arXiv:2611.28905v1 [eess.IV] 21 Nov 2026

超越切片平面：多重免疫荧光的稳健三维重建揭示二维空间细胞统计的局限性

Junming Ma[1], Olle Edgren Sch¨ullerqvist[1,2],Hui Yu[3],Carina Strell[3],Patrick Micke[3],Joakim Lindblad[1,2], Artur Mezheyeuski[4], Nataˇsa Sladoje[1,2]

[1] 信息技术系，乌普萨拉大学，乌普萨拉，瑞典[2] SciLifeLab，乌普萨拉大学，乌普萨拉，瑞典[3] 免疫学、遗传学与病理学系，乌普萨拉大学，乌普萨拉，瑞典[4] Vall d'Hebron研究所与肿瘤学研究所，巴塞罗那，西班牙

摘要

利用多重免疫荧光（mIF）对肿瘤微环境进行空间分析，通常依赖单张薄组织切片；然而，这些切片会歪曲三维组织结构，并以尚未得到充分量化的方式造成空间细胞统计偏差。我们对24个乳腺和肺肿瘤组织组织微阵列芯样进行三维重建，每个芯样均由15–20张连续mIF切片构成，并将三维空间细胞统计与单张切片所得结果进行比较。我们的处理流程结合了仿射预配准与基于RoMa v2的密集形变精细配准，实现了1.79 µm的目标配准误差中位数，显著小于细胞核尺寸，从而能够跨切片关联细胞核。尽管二维中的细胞类型比例得以保持（Pearson相关系数$r \geqslant 0.99$），三维分析显示，最近邻距离最多缩短至原来的3.8倍，邻域熵提高13–19%，每个细胞的接触数增加2–4倍。因此，可以利用单张切片可靠地估计组织组成；但细胞间相互作用则需要进行体积分析。

索引词— 三维组织重建、可变形图像配准、空间生物学、肿瘤微环境表征、数字病理学

1. 引言与相关工作

肿瘤微环境（TME）是由癌细胞、免疫细胞和基质细胞、血管及细胞外基质构成的三维生态系统，其空间组织结构与患者预后及治疗反应相关 [1, 2]。多重免疫荧光（mIF）和成像质谱流式细胞术（IMC）等高通量多重成像技术，可在保留组织结构的同时测量每个细胞的数十种蛋白质标志物，从而推动空间单细胞分析成为癌症研究的核心工具 [3–5]。尽管肿瘤微环境具有三维特性，几乎所有多重免疫荧光研究都只分析单张厚度为 3 µm 至 5 µm 的切片。体积成像的替代方案——例如结合组织透明化的光片显微镜或三维成像质谱流式细胞术 [1, 2]——成本高且速度慢 [3]。

体积成像的替代方案——例如结合组织透明化的光片显微镜或三维成像质谱流式细胞术 [6], ——成本高且速度慢 [7]。

单切片分析隐含地假设一张薄切片能够代表组织。由于细胞的大小与切片厚度相近，对细胞计数、距离、接触和邻域的二维估算会产生几何偏差。体视学校正 [8] 可校正细胞计数和大小，但无法校正最近邻距离或邻域组成等关系指标。三维成像显示，相邻切片之间的空间特征存在显著差异，而信息不完整会导致表型分析不准确，并使许多细胞间接触被遮蔽 [9]。

基于连续切片进行三维重建是一种兼容常规工作流程的替代方案，但需要对切片进行配准，同时应对切片和封片造成的撕裂与变形 [10]。刚性方法和非刚性方法通常按顺序应用。VALIS [11] 使用现代特征检测器和匹配器（例如 DISK、DeDoDe 和 LightGlueMatcher）进行刚性配准，随后使用 SimpleElastix 或 RAFT 进行非刚性调整。Ghose 等人 [12] 通过将多重免疫荧光配准结果与显微计算机断层扫描进行校准，减少沿切片堆栈的漂移，但代价是需要额外成像。对于苏木精-伊红组织学，CODA [13]对单通道图像的 Radon 变换进行互相关，而 RAPID [14] 则使用 RoMa [15]进行密集特征匹配。最新的 RoMa v2 [16] 在密集特征匹配方面达到了最先进的精度和效率，但据我们所知，尚未在组织病理学数据上进行评估。

