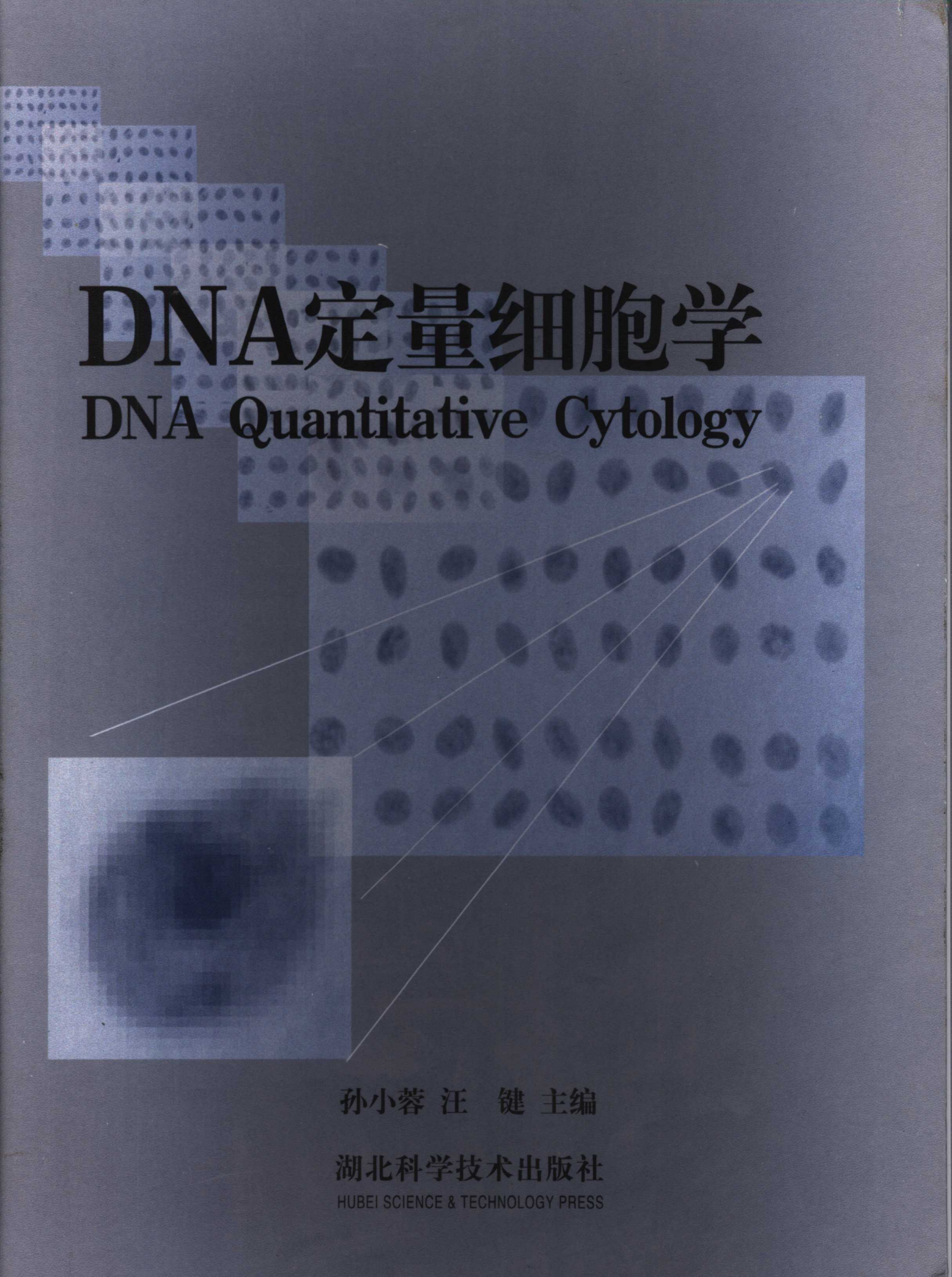


The background of the cover is a microscopic image of cells, likely stained for DNA. A semi-transparent grid is overlaid on the image, with some cells highlighted in a lighter blue. Three thin white lines originate from a point on the right side of the grid and extend towards the bottom left corner, passing over the title and subtitle.

