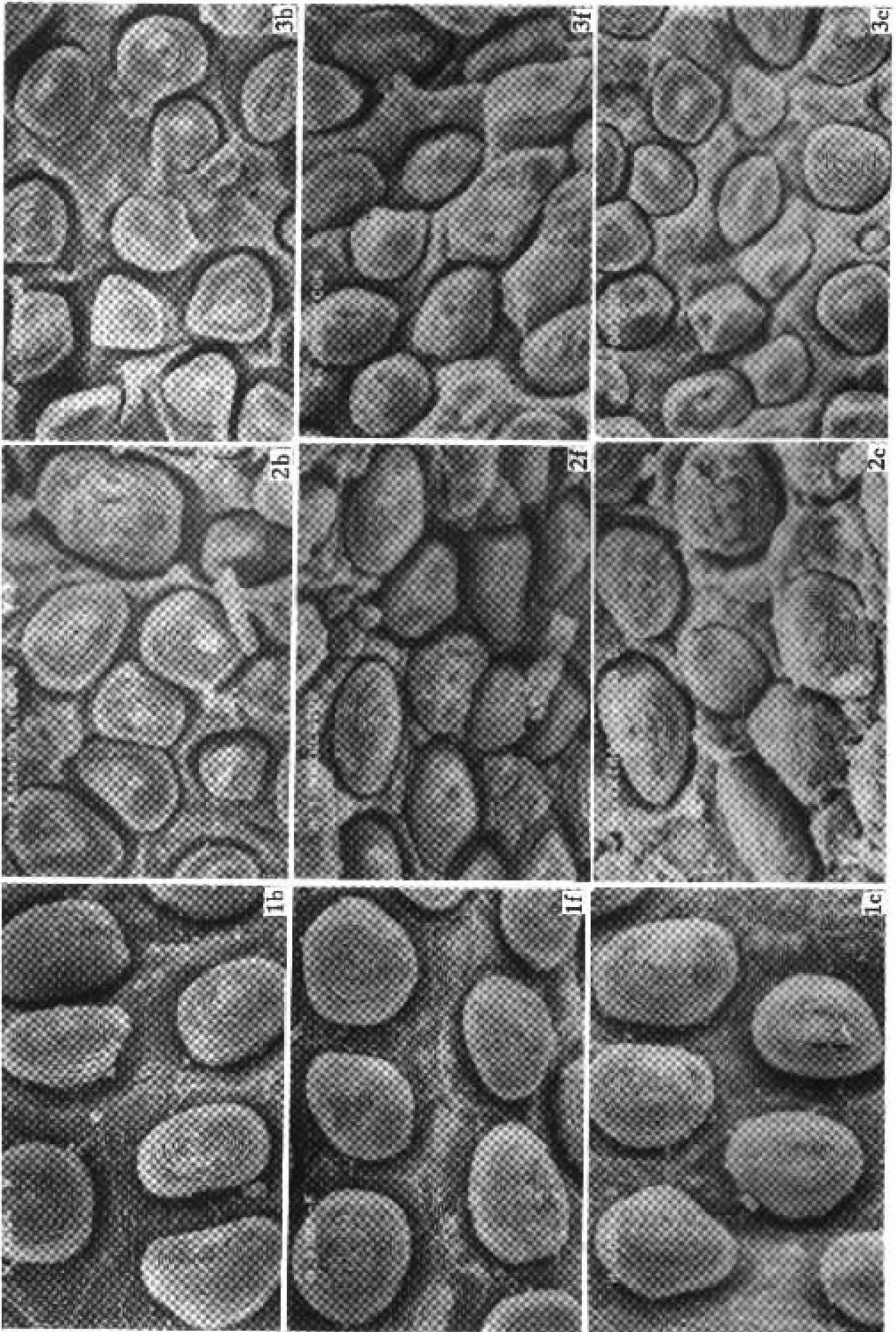


Fig 1 The SEM pictures of derma of *Hippocampus*. 1. *H. kuda*; 2. *H. trimaculatus*; 3. *H. japonicus*.