临床甲醛固定石蜡包埋（FFPE）材料的多重免疫荧光还带来了更多挑战：切片堆栈短且间距不规则、切片损坏或缺失、变形幅度大、切片间染色差异，以及容易干扰稀疏匹配的重复性细胞核纹理。此外，单细胞空间统计要求达到细胞级配准精度，而现有工具通常只在组织级进行验证。

我们的贡献如下：

(i) 一种基于 RoMa v2 的可变形连续切片配准流程，用于实现多重免疫荧光的精准三维重建；(ii) 基于专家标注的地标点，在细胞尺度上与既有基线方法（仿射变换、VALIS）进行评估；(iii) 一种三维细胞重建方法，用于连接对齐切片中的细胞核；

(iv) 通过比较二维和三维中的细胞类型比例、最近邻距离、邻域组成和细胞接触，量化单切片肿瘤微环境分析的偏差。

我们在 https://github.com/MIDA-group/beyond-section-plane 发布了处理流程的代码和详细参数。

2. 数据

我们分析了由乌普萨拉大学 Micke-Strell实验室制备的内部组织微阵列（TMA）数据集。该数据集包含 30 个福尔马林固定石蜡包埋患者组织芯（直径 2 mm），乳腺肿瘤组织和肺肿瘤组织各占一半。每个组织芯由 20 张连续的 $4\,\mu$m 切片组成，采用七色 Opal染色面板染色，并使用 PhenoImager HT（Akoya Biosciences）成像，像素尺寸为 $0.4961\,\mu$m。经过光谱解混后，每张切片包含八个通道：DAPI（细胞核）、CD31（内皮细胞）、GAP43 和 NFP（神经相关细胞）、CD3（T细胞）、CD163（M2样巨噬细胞）、PanCK（上皮细胞/肿瘤细胞）以及自发荧光。

数据整理。 在获取的20张图像堆栈中，每张图像均包含30个组织芯的层片，其中6个组织芯因在所有层片中均观察到严重组织损伤而被排除。为确保后续处理具有实际意义，我们进一步剔除了其余组织芯中少数严重受损的个别切片。最终数据集包含24个组织芯，每个组织芯含有15至20个连续组织切片。

3. 方法

3.1. 连续切片配准

预处理。 在每个切片中，首先检测组织芯，进行旋转校正并裁剪。通过形态学开运算去除背景后，根据所有八个通道的归一化总和计算组织掩膜：将平滑图像的三角形阈值法结果与更粗略的 Otsu 前景结果取交集，再通过形态学闭运算和开运算进行清理。

两步配准。 首先基于 AKAZE 关键点对每个组织芯的切片进行仿射变换配准 [17], ，随后使用 RoMa v2 进行密集的非刚性细化。从中央切片开始，配准沿两个方向向外进行，将每个切片与其已完成配准的相邻切片对齐。组织掩膜执行相同的变换，并将关键点检测、质量评估和形变限制在组织区域内。

仿射对齐。 在对数拉伸后的PanCK通道中，检测组织掩膜内的AKAZE关键点（阈值10^{-4}），并使用Lowe比率检验（阈值0.8）进行匹配。使用MAGSAC [18] 估计变换，并通过对内点应用最小二乘法进行细化。这样，非刚性阶段只需处理较小的残余位移，因此可以对其施加严格的边界约束。

稠密细化。 由于 RoMa v2 是针对 RGB 数据设计的，我们将每个切片的多重免疫荧光通道融合为一张 RGB 图像。在我们对不同通道组合和预处理技术的测试中，将经限制对比度自适应直方图均衡化增强的 DAPI 和 PanCK 通道着色后求和，效果最佳 [19]。RoMa v2 以分辨率 1280×1280 生成位移网格，并为每个网格点给出一个置信度值；背景点和低置信度点（<0.75）的位移设为零，位移上限设为 80 像素（$40\,\mu$m），随后将网格上采样至全分辨率。