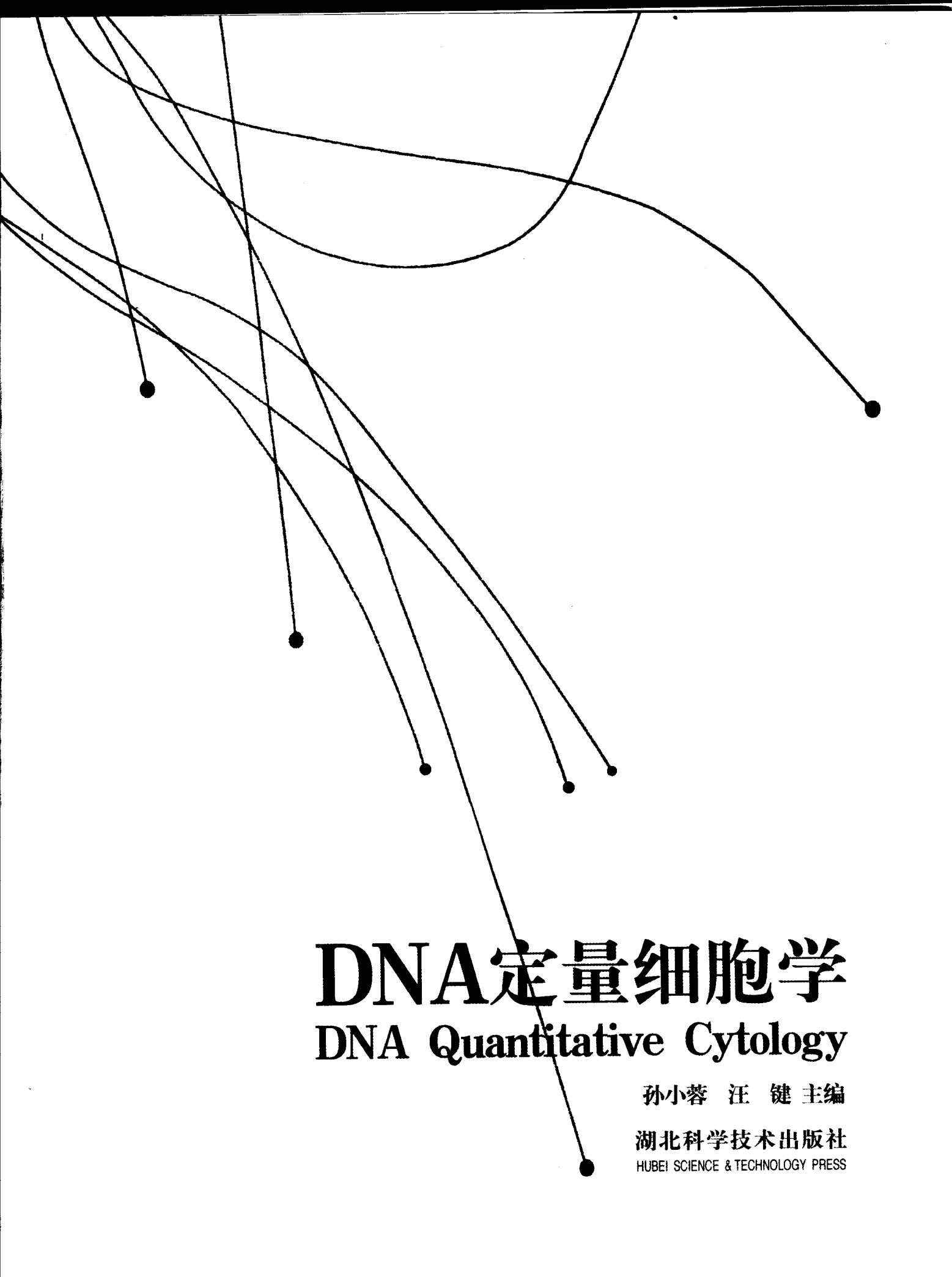
DNA定量细胞学

DNA Quantitative Cytology

孙小蓉 汪 键 主编

湖北科学技术出版社

HUBEI SCIENCE & TECHNOLOGY PRESS



DNA定量细胞学

DNA Quantitative Cytology

孙小蓉 汪 键 主编

湖北科学技术出版社
HUBEI SCIENCE & TECHNOLOGY PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

DNA定量细胞学/孙小蓉, 汪键主编. —武汉: 湖北科学技术出版社, 2006. 3

ISBN 7-5352-3488-7

I. D… II. ①孙…②汪… III. 脱氧核糖核酸-定量分析-临床应用 IV. R4

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第013970号

DNA定量细胞学

© 孙小蓉 汪键 主编

责任编辑: 武又文

封面设计: 王 梅

出版发行: 湖北科学技术出版社

电话: 87679468

地 址: 武汉市雄楚大街 268 号湖北出版文化城 B 座 12-13 层

邮编: 430070

印 刷: 武汉中远印务有限公司

邮编: 430034

880毫米×1230毫米

16开

10.5印张

4 插页

280千字

2006年3月第1版

2006年3月第1次印刷

ISBN 7-5352-3488-7/R·825

定价: 180.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

《DNA 定量细胞学》编委名单

主编 孙小蓉 汪 键

编委 (按字母、笔画顺序排列)

Alfred Bocking Bronka Palcic 车东媛

刘 燕 孙小蓉 汪 键 周厚纶

晏想成 涂洪章 黄红彦

内 容 提 要

细胞 DNA 定量分析诊断临床应用及研究是一本内容详实、新颖,可读性强的专著。全书共有 11 章,1 至 2 章主要介绍了 DNA 定量细胞学的基本原理和常用方法;3 至 11 章分别介绍了 DNA 定量细胞学在宫颈癌、口腔鳞癌、头颈部肿瘤、颈部淋巴结肿大、乳腺癌、胃癌、肺癌、泌尿系肿瘤、胸腹积液中的临床应用及研究。该书可供医院、医学院校、研究院所从事临床工作和相关研究的工作者、研究生和大学生的参考。

