

# 线粒体连续超薄切片电镜图像的三维可视化<sup>\*</sup>

李 晶<sup>1</sup>, 黄小俊<sup>2</sup>, 阮兴云<sup>1</sup>, 李鲲鹏<sup>2</sup>, 张景强<sup>2</sup>

(1 昆明总医院医学工程中心, 云南 昆明 650032

2 中山大学生命科学学院 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 研究建立对连续超薄切片电镜图像的三维可视化方法。对正常及用 SARS 冠状病毒感染非洲绿猴肾细胞 (Vero E6) 样品进行连续超薄切片, 通过透射电镜得到线粒体断层图像, 用表面显示技术对线粒体进行三维重构显示。正常和 SARS 冠状病毒感染的 Vero E6 细胞中的线粒体在结构上有明显区别, 揭示出 SARS 冠状病毒感染 Vero E6 细胞线粒体的病理改变。以此建立起电镜连续超薄切片线粒体图像三维可视化方法。

**关键词:** 线粒体; 表面显示; 连续超薄切片; 三维可视化

**中图分类号:** Q6    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0529-6579 (2006) 06 0072-03

由于线粒体在细胞生命活动中的独特作用, 如: 线粒体在细胞程序性死亡中的作用已经被广泛承认<sup>[1]</sup>。除了传统的电子显微镜技术对线粒体结构的研究, 近年来由于计算机图像技术的飞速发展并且日益渗透到生命科学研究领域, 出现了一些新的技术: 三维反卷积光学显微镜<sup>[2]</sup>、高分辨扫描电镜 (HRSEM)<sup>[3]</sup>和电子显微断层摄影术 (electron microscope tomography)<sup>[4]</sup>, 正从不同的角度揭示出一些早期研究者未揭示的或未完全揭示出来的线粒体的结构信息。本文正是着眼于线粒体在生命活动中的重要作用, 应用图像处理技术, 研制开发连续超薄切片电镜图像的三维可视化方法, 对线粒体的结构进行研究。从结构的角度揭示 SARS (severe acute respiratory syndrome SARS) 冠状病毒感染非洲绿猴肾细胞 (Vero E6 细胞) 粒体的病理改变, 同时建立通用的对连续超薄切片电镜图像的三维可视化方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

对正常和被 SARS 冠状病毒感 24 h 的 Vero E6 细胞样品, 分别固定包埋后用超薄切片机 IKB2088 (IKB Co) 按间隙角 3 度, 切片平均厚度为 50 nm, 进行连续切片。用覆有 formvar 膜的单椭圆孔铜网捞起, 染色后在 JEM-100CX-II (Japan) 型透射电子显微镜上观察。选取典型病变特征、且切片完整的若干组线粒体进行拍照, 用专用底片扫描仪 Nikon8000CE (Japan) 将图像数字化,

### 1.2 三维可视化方法

目前的三维显示技术基本上可以分为面绘制和体绘制两大类。面绘制的一般步骤是首先在二维序列图像上提取对象的轮廓线, 然后利用多边形面片来近似相邻的轮廓线之间的等值面, 从而得到要显示的对象完整的表面。最后采用传统的图形学方法加以显示。当体数据的采样密度足够大时, 可以采用 MC (Matching Cube) 方法<sup>[5]</sup>在表面体素内部提取等值面, 得到高质量的表面显示结果。面绘制的优点是: 可以清晰显示对象的表面情况, 配合通用的显卡加速, 具有较好的实时交互性。本文采用提高的 MC 算法<sup>[7]</sup>来构建线粒体体数据的显示模型。

本文中体数据空间位置用体数据的空间坐标决定, 明暗属性由每个像素点的方向矢量决定。方向矢量的计算式 (1), 给出了  $x$  方向上的分量  $g_x$ ,  $y$ ,  $z$  方法分量有同样的形式。

$$g_x = \frac{\sum_{n=1}^N f(x_0 + n \times \Delta x, y_0, z_0) - \sum_{n=1}^N f(x_0 - n \times \Delta x, y_0, z_0)}{2 \times N \times \Delta x} \tag{1}$$

其中,  $f(x_0, y_0, z_0)$  表示任意体数,  $x_0, y_0, z_0$  表示体数据的空间三维坐标。  $\Delta x$  为相邻像素之间  $x$  方向上的增量。  $N$  所取平均像素的维度, 它的大小决定了显示表面的平滑度。随着  $N$  增大则平滑程度逐渐提高, 而细节却逐渐消失, 实验证实, 当  $N=3$  兼顾了平滑效果和显示细节, 使显示达到最佳