质量控制。 仅当某一阶段能提升配准效果时才予以保留，提升情况通过对数拉伸后的PanCK通道上的掩膜归一化互相关（NCC）进行衡量。如果仿射变换使NCC低于未配准图像对的NCC，则将其替换为恒等变换。

3.2. 三维细胞重建

由于数据具有很强的各向异性（体素尺寸为 $0.496\times0.496\times4.0\,\mu$m），直接使用Cellpose v4.0.8进行三维细胞分割效果不佳。因此，我们使用Cellpose v3.1.1. 2 [20] 和cyto3模型，在未配准的DAPI通道上进行二维细胞核分割，并使用去噪标记物将细胞核跨切片关联起来。

标记物去噪。 使用 3×3 微米中值滤波器对图像进行去噪。根据通道特定规则检测伪影（DAPI 使用形态学方法；其他通道使用高斯差分），随后进行修复并置零。使用形态学顶帽滤波器（DAPI/CD3/CD163 的半径为 $8\,\mu$微米；PanCK 为 $40\,\mu$微米）或宽尺度高斯模糊（CD31 为 $\sigma = 80\,\mu$微米；GAP43/NFP 为 $60\,\mu$微米）扣除背景。

跨切片细胞核连接。 由于切片厚度为 $4\,\mu$微米，单个细胞核可能出现在多个连续层片中。为构建三维表示，我们构建一张图，其中节点为二维细胞核掩膜，边连接相邻切片中重叠至少 30 像素的掩膜；边的权重为相连掩膜对的交并比（交并比）。由于预期细胞核在不同切片间的形状仅逐渐变化，因此，对于偏心率为 $\geqslant 0.5$ 的细长掩膜，若其长轴之间的夹角超过 $35°$，则移除相应边，因为这表明重叠的是不同细胞核。每个掩膜在每个相邻切片中仅保留得分最高的连接（交并比得分根据方向差异线性降权）。所得图的连通分量构成候选三维细胞核。跨越五个以上切片的分量会在得分最低的边处递归拆分，而最大二维掩膜小于 100 像素的分量则会被舍弃。

细胞分型。 将每个二维细胞核掩膜膨胀 4 个像素（$2\,\mu$m），以捕获细胞膜和细胞质中的表型标记物；并检测该区域内标记物的中位强度，依照有序规则列表进行判定，匹配首条规则即适用：T细胞（$CD3^{+}$）、神经相关细胞（$GAP43^{+}$ or NFP^{+}）、上皮/肿瘤细胞（$PanCK^{+}$）、内皮细胞（$CD31^{+}$）、巨噬细胞（$CD163^{+}$），否则归为未知。

标记物阈值为整个核心中各切片数值的中位数，采用Otsu方法（GAP43、NFP、PanCK）、固定阈值 200（CD31）或双峰高斯混合模型（CD3、CD163；若 $\Delta\text{BIC} \leq 6$, 则回退使用 Otsu方法）计算。若细胞扩展后的细胞核掩膜中有 $\geq 50\%$ 与根据 PanCK 阈值生成的、经形态学优化的 PanCK 掩膜重叠，则将该细胞标记为 PanCK 阳性。最终的三维细胞类型通过对阳性二维判定进行面积加权多数投票来确定。

3.3. 肿瘤微环境的统计表征

我们比较了四种成熟的肿瘤微环境表征指标[6, 12, 21]。二维指标按切片计算，三维指标则基于重建体积计算。

细胞类型比例。 细胞类型比例表示为五种特定分类细胞类别的相对密度。在二维中，密度为细胞核计数除以层片质心的凸包面积；该值按层片计算，并在各层片间取平均。在三维中，密度为重建后的细胞核总数除以凸包体积，每个组织芯样本得到一个数值。每种细胞类型的密度均以这五种类型的总密度进行归一化。