序

当孙小蓉医生及汪键医生邀请我为他们所著的 DNA 定量细胞学的书撰写前言时,我颇为惶恐,鄙人只会说寥寥几句中文。更为糟糕的是,对汉字大字不识一个。然而,基于我与这两位杰出的科学工作者和临床医生长期的友谊,同时考虑到出版这样一本书的重要性,我还是接受了这一挑战。

有关这类书籍在世界上多个语种已有出版,我很欣喜地看到第一本有关 DNA 定量细胞学的书在中国的出版。与许多其他领域一样,中国人民也已逐渐处于多个行业的领军地位,大胆开发着处女地。

作者在此书的编排可谓独到。前两章作者介绍了定量细胞学的基本原理,回顾了根据估计 DNA 细胞倍体状态的诊断方法。作者罗列了大量的运用于恶性组织的实例,如宫颈癌,口腔癌,头颈癌,乳腺癌,胃癌,以及肺癌。作者亦讨论了淋巴结针吸方式和尿样的运用。

作者的工作是全身心致力于强调和推广早期检测及筛查诊断癌症的重要性,书中对癌症的早期病灶的描述令此书对于细胞病理工作者更具吸引力,尤其是从事恶性疾病诊断的细胞病理工作者。作者展示了大量临床事例,该书无论从文字还是图表,都极为浅显易懂。

两位医生是不折不扣的该领域的先锋。他们的最卓越的成就不只局限在新方法探索,老方法的改良,更重要的是,他们把实验室中的种种理论性的成就成功地运用到了常规的临床实践中。我对他们二位多年来在科研及临床工作中所取得的卓越成就深表敬意。同时,仅借此机会,也向他们二位取得的醒目成绩致以由衷的祝贺。

Branko Palcic

Branko Palcic 博士

British Columbia 大学病理学及物理学教授

BC 肿瘤研究所资深研究员

2006 年元月于加拿大温哥华

Foreword

When I was asked by Dr. Xiao Rong Sun and Dr. Jian Wang to write a foreword to their book about DNA Quantitative Cytology, I was very worried as I only know a few words in mandarin language. Worst still, I do not know any Chinese characters. Nevertheless, I accepted this challenge due to my long – term friendship to these two excellent scientists and clinicians as well as due to the importance of publishing such book.

A book on this subject has been long overdue in any language. It gives me great pleasure to see that first such book is being published in China. As in many other fields, the Chinese people are starting to lead the way into future by boldly plowing into uncharted waters.

The authors have made an excellent choice of the key topics. In the first 2 chapters they addressed the principles and review of the methods of quantitative cytology based on the assessment of the DNA ploidy status of the cells. Then they give numerous examples of its use in different tissue malignancies such as uterine cervix, oral cancer, head and neck cancer, breast cancer, stomach cancer, and lung cancer. They also discuss use in fine needle aspirates of lymph nodes and urine samples.

Throughout their work they emphasize the importance of this approach to detection and better diagnosis of early cancers and pre – cancerous lesions which makes this book even more interesting to cyto – pathologists that are interested in objective diagnosis of malignant diseases. They show numerous examples that are very easy to understand and follow both in text and illustrations.

Dr. Xiao Rong Sun and Dr. Jian Wang are true pioneers in this field. Their largest contribution has been not only in the discoveries of the new and improved methods, but even more importantly, how to bring these methods to routine clinical applications. I have been admiring their scientific and clinical work for many years and I congratulate both of them on this excellent achievement.

Branko Palcic

Dr. Branko Palcic, Professor Pathology and Physics,
University of British Columbia and Senior Scientist, BC
Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada.

前 言

细胞学检查方法是多年来逐渐发展、成熟起来的一种检测诊断技术。这种技术主要用于肿瘤的诊断和鉴别诊断,为临床医学事业的发展作出了重大贡献。宫颈细胞学检查是最常见的细胞学检查方法之一。该方法是通过细胞学技术员或细胞学医生在显微镜下对成千上万个细胞观察后作出诊断。由于每一个细胞技术员或细胞学医生水平不一,以及镜下观察时的视觉疲劳,不可避免地造成一些误诊和漏诊。从20世纪60年代开始,人们就试图用仪器代替人来测定宫颈细胞。最初 Airborne 仪器实验室设计出了 Cyto Analyzer 自动细胞测定仪,它可测定荧光染色后玻片上不正常 DNA 含量的细胞。其原理是通过比较正常和不正常细胞核的大小、形态等指标来区别不同类别的细胞。但其临床试验不成功,主要原因有宫颈细胞涂片质量不好、计算机功能不足、价格昂贵及对不正常细胞形态及观念理解不清等。

长期以来,宫颈细胞学检查采用木制小脚刮板取材,然后将宫颈刮取物直接涂在玻片上。这样容易造成涂片厚薄不均,细胞往往聚集成团,重叠较多,粘液和炎性细胞成分也很多。这些原因可导致15%~30%的假阴性。20多年来,多种宫颈取材器和多种细胞制片技术尤其是液基薄层技术的出现,克服了以上这些缺陷,使细胞能单层分布在玻片上,从而提高了制片的质量和细胞病理医生阅片的效率。