几何形态参数测量通过象素点进行,所有象素点的长宽一致,通过校正测量,可得每个象素点代表细胞的实际长度和面积。测量周长通常以细胞边界的象素点总和乘以每一象素点代表的实际长度(经放大倍数校正后的值),得出细胞的实际周长。细胞边界可用光电鼠标器以人机对话方式框定或根据灰度差异由图象分析仪自动识别^[1]。

$$P_1 = K_1 \sum_{i=1}^n L$$

P: 细胞周长; K_1 : 每个象素点代表的实际长度; L: 细胞边界上象素点(求和)

细胞面积的测量: 细胞边界内所有象素点之和乘以每一象素点代表的实际面积(经放大倍数校正后的值)。

$$P_2 = K_2 \sum_{i=1}^n L$$

P_2 : 细胞面积; K_2 : 每个象素点代表的实际面积; L: 细胞边界内的象素点(求和)

细胞直径的测量: 若细胞呈近似圆形,可通

过细胞中心用光电鼠标器划一直线代表直径,或由图象分析仪自动测量得出这一直径上所有象素点总和,并乘以每个象素点所表示的实际长度。若细胞呈椭圆形或不规则形,则测量细胞的长、短轴。

形状因子的测量: 此参数反映细胞形状不规则程度。若细胞为圆形,取最小值为 1,细胞形状越不规则,其值越大。 $P_{21} = P_1^2 / 4\pi \cdot P_2$, P_{21} : 形状因子参数。

3 同种海马不同部位的扫描电镜图象定量分析 分别取同种海马的腹面(以下称 f)、背面(以下称 b)、侧面(以下称 c)皮膜电镜照片 5 张,进行同种间鳞片状突起物的形状和大小的定量分析,结果见表 1。

从表 1 可见: 同种不同部位的皮膜表面无明显差异,说明同种海马皮膜不同部位的鳞片状突起物在形状、大小等方面是一致的。

4 不同种海马鳞片状突起物形状和大小的定量分析 方法同上,结果见表 1。

Tab 1 Comparison of 3 parts of 3 species of *Hippocampi* / $\bar{x} \pm s$

Species	n	Perimeter	Area	Long diameter	Short diameter	Shape factor
<i>H. kuda</i>	10	f 54.155 ± 4.120	200.518 ± 28.816	17.397 ± 2.047	14.499 ± 1.200	1.205 ± 0.158
		b 58.414 ± 4.400	225.884 ± 30.618	19.984 ± 2.580	14.797 ± 1.359	1.320 ± 0.208
		c 59.701 ± 4.511*	281.960 ± 30.618	19.099 ± 1.506	15.268 ± 1.829	1.259 ± 0.103
	30	d ₁ 57.866 ± 5.304	222.109 ± 13.196	18.844 ± 2.096	14.846 ± 1.438	1.276 ± 0.154
<i>H. trimaculatus</i>	10	f 50.992 ± 3.036	168.166 ± 20.041	17.035 ± 1.802	12.331 ± 1.905	1.427 ± 0.342
		b 55.833 ± 5.803	205.081 ± 42.023*	17.622 ± 2.709	14.046 ± 1.209	1.257 ± 0.180
		c 53.252 ± 5.300	185.860 ± 37.407	17.674 ± 2.370	13.304 ± 1.838	1.353 ± 0.277
	30	d ₂ 53.739 ± 5.304 [▲]	188.719 ± 38.068 [▲]	17.671 ± 2.245 [▲]	13.216 ± 1.787 [▲]	1.364 ± 0.270
<i>H. japonicus</i>	10	f 36.959 ± 4.245	90.590 ± 20.717	12.184 ± 1.438	9.392 ± 1.346	1.307 ± 0.133
		b 42.029 ± 2.388	115.134 ± 12.147	13.604 ± 1.067	10.561 ± 0.705*	1.298 ± 0.134
		c 46.317 ± 2.388	99.586 ± 15.955* [△]	12.278 ± 0.969 [△]	10.481 ± 1.515	1.192 ± 0.198
	30	d ₃ 41.768 ± 14.246 ^{▲#}	101.770 ± 19.087 ^{▲#}	12.689 ± 1.312 ^{▲#}	10.145 ± 1.312 ^{▲#}	1.264 ± 0.161