最近邻距离。 计算每个源细胞到最近目标细胞的欧氏距离（同类型细胞对不计自身），计算范围为切片内（二维）或重建体积内（三维）。按细胞类型对，对源细胞的距离取平均；二维数值先按切片取平均，再对各切片取平均，从而得到每个组织芯样本的单个二维数值。

邻域组成。 计算每个细胞周围 $30\,\mu\text{m}$ 内所有邻居的细胞类型香农熵，范围包括切片内（二维，圆盘）或重建体积内（三维，球体）。为避免边缘效应，仅评估堆栈中央 $12\,\mu\text{m}$ 范围内的细胞：二维中取中间三张切片，三维中取细胞中心距体积中央 z 平面不超过 $\pm 6\,\mu\text{m}$ 的细胞。按细胞类型对各细胞的熵取平均。

细胞接触。 将细胞核膨胀 $2\,\mu\text{m}$，并识别切片内（二维）或重建体积内（三维）膨胀后细胞之间的接触。按每对细胞类型汇总不同接触目标细胞的数量，再除以源细胞数量，包括没有接触的细胞。

4. 实验与结果

4.1. 配准评估

配准准确度通过目标配准误差（TRE）衡量，即配准后对应地标之间的欧氏距离。领域专家在四个组织芯相邻切片上标注了284对地标。由于地标是由人工标注在同一细胞核的不同横截面上的，即使配准完美，TRE也不一定为零。

表 1：四个标注组织芯中 284 对由专家标注的标志点对的目标配准误差（TRE）：配准前（原始）、仿射对齐后、仿射与可变形对齐后（本方法）以及使用 VALIS [11] 时。

指标	**Raw**	仿射变换	**Our**	VALIS
TRE 均值（μ米）	25.03	4.86	**2.59**	3.03
TRE 标准差（μ米）	28.86	3.81	**2.79**	4.60
TRE 中位数（μ米）	20.89	3.62	**1.79**	1.81
TRE 第90百分位数（μm）	39.71	8.99	**4.27**	5.49
最大 TRE（μm）	335.98	26.43	**22.91**	35.62

我们将完整处理流程与其单独的仿射阶段以及 VALIS [11] 进行比较。比较中，我们使用默认设置的 VALIS v1.2.0；相邻切片先通过 VGG 特征和 VALIS 标准匹配器进行配准，再使用 LightGlue 匹配的 DISK 特征进行配准。随后使用 MAGSAC 筛选对应点，以估计相邻切片间的相似变换，最后通过 VALIS 光流变形器进行非刚性配准。

表 1 总结了结果。稠密细化将 TRE 中位数从仅使用仿射变换时的 3.62 降至 1.79 μm（∼3.5 像素），接近人工标注精度的极限。我们的处理流程与 VALIS 的 TRE 中位数相近（1.79 对比 1.81 μm），但我们的平均误差、最大误差和第90百分位误差更低（4.27 对比 5.49 μm），且 90% 的误差远低于典型细胞核直径，表明较大的配准失败更少，并证实了单细胞空间统计所需的亚细胞精度。

4.2. 三维细胞重建

在 24 个组织芯中，我们分割出 4 787548 个细胞核，其中 45.9% 在多个切片之间建立了关联。关联的细胞核平均跨越 2.62 个层片，与厚度为 $4\,\mu\text{m}$、细胞核直径为 $\sim 7\,\mu\text{m}$ 时的理论值 ≈ 2.75 相符。在未关联的 54.1% 单切片细胞核中，大多数（30.1%）具有足够的空间重叠（$\geq$30px），但未达到我们保守的关联标准。其余细胞核的空间重叠不足（12.0%）、位于堆栈边界（9.3%），或无法匹配（2.7%）。因此，多切片细胞计数代表真实多切片细胞数量的预测下限。类型判定一致性，即投票切片均为同一类型的多切片细胞所占比例，会随着深度增加而降低：跨越 2–5 个切片的细胞分别为 81.3%、71.3%、63.7% 和 58.8%。