如何将细胞病理医生的专业知识转变成计算机软件,是研究和制造自动细胞定量测量仪器很重要的一步。早期由于计算机的功能不发达,计算和储存能力有限,不能很好地模拟人的思维。随着计算机技术的革命,尤其是20世纪80~90年代高性能、低价位的计算机的产生,使自动细胞定量测定技术翻开了新的一页。从此,研发自动细胞定量仪的实验室和公司像雨后春笋一样在西方国家出现。我国在20世纪90年代也有很多公司生产出细胞图像分析仪,但大多为手动,自动系统较少。

自1943年以来,宫颈细胞学大多采用巴氏五级分类方法。通过长期实践,巴氏分类法还存在很多不足,例如,没有与组织病理学相对应的术语,分级范围过宽以及对临床缺乏明确的指导意义。因此,从1988年开始,国际通用的TBS分类法逐渐取代了巴氏分类法。临床上用TBS报告来指导临床处理和治疗。

除了以上原因外,还有另外几个方面的原因推动了自动细胞图像分析系统在国外的发展。首先,从经济方面考虑,在西方国家的细胞技术员和细胞病理医生收入均较高,若用机器分析取代人工阅片可降低成本,为政府和保险公司节省大量开支;其次,细胞技术员的培养需大学毕业后2~3年专业学校的培训,并且由于工作枯燥,很多细胞技术员最终选择改行而造成细胞技术员的缺乏,采用自动细胞图像分析系统则可弥补这一缺陷。

目前自动细胞定量分析设计模式有两种:第一种是将染色玻片进行机器扫描,然后机器自动作出诊断,这就是所谓的暗箱式(Black box)分析仪;第二种是玻片经机器扫描后,可疑的细胞被挑选出来,然后再经过细胞技术员或细胞医生核实,最终做出诊断。

根据细胞染色方法的不同,自动细胞定量分析系统分为两类:第一类为巴氏染色或常规染色后通过细胞形态分析、比较、测定而将可疑的细胞图形提取出来,再由细胞技术员或

细胞医生观察这些细胞而作出诊断,这样就提高了细胞技术员和细胞医生阅片的效率。目前在临床上使用的 Papnet 和 Thinprep 系统归于这一类。第二类为 DNA 染色后再通过细胞核的 DNA 含量和形态的测定作出细胞定量分析的直方图,细胞技术员或细胞病理医生根据 DNA 定量分析结果,结合常规细胞学检查而作出诊断。

DNA 染色方法有 Feulgen 染色和抗体荧光染色。Feulgen 染色后玻片用白光自动细胞图像分析仪测定(DNA Image Cytometry, DNA - ICM),如加拿大温哥华 AcCell 系统和中国兰丁 MOTIC 系统;抗体荧光染色多用荧光或激光自动细胞图像分析仪测定。细胞 DNA 图像分析系统不仅用于宫颈细胞学检查还可用于其他细胞学检查。

国内也发展了一些自动细胞图像系统,由于硬件和软件的限制,多停留在研究或发放图文报告上,用于临床诊断则较少。自 1999 年开始,我们引进加拿大 Cyto - Savan 系统,主要做痰细胞学 MAC 检查方法用于发现肺癌高危人群早期的癌变,后来做肺癌和非肺癌病变的鉴别诊断,在这方面我们已积累了 2 000 多的病例。从 2001 年开始,武汉市政府科委与加拿大 BC 肿瘤研究所联合在武汉市开始做妇女宫颈癌的普查工作,这样就引进了 Ac-Cell 系统。与 Cyto - Savan 软件相似,但经过一些改进,可适合做宫颈等脱落细胞 DNA 含量检查。为了降低成本,兰丁 MOTIC 公司在国内率先生产出兰丁 MOTIC 全自动 DNA 定量分析系统,通过 4 年多的临床实践,我们已检测了 8 000 多例各种胸腹积水病例;2 000 多乳腺、甲状腺、淋巴结等包块穿刺病例;还与多所大学、研究所和医院开展了胃癌、肺癌、鼻咽癌等研究;尤其我们与武汉市计划生育委员会、湖北省计划生育委员会结合,在湖北省内对 50 000 多名妇女开展了宫颈癌细胞普查工作,发现了几百名患有宫颈癌和癌前病变的妇女,使这些妇女及时得到了治疗。

近几年来,通过对我们所做的工作进行总结,在国内外多个专业刊物上发表了我们的研究成果。本书主要目的是将 DNA 细胞定量学的基本原理、方法和临床运用等介绍给国内同行。另外,书中插有很多图片,其中包含有 DNA 定量细胞学和常规细胞学两种诊断,以便加深读者对 DNA 倍体分析诊断的理解和认识。书中少数内容已发表过,大多内容尚未发表。与其说是一本书,倒不如说成是一本论文集。

本书在编写过程中得到了很多专家、教授的指导和建议。在此,特别要感谢的是加拿大 BC 肿瘤研究所的 Branko Palcic 教授、德国 Heinnick Heine 大学细胞病理学院 Alfred Bocking 教授、华中科技大学同济医学院病理系车东媛教授、邓仲端教授、湖北省肿瘤医院病理科毛永荣教授对本书的支持和帮助。本书作者还要感谢武汉兰丁肿瘤早期诊断检测中心的全体员工。还要感谢李耀辉女士、李黎女士、李丹女士、卢敏女士、汪俊先生、干定云先生和胡顺则先生,他们参与了本书的编写和排版工作。