* $p < 0.05$ vs f, $^{\Delta}p < 0.05$ vs b, in same species. $^{\Delta}p < 0.01$ vs d₁, $^{\#}p < 0.01$ vs d₂, in different species. f: ventral face; b: rear face; c: lateral face.

表 1 比较结果表明: 种间在皮膜鳞片状突起物的周长、面积、长径、短径方面均有明显差异,唯形状因子差别不显著。

5 不同种海马皮膜上鳞片状突起物相关密度的定量分析 以电镜照片的平均面积为测量窗,进行以下参数的测定: 参数 1: 测量窗(照片

面积 $2551.92 \pm 54.07 \mu\text{m}^2$)内各组鳞片状突起物的面积。参数 2: 测量窗(照片面积 $2551.92 \pm 54.07 \mu\text{m}^2$)内各组鳞片状突起物的平均个数。参数 3: 单位面积中各组鳞片状突起物的平均面积(总面积/测量窗面积)。分析结果见表 2。

Tab 2 The quantitative analysis of 3 species of *Hippocampi*

Parameter	<i>H. kuda</i>	<i>H. trimaculatus</i>	<i>H. japonicus</i>
1	1030.537 ± 37.728	1396.920 ± 44.710	1198.509 ± 37.891
2	5.14 ± 0.19	8.31 ± 0.27	12.23 ± 0.42
3	0.404 ± 0.015	0.547 ± 0.018	0.470 ± 0.014

$\bar{x} \pm s, n = 30.$

表 2 表明:不同种间测量窗范围内各组鳞片状突起物的面积、平均个数及单位面积中各组鳞片状突起物的平均面积均有显著差异。其中以三斑海马鳞片状突起物的面积最大,小海马次之,大海马最小。

从以上对 45 张扫描电镜照片图像分析可知,同种海马不同部位的上述参数均无显著性差异,而不同种之间除形状因子外均有显著性差异。

讨 论

图象分析是采用计算机技术和数学形态学

方法,比较客观精确地用数据表达图象中的各种信息的一种方法,即从图象中提取有用的测量数据和信息,形成非图象或符号的描述或表达,是一种有发展前景和潜能的研究手段。本实验对 XY-450 型医学彩色图象分析仪应用于生药学研究作了初步尝试,效果较好,建议进一步推广应用。

关键词 海马;皮膜;扫描电镜;图象定量分析

参 考 文 献

- 1 徐根兴著.定量细胞学和细胞化学技术,长春:吉林科学技术出版社,1993:22

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATION AND IMAGE QUANTITATIVE ANALYSIS OF *HIPPOCAMPI*

Zhang Zhaohui(Zhang ZH)*, Pu Zumao(Pu ZM), Xu Luoshan(Xu LS), Xu Guojun(Xu GJ), Wang qiang(Wang Q), Xu Genxing(Xu GX)*, Wu Liyun(Wu LY)* and Chen Jingui(Chen JG)*

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; * Naval Medical College, Nanjing 210099)

ABSTRACT The "scale-like projects" on the derma of 3 species of *Hippocampi*, *H. kuda* Bleerer, *H. trimaculatus* Leach and *H. japonicus* Kaup were observed by scanning electron microscope (SEM). Results showed that some characteristics such us size, shape and type of arrangment of the "scale-like projects" can be considered as the evidence for microanalysis. Image quantitative analysis of the "scale-like project" was carried out on 45 pieces of photograph using area, long diameter, short diameter and shape factor as parameters. No difference among the different parts of the same species was observed, but significant differences were found among the above 3 species.

KEY WORDS *Hippocampus*; Derma; SEM; Image quantitative analysis