4.3. 肿瘤微环境在二维和三维中的统计表征

细胞类型比例。表2比较了全部24个组织芯中重建的三维体积与二维切片估算的细胞类型比例。两种视角高度一致：所有细胞类型的每个组织芯平均差异最多为1.2个百分点，而且三维比例几乎完美地反映了

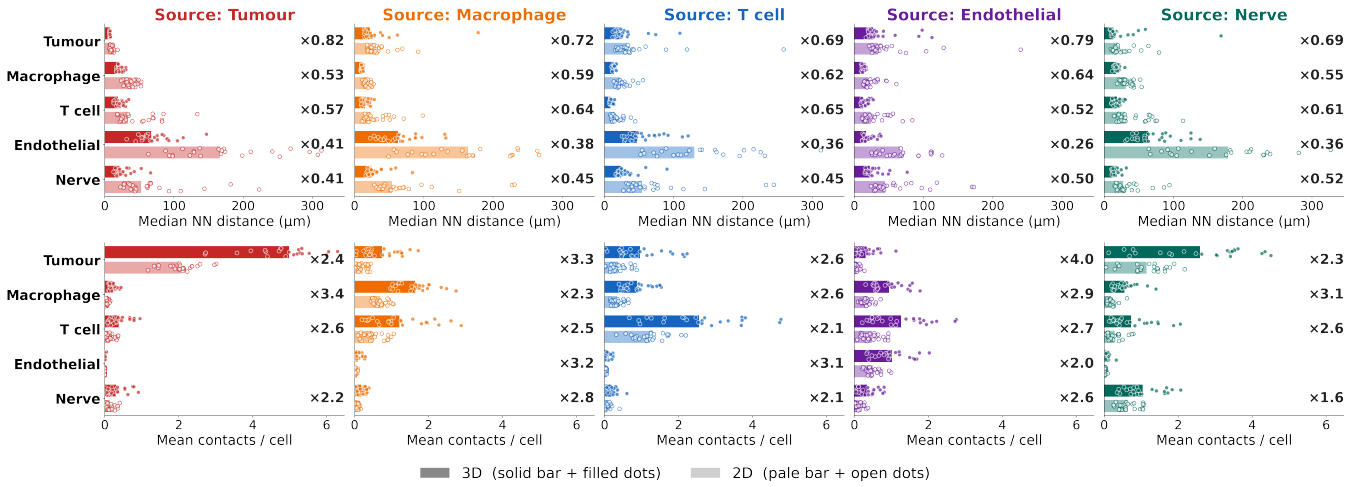


图1：24个组织芯中，每种源细胞类型（列）与目标细胞类型（行）的中位最近邻距离（上）和三维与二维中的平均每细胞接触数（下）。

二维所捕捉到的组织芯间变异（$r \geqslant 0.99$）。这对于主要细胞群（肿瘤细胞）和次要细胞群（内皮细胞和神经细胞）均成立。

最近邻距离。如图1（上）所示，对于每一对源细胞类型与目标细胞类型，三维中的最近邻距离均短于二维。缩短幅度因细胞类型而异。与数量最多的肿瘤细胞之间的距离缩短幅度最小，其次是T细胞和巨噬细胞。与数量最少的两类细胞——内皮细胞和神经相关细胞——之间的距离缩短幅度最大。内皮细胞对之间的距离降幅最大（三维/二维比值为0.26）。

邻域组成。表2总结了所有组织芯中各细胞类型的相对邻域熵变化。每个组织芯、每种细胞类型在三维中的熵都更高，这表明三维体积能够捕捉到更多样化的细胞微环境。差异同样取决于细胞类型，相对差异中位数从内皮细胞的+12.6%到肿瘤细胞的 +18.7%不等。