孙小蓉
2006 年 2 月

目 录

第 1 章 DNA 定量细胞学基本原理	(1)
一、细胞生长周期	(1)
二、DNA 含量	(2)
三、全自动 DNA 图像系统的基本结构	(3)
四、影响细胞核内 DNA 含量测定的因素	(4)
(一)标本因素	(4)
(二)DNA - ICM 系统因素	(4)
五、质控和标准	(4)
(一)标本的准备和染色	(5)
(二)DNA - ICM 用于测定 DNA 含量时的要求	(5)
(三)密度计的测量	(5)
(四)质控细胞	(5)
(五)DNA - ICM 的 c 刻度的确定	(6)
(六)运用标准	(6)
(七)DNA 含量的直方图可用于诊断和预测肿瘤	(6)
六、肿瘤细胞生长及染色质的变化	(6)
七、DNA - ICM 在测定肿瘤中的应用	(6)
(一)整倍体肿瘤	(6)
(二)非整倍体细胞肿瘤	(7)
(三)DNA - ICM 的局限性	(9)
(四)DNA - ICM 测定肿瘤的意义	(9)
八、DNA - ICM 与流式细胞仪的比较	(9)
九、非整倍体生物学命名体系	(9)
第 2 章 DNA 定量细胞学常用的方法	(16)
一、取材及标本制备	(16)
(一)宫颈细胞取材器	(16)
(二)痰取材	(17)
二、制片	(18)
(一)直接涂片和液基薄层制片	(18)
(二)细针穿刺涂片	(20)
(三)沉淀离心制片	(20)
(四)组织印片	(20)
(五)酶消化细胞制片	(20)
三、染色	(20)
(一)巴氏染色	(20)
(二)HE 染色	(21)
(三)瑞氏染色	(22)

(四) Feulgen 染色	(22)
四、免疫组化染色步骤	(26)
五、常用计算方法及统计方法	(26)
(一) DNA 图像分析仪常用计算方法	(26)
(二) 细胞病理学常用统计公式	(26)
(三) 专业统计	(27)
第 3 章 宫颈癌	(29)
一、宫颈癌好发部位及病因	(29)
(一) 好发部位	(29)
(二) 病因	(29)
二、宫颈上皮癌前病变、宫颈癌的细胞和组织学改变	(30)
(一) 组织学改变	(30)
(二) 细胞学改变	(30)
三、生物学背景	(32)
四、DNA - ICM 对宫颈病变的临床应用	(34)
(一) 宫颈癌及癌前病变的诊断	(34)
(二) 宫颈癌恶性度评估	(37)
(三) 对宫颈疾病发展趋向的预测	(40)
(四) 弥补细胞病理形态学诊断的不足	(44)
(五) 对宫颈癌疗效的评估	(45)
五、DNA - ICM 用于宫颈病变的诊断意义及处理原则	(55)
(一) 影响细胞 DNA 定量测定的因素	(55)
(二) DNA 倍体分析系统在诊断宫颈疾病中的常见情况	(55)
(三) 处理原则	(58)
六、宫颈活检的组织病理学诊断	(58)
(一) 材料和方法	(59)
(二) 结果与讨论	(59)
七、宫颈癌的普查意义	(80)
第 4 章 口腔鳞癌	(85)
一、概述	(85)
二、细胞学和 DNA 图像分析系统对早期口腔肿瘤的诊断	(86)
(一) 材料和方法	(86)
(二) 结果	(89)
(三) 讨论	(90)
(四) 结论	(92)
第 5 章 头颈部肿瘤 DNA 的定量分析	(95)
一、常见头颈部肿瘤	(95)
(一) 良性肿瘤	(95)
(二) 恶性肿瘤	(95)
二、DNA - ICM 用于头颈部肿瘤的诊断	(96)
(一) 材料和方法	(96)
(二) 结果	(96)

(三)讨论	(97)
第6章 颈部淋巴结穿刺细胞 DNA 倍体分析	(100)
一、颈部常见淋巴结肿大	(100)
(一)良性改变	(100)
(二)恶性改变	(100)
二、DNA 倍体分析系统用于颈部淋巴结肿大的诊断	(101)
(一)病例来源	(101)
(二)结果	(101)
(三)讨论	(101)
第7章 乳腺癌	(109)
一、乳腺癌常见组织学类型及细胞学特征	(109)
(一)乳腺癌常见组织学类型	(109)
(二)乳腺癌针吸细胞学特征	(109)
二、DNA 倍体分析系统在乳腺包块针吸细胞学诊断中的应用	(110)
(一)材料与方法	(110)
(二)结果	(113)
(三)讨论	(114)
第8章 DNA 图像分析系统检测胃黏膜上皮非整倍体细胞	(117)
一、常见胃癌	(117)
二、DNA - ICM 用于胃癌诊断	(117)
(一)材料和方法	(117)
(二)结果与讨论	(118)
第9章 高分辨率 DNA 细胞图像分析仪可提高痰肺癌细胞阳性检出率	(122)
一、肺癌的细胞病理学	(122)
(一)鳞状细胞癌	(122)
(二)肺腺癌	(122)
(三)未分化小细胞癌	(122)
(四)未分化大细胞癌	(123)
(五)腺鳞癌	(123)
二、DNA 倍体分析系统用于肺癌的诊断	(123)
(一)材料及方法	(123)
(二)结果	(125)
(三)讨论	(127)
第10章 DNA 倍体分析仪用于泌尿系肿瘤的检测	(130)
一、泌尿系常见肿瘤	(130)
(一)肾肿瘤	(130)
(二)膀胱肿瘤	(130)
(三)输尿管肿瘤	(131)
(四)前列腺癌	(131)
二、DNA - ICM 用于泌尿系肿瘤的诊断	(131)
(一)材料与方法	(131)
(二)结果与讨论	(131)