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2006-01-20  
基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (05300638); 中国博士后科学基金资助项目 (2004035183)  
作者简介: 李晶 (1966 年生) 男, 博士后; 通讯联系人: 张景强, Email: li\_jingkm@126.com  
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

效果。对上述样品断层图像进行三维重构。从整体形态的角度，对病变线粒体和未病变线粒体的形态进行比较研究。

2 结果与讨论

一个正常完整的线粒体（图 1a）被连续切成 18 片，由切片上观察这个线粒体的嵴呈扁平状整齐排列于线粒体内，无明显膨胀。三维重构后的结果（图 1b）与切片直接观察的结果相同，嵴呈条带状整齐排列于线粒体内，无膨胀。

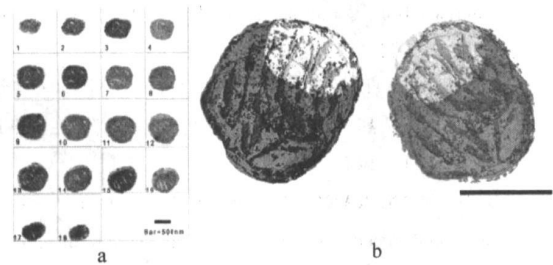


图 1 一个正常的完整的线粒体切片图以及三维重构图（Bar=500 nm）

Fig 1 The serial ultrathin sections of a whole normal mitochondrion and its 3D reconstruction result (Bar=500 nm)

一个嵴部分呈泡状膨胀的完整的线粒体（图 2a）被切成 19 片，由切片上观察这个线粒体中部有一膨胀呈泡的嵴，其它嵴仍呈扁平囊片状整齐排列于线粒体内。三维重构后的结果（图 2b）与切片直接观察的结果有所不同，这个线粒体的嵴（膨胀和未膨胀的）连成大片的囊块状。

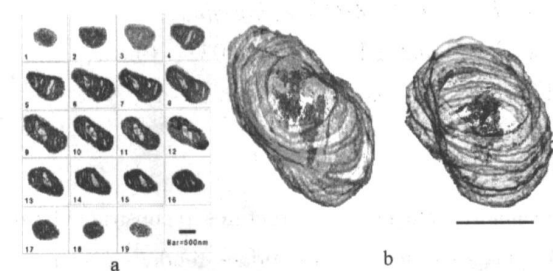


图 2 一个嵴部分呈泡状膨胀的完整的线粒体切片图及其三维重构图（Bar=500 nm）

Fig.2 The serial ultrathin sections of a whole mitochondrion with partial cristae swelling to a bubble shape and its 3D reconstruction result (Bar=500 nm)

一个嵴完全膨胀的只有部分的线粒体（图 3a）被切成 17 片，由切片 1、2、3 上观察，这个线粒体的嵴完全膨胀，呈一个电子致密的环围绕与线粒体的周围，另外还有一些碎泡状的嵴分布在电子致

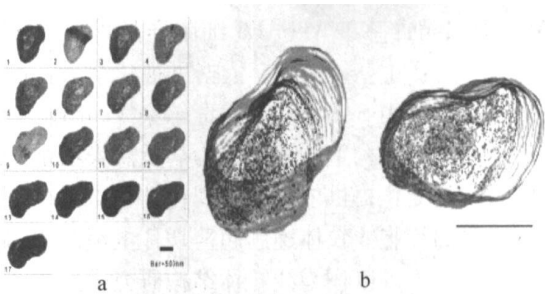


图 3 一个嵴完全膨胀的只有部分的线粒体切片图及其三维重构图（Bar=500 nm）

Fig.3 The serial ultrathin sections of a partial mitochondrion with whole cristae swelling to a bubble shape and its 3D reconstruction result (Bar=500 nm)

密环中。三维重构后的结果（图 3b）与切片直接观察的结果有所不同，所谓完全膨胀的嵴并不真的在整个线粒体中完全伸展，其膨胀的部分仅占线粒体体积的一小部分。其余的嵴呈散布的管泡状。从这可见，在一张超薄切片中表现为嵴完全膨胀，呈电子致密的环围绕与线粒体的周围的线粒体，并不真的在整个线粒体中完全伸展成一个占据大部分体积的空泡，而是仅占线粒体体积的一小部分。这一点不通过连续超薄切片三维重构而只经常规超薄切片很难发现的。

常规的超薄切片只能提供关于细胞和细胞器的单一切面的二维信息，这些信息是局部的而且可能引起误解。在一张超薄切片中表现为嵴完全膨胀，从三维重构的线粒体的完整形态结构信息中表现为仅占线粒体体积的一小部分。另外，关于线粒体和内质网的位置关系，从三维结构上可以清晰的看出，两者的相互接触并带部分线粒体插入至内质网。这一点不通过连续超薄切片三维重构而只经常规超薄切片很难发现的。