表2：24个组织芯的三维重建与二维切片中的细胞类型比例及相对邻域熵变化。细胞类型比例：每个组织芯占比的均值±标准差，Δ = 3维 − 2维，三维与二维的 r = 皮尔逊相关。熵变化：每个组织芯相对变化的中位数 [四分位距]；对于每种细胞类型，每个组织芯中的三维熵均高于二维。

	细胞类型比例				熵变化
细胞类型	三维（%）	二维（%）	Δ(百分点)	r	中位数 [四分位距] (%)
肿瘤	$50.5_{\pm 19.2}$	$51.4_{\pm 19.2}$	−0.9	1.00	+18.7 [14.4, 23.3]
巨噬细胞。	$17.6_{\pm 8.3}$	$16.5_{\pm 8.3}$	+1.2	0.99	+14.2 [11.1, 17.7]
T细胞	$24.5_{\pm 16.3}$	$24.5_{\pm 16.7}$	0.0	1.00	+14.3 [11.3, 16.3]
内皮细胞.	$1.3_{\pm 1.0}$	$1.1_{\pm 0.9}$	+0.2	0.99	+12.6 [10.0, 17.2]
神经	$6.1_{\pm 4.5}$	$6.4_{\pm 4.9}$	−0.4	0.99	+14.8 [12.3, 20.6]

细胞接触。如图1（底部）所示，三维中的细胞接触数量始终高于二维。在不同细胞类型对中，三维分析得到的每个细胞接触数是二维分析的1.6至4.0倍，其中肿瘤–肿瘤接触的绝对差异最大。

5. 讨论与结论

我们的配准流程误差远小于细胞核直径，因此能够跨切片追踪细胞核并提取三维空间统计。研究结果表明，尽管单个二维切片能够可靠地估计细胞类型比例，却会错误呈现微环境中的空间关系。

这种差异主要源于切片平面之外的细胞，而体积分析能够捕捉这些细胞。差异的程度取决于各细胞类型的结构排列：内皮细胞之间较短的三维距离可能反映了血管跨切片的连续性；而肿瘤细胞中较高的邻域熵和更多的同型接触，则与延伸跨越多个切片的致密结构相符。由于这些偏差取决于局部几何结构，全局立体学校正不太可能消除它们。由于这些偏差在对多个切片取平均后仍然存在，增加二维采样也无法消除它们。因此，应谨慎解读源自单张切片的空间生物标志物。

仍有两项局限。首先，对于跨越多个切片的细胞，表型一致性会降低，这反映了关联错误、批次效应或生物标志物变异。其次，堆栈深度有限（60 至 80 μm），导致邻域被截断，从而高估了到稀有细胞类型的三维距离；因此，报告的二维偏差可能是保守估计。未来的研究将采用更深的体积数据，根据体积真实值进行验证，并探索用于校正单切片统计的模型。

道德规范合规声明

本研究采用人类受试者数据进行回顾性研究。队列分析已获瑞典乌普萨拉区域伦理审查委员会批准（2012/532）。

致谢

我们声明不存在利益冲突。本研究由瑞典癌症协会项目 25 4871 Pj 和 25 4859 Pj、瑞典研究理事会资助项目 2022-03580，以及 SciLifeLab 与瓦伦堡 DDLS 计划（资助编号 KAW2024.0159）提供支持。计算工作使用了国家超级计算中心的 Berzelius 计算资源，该资源由克努特与爱丽丝·瓦伦堡基金会提供。

AI 使用情况。作者使用 Claude（包括 Claude Opus 5.5 和 Sonnet 4.6，Anthropic）进行语言润色、结构校对、精简作者撰写的文本，以及生成样板代码片段。这些工具未用于设计方法、生成或分析数据，也未用于得出结果。所有内容均经作者审阅和编辑，作者对本文承担全部责任。