第 11 章 用全自动细胞图像分析仪诊断胸腹腔积液	(136)
一、概述	(136)
二、DNA 图像分析系统用于胸腹积水的诊断	(136)
(一)材料和方法	(136)
(二)结果	(137)
(三)讨论	(148)
英文索引	(150)
汉语索引	(153)

第 1 章

DNA 定量细胞学基本原理

DNA 定量细胞学主要通过对细胞核内 DNA 含量或倍体的测定来判断细胞的生理状态和病理改变。它与流式细胞仪一样,已广泛运用于科研和临床工作中。

一、细胞生长周期 (cell cycle)

细胞生长周期是指一个细胞经过 DNA 合成、有丝分裂后成为二个子代细胞的过程。细胞周期可分为染色体周期和细胞浆周期。染色体周期主要是指细胞核内 DNA 成倍合成,再经有丝分裂将合成后的 DNA 均等地分裂到二个子代细胞的过程。细胞浆周期是指细胞浆内成分分为均等两部分而随细胞分裂过程中分布到两个细胞中去。

细胞生长周期中,DNA 成倍合成,即 23 对染色体合成为 46 对染色体,这个过程称为 DNA 合成过程 (DNA synthesis),又称 S 期 (S - phase)。DNA 有丝分裂 (mitosis) 是指细胞核内染色体平分为两部分,随之进行细胞分裂 (cytokinesis) 而成为两个姊妹细胞。由于有丝分裂和细胞分裂过程在细胞生长周期中只占很短时间,故将这二个过程合称为 M 期 (M - phase)。从 M 期结束到 S 期开始之间的间隙称为 G_1 期 ($G = \text{Gap}, G_1 - \text{phase}$),又称 DNA 合成前期,染色体为 23 对。从 S 期结束到 M 期开始的间隙称为 G_2 期 ($G_2 - \text{phase}$),称 DNA 合成后期,染色体为 46 对 (图 1 - 1)。细胞核内染色体数量在细胞生长不同时期是变化的,即 G_1 期 (23 对染色体) $\rightarrow$ S 期 (23 对 $\sim$ 46 对染色体) $\rightarrow$ G_2 期 (46 对染色体) $\rightarrow$ M 期 (46 对染色体 $\sim$ 23 对染色体)。

细胞生长周期还能分为间隙期 (Interphase) 和分裂期 (Division)。间隙期包括 G_1 期、S 期、 G_2 期。分裂期主要指 M 期。

不同细胞,生长周期的长短是不一致的,如青蛙的胚胎细胞可在不到 1 小时内发生一个周期,而人的某些肝细胞有时可表达一年以上。细胞生长周期中的长短是不一致的,一般说来,M 期在整个细胞生长周期内所占时间最短,约占整个细胞生长周期的 5% $\sim$ 10%。S、 G_2 期时间比较稳定。 G_1 期的长短就有很大的不同,有些细胞在 G_1 期不再向前发展,处于相对停止状态,这种细胞所处的时期为 G_0 期。处于 G_0 期的细胞在机体需要时再进入细胞生长周期而进行有丝分裂。因此, G_0 期的细胞核内含有 23 对染色体。

正常情况下,机体内的细胞大多数处于 G_0 期,只有少数 (10% 以下) 进入细胞生长周期。细胞数量在不同细胞生长周期内的分布如图 1 - 2。

大多数细胞在 G_0 、 G_1 期,即染色体对数为 23 对,又称为 DNA 二倍体 (diploidy 或 2c 细胞)。少数细胞在 S 期 (染色体对数在 23 对至 46 对之间)、 G_2 期 (染色体为 46 对,4 倍体细胞 tetraploidy, 4c 细胞) 和

M 期。

在正常人体细胞中,DNA 含量是一致的,即为整倍体。只有以下三种情况才出现非整倍体细胞 (Aneuploid cells): 生殖细胞,如精子,卵子细胞为单倍体; S 期细胞,DNA 含量在 2 倍体和 4 倍体之间,一般细胞很少; 某些丢失了 DNA 片段的退变细胞。