3 结 论

本文研究了细胞线粒体连续超薄切片透射电镜图像的三维可视化技术，这种方法首先由 Sjostrand (1958)<sup>[8]</sup> 论证了可行性和可靠性。近年来，生物显微图像的三维可视化一直是一个具有挑战性的研究热点。先前的研究均不同程度存在有局限性<sup>[9-11]</sup>。对于连续超薄切片电镜图像三维重构效果的因素很多，除系统环境条件、重建算法与显示方法外，断层切片的数量和质量亦是影响重建结果真实性的重要因素。由于组织细胞形态小，其连续切片的数量和质量保证难度较大，另外，所要观测的部位与切片角度有很大关系，所以最佳的切片角度还需在实践中不断摸索。本文实现了对正常及用

SARS 冠状病毒感染 Vero E6 细胞样品进行连续超薄切片, 进行了三维可视。依据可视化结果, 可以发现在正常及用 SARS 冠状病毒感染 Vero E6 细胞线粒体在三维结构上的不同, 为病毒感染细胞后线粒体的病理变化提供依据。可视化结果也同时证明了所建立的细胞线粒体连续超薄切片电镜图像的三维可视化技术可以作为线粒体结构研究中的一个有力工具。

## 参考文献:

- [ 1 ] GREEN D R, REED J C. Mitochondria and apoptosis [ J ]. Science, 1998, 281: 1309 – 1312.
- [ 2 ] RIZZUTO R, PINTON B, CARRINGTON W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial calcium responses [ J ]. Science, 1998, 280: 1763 – 1766.
- [ 3 ] LEA P J, TEMKIN R J, FREEMAN K B, et al. Variations in mitochondrial ultrastructure and dynamics observed by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM) [ J ]. Microsc Res Tech, 1994, 27: 269 – 277.
- [ 4 ] MANNELLA CA, MARKO M, BUTTLE KE. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle [ J ]. TIBS, 1997, 22: 37 – 38.
- [ 5 ] BAUMEISTER W. Electron tomography: Towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm [ J ]. Curr Opin Struct Biol, 2002, 12: 679 – 684.
- [ 6 ] LORENSEN W, WILLIAM E, CLINE H E. Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm [ J ]. Computer Graphics, 1987, 21 ( 4 ): 163 – 169.
- [ 7 ] DELIBASIS K S, MATSOPOULOS G K, MOURAVLIANSKY N A, et al. A novel and efficient implementation of the marching cubes algorithm [ J ]. Comput Med Imaging Graph, 2001, 25 ( 4 ): 343 – 352.
- [ 8 ] SJOSTRAND F S. Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by 3 – dimensional reconstructions from serial sections [ J ]. J Ultrastruct Res, 1958, 2: 122 – 170.
- [ 9 ] 张景强, 叶巧真, 赖德锦, 等. 小白鼠肾脏线粒体三维结构的重构 [ J ]. 中山大学学报: 自然科学版, 1990, 29 ( 3 ): 141 – 144.
- [ 10 ] BABA N, NAKAMURA S, KNO J, et al. Three – dimensional reconstruction from serial section images by computer graphics [ J ]. J Electron Microsc Tech, 1986, 3: 401 – 406.
- [ 11 ] BABA N, NAKAMURA S, MURANAKA Y, et al. Computer – aided stereographic representation of an object reconstructed from micrographs of serial thin section [ J ]. Microsc and Microsc Acta, 1984, 15: 221 – 226.

## Visualization of 3D Structure of Mitochondria Reconstructed from Electron Microscopy of Serial Ultrathin Sections

LI Jing<sup>1</sup>, HUANG Xiao-jun<sup>2</sup>, RUAN Xing-yun<sup>1</sup>, LI Kun-peng<sup>2</sup>, ZHANG Jing-qiang<sup>2</sup>

(1. Department of Medical Engineering, Kuming General Hospital, Kuming 650032, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract** A novel visualization method of 3D (three – dimensional) mitochondria structures reconstructed from serial ultrathin sections transmission electron microscope (TEM) images which applies surface rendering technique was presented. In order to validate the method, mitochondria in control and the Vero E6 cells which were infected with SARS Coronavirus were prepared by serial ultrathin sections, imaged in electron microscopy then reconstructed from serial section images and the results were compared with each other. As a result, mitochondria in control and the Vero E6 cells infected with SARS have remarkable difference in 3D structures, that illuminates pathological changes of Vero E6 cells. The results also testify the visualization method is valid.

**Key words** mitochondria; surface rendering; serial ultrathin sections; 3D Visualization