参考文献

[1] J. Galon 等，“癌症免疫监视的连续谱：预后、预测和机制特征”，《*Immunity*》，第 39 卷，第 1 期，第 11–26 页，2013 年。[2] S. Lu 等，“预测 PD-1/PD-L1 检查点阻断疗效的生物标志物类型比较：系统综述与荟萃分析”，《*JAMA Oncology*》，第 5 卷，第 8 期，第 1195–1204 页，2019 年 8 月。[3] T. Semba 和 T. Ishimoto，“利用当前多重成像技术对癌组织进行空间分析，以实现分子表征”，《*British Journal of Cancer*》，第 131 卷，第 1737–1747 页，2024 年。[4] M. Sorin 等，“肺肿瘤免疫微环境的单细胞空间图谱”，《*Nature*》，第 614 卷，第 7948 期，第 548–554 页，2023 年 2 月。[5] A. Mezheyeuski、M. Backman M、J. Mattsson 等，“反映肿瘤微环境促肿瘤与抗肿瘤平衡的免疫评分具有重大预后影响，并可预测实体癌的免疫治疗应答”，《*EBioMedicine*》，第 88 卷，104452 页，2023 年 2 月。[6] L. Kuett 等，“用于组织和肿瘤微环境的高通量多重分子与细胞图谱绘制的三维成像质谱流式技术”，《*Nature Cancer*》，第 3 卷，第 122–133 页，2022 年。[7] W. Cho、S. Kim 和 Y.-G. Park，“迈向三维组织的多重免疫荧光”，《*Molecular Brain*》，第 16 卷，第 37 页，2023 年。

[8] H. J. G. Gundersen 等，“新型立体学工具：解剖体法、分数器、核计数器和点抽样截距法，以及它们在病理学研究与诊断中的应用”，《*APMIS*》，第 96 卷，第 7–12 期，第 857–881 页，1988 年。

[9] C. Yapp 等，“人类肿瘤中细胞状态和免疫生态位的高通量三维分析”，《自然·方法》，第 22 卷，第 2180–2193 页，2025 年。

[10] A. Kurz 等，《基于组织病理学切片的三维重建：系统综述》，实验室研究，第104卷，第6期，第102049页，2024年。

[11] C. D. Gatenbee 等，《面向多吉像素全视野切片图像的病理图像序列虚拟对齐》，《自然·通讯》，第14卷，第4502页，2023年。

[12] S. Ghose、Y. Ju、E. McDonough 等，《皮肤三维重建及免疫细胞密度、血管距离以及日晒和衰老影响的空间映射》，《通信生物学》，第6卷，第718页，2023年。[13] A. L. Kiemen 等，《CODA：大型组织的细胞分辨率定量三维重建》，《自然·方法》，第19卷，第1490–1499页，2022年。[14] D. Schouten、J. van der Laak、D. Somford 等，《利用 RAPID 对吉像素全包埋组织病理学标本进行三维重建》，《科学报告》，第16卷，第15649页，2026年。[15] J. Edstedt 等，《RoMa：鲁棒密集特征匹配》，载于*CVPR*，2024年，第19790–19800页。[16] J. Edstedt、D. Nordstr¨om 等，《RoMa v2：更强、更好、更快、更密集的特征匹配》，载于*ECCV*。《计算机科学讲义》第*17045*卷，2026年。[17] L. Kalms、K. Mohamed 和 D. G¨ohringer，《在 FPGA 上加速嵌入式 AKAZE特征检测算法》，载于*HEART*会议论文集，2017年。[18] D. Bar´ath 等，《MAGSAC++：一种快速、可靠且准确的鲁棒估计器》，载于*CVPR*，2020年，第1301–1309页。[19]S. M. Pizer、R. E. Johnston、J. P. Ericksen 等，《对比度受限自适应直方图均衡化：速度与效果》，生物医学计算可视化会议论文集，第337–345页，1990年。[20] C. Stringer、T. Wang、M. Michaelos 和 M. Pachitariu，《Cellpose：一种通用细胞分割算法》，《自然·方法》，第18卷，第100–106页，2021年。[21] M. Backman 等，《非小细胞肺癌肿瘤微环境的空间免疫表型分析》，《欧洲癌症杂志》，第185卷，第40–52页，2023年。