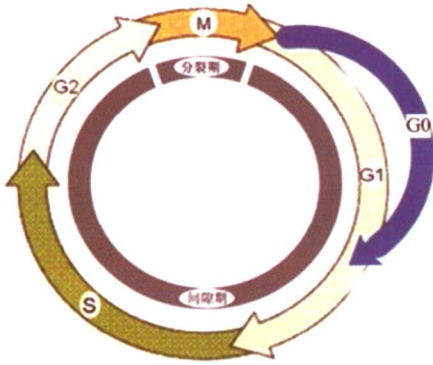


图 1-1 G₁为合成前期,S 为合成期,G₂为合成后期,M 为有丝分裂期。G₁/G₀、S 和 G₂组成间期

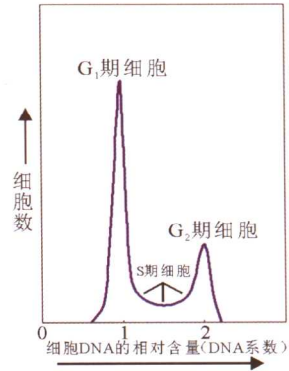


图 1-2 正常细胞生殖周期细胞数与细胞 DNA 含量关系分布图

二、DNA 含 量

23 对染色体约为 7.18pg。但在定量细胞学上细胞核的 DNA 含量并不是直接测定出来的,也不是一个绝对的数量。DNA 定量细胞学常用 c(content) 作为单位来衡量 DNA 含量。1 个 c 为正常 G₀/G₁ 细胞 DNA 含量的一半,故 G₀/G₁ 细胞为 2c 细胞(2 倍体细胞),而 G₂/M 细胞为 4c 细胞(4 倍体细胞)。

DNA-ICM 是通过测定染色细胞核的 IOD(integrated optical density)来判断细胞核的含量的。由于 DNA 含量是由二维结构测定的,它不完全反映染色质的倍数(图 1-3)。为了避免以上的差别,在测定 DNA 含量时,用 DNA 指数(DNA index)来表示 DNA 含量,即:

$$\text{DNA 指数} = \frac{\text{被测细胞 DNA IOD 值}}{\text{正常细胞 DNA (G}_0\text{/G}_1\text{ 期) IOD 平均值}}$$

如果当被测细胞处于 G₀/G₁ 期时,其 IOD 量与正常细胞 IOD 平均值很接近,故 DNA 指数为 1,即为 2c。当细胞处于 G₂/M 期时,其 IOD 量正好约为正常细胞 IOD 平均值的 2 倍,故 DNA 指数为 2,即为 4c。处于 S 期的细胞,DI 指数在 1~2 之间,即 2c~4c 之间。当细胞为 8 倍体时,DI 值约为 4(图 1-4)。

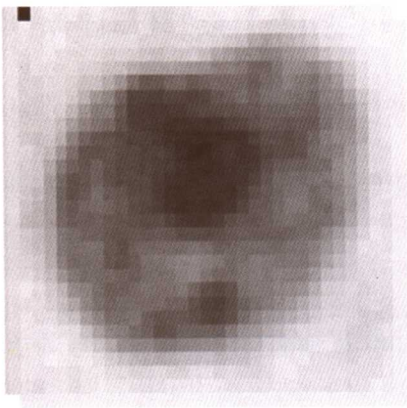


图 1-3 一个 Feulgen 染色细胞核在 CCD 照相机下所显示的图形
阴影的小方格的和为 IOD。

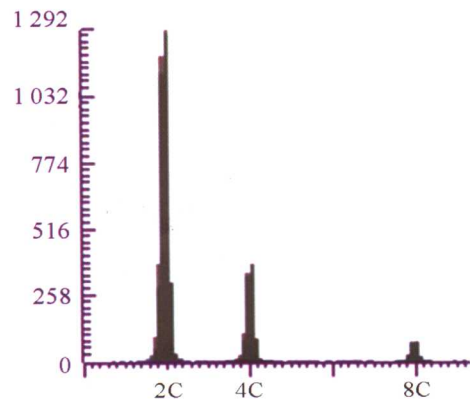


图 1-4 DNA 定量细胞测定直方图
纵轴为细胞数,横轴为 DNA 含量。2c (DI = 1), 4c (DI = 2), 8c (DI = 4)。

由此可见,DNA 定量细胞学测定的 DNA 含量是个相对单位,而不是测定 DNA 含量的绝对值。由于淋巴细胞内 DNA 含量及形态较为稳定,很多 DNA 定量细胞学测定淋巴细胞 IOD,将淋巴细胞 DNA 作为正常细胞 DNA 的参照来比较被测细胞的 DNA。

三、全自动 DNA 图像系统的基本结构

世界上有多种 DNA 图像系统。本书仅介绍以下两种。

1. AcCell Savant 系统:AcCell Savant 系统在硬件方面是由上片系统、显微镜、三轴自动平台、光源系统、数码相机、以及电脑工作站组成(图 1-5)。在软件方面则是安装了原产自加拿大 BC 肿瘤研究所的细胞图像分析软件。

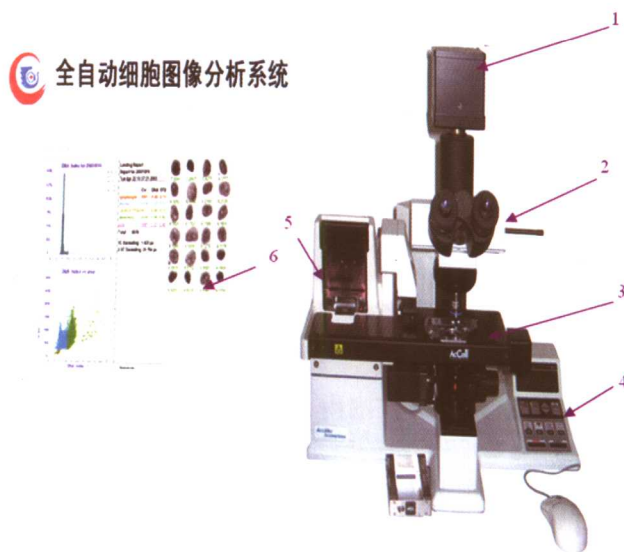


图 1-5 AcCell 图形

1. CCD 相机 2. 显微镜 3. 三轴自动平台 4. 控制盒 5. 自动上片系统 6. 显示器

2. LMC 系统:LMC 系统在硬件方面是由 MOTIC BA600 显微镜、DELL370 工作站、自动显微镜控制盒、Moticam1501 摄像头以及相应的辅助配件组成(图 1-6)。在软件方面则是安装了原产自加拿大的细胞图像分析软件,以及新开发的 HIS 报告系统。

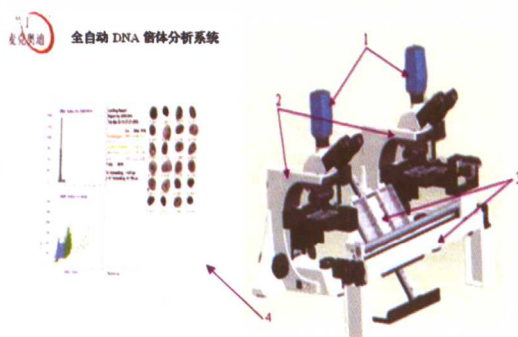


图 1-6 LMC 系统

1. Moticam1501 摄像头 2. MOTIC BA600 显微镜 3. 自动上片系统 4. 显示器

四、影响细胞核内 DNA 含量测定的因素

影响细胞核内 DNA 含量测定的因素很多,大概可为标本因素和系统因素。

(一) 标本因素

标本的取材、制片及染色等因素都可影响细胞内 DNA 含量的测定。

1. 固定、酸化、染色:细胞核内的 DNA 可因固定不好而脱落,引起 DNA 含量减少;标本在 Feulgen 染色时,酸化很重要,如果酸化不好,核酸就不能变为含醛基的脱氧核糖核酸, DNA 分子就不易与 Schiff's 试剂结合而影响 IOD; Schiff's 试剂染色过程中的浓度、时间和 pH 值均可影响细胞核测定的 IOD 值(见第三章 Feulgen 染色)。

2. CV(coefficient of variance):在同种组织中细胞之间的 DNA 含量也存在着一些差别。这种差别一般 <2%。同种组织细胞 DNA 含量测定时的差别用 CV 来表示。

$$CV = \frac{\text{标准差}}{\text{均值}} \times 100\%$$

不同组织细胞 CV 是不同的,但这种差别多在 10% 以下。如果 CV 在 10% 以下,这时 DNA-ICM 就可测定到同种细胞内多于 10% DNA 含量的变化,如 DNA 增多。当 CV 为 10% 时, G_0/G_1 细胞(二倍体细胞) DNA 含量应在 $2c \pm 0.2c$ (DI 1 ± 0.1) 之内, G_2/M 细胞(四倍体细胞) DNA 含量应在 $4c \pm 0.4c$ (DI 2 ± 0.2) 之内。ESACP(European Society of Analytical Cellular Pathology)要求 DNA-ICM 的 CV 应小于 5%, 这样就可更精确的测定 DNA 含量。

(二) DNA-ICM 系统因素

1. 噪声(Noise):信噪比是指在有效输出范围内,真值信号强度和噪声强度的比值。噪声的大小是衡量数码相机成像质量的重要指标。数码相机的噪声,主要是指传感器在捕捉、放大以及处理光信号的过程中,所产生的粗糙部分。噪声等级则取决于数码相机的信噪比。

2. Γ 值(Gamma):它是衡量数码相机输出信号和光强之间关系(以对数单位为刻度的直线的斜率)接近程度的量,其理论值为 1。

3. 杂散光(Glare):由光学系统表面的光线反射引起,并作用于显微镜的视野。

4. 阴影(Shading):所谓阴影是人眼看来是均匀的视场内存在着不均匀的电子反应,这使得灰度相同的图像成分由于在视场中所处位置不同而显示出不同的灰度。其来源包括图像源的不均匀光照、穿过透镜时光路发生变化引起的透镜阴影以及显像管本身的图像灵敏度差异引起的扫描阴影。运用合适的算法可以修正阴影。

5. 聚焦(Focus):即使单层细胞在玻片上,并不是每个细胞都在一个平面上,如有些细胞有些倾斜等。因此,要确切的测定细胞核,就必须对每一个被测细胞核聚焦。为此,测定到细胞核,将其被聚焦的细胞核进行小块分割,测定每个小块的光密度(optical density)。一般说来,计算机将被聚焦的细胞数据保存下来,而不能聚焦的细胞不被计算机记录下来。

6. 细胞核的边缘分割(Segmentation):细胞分割,尤其是核边缘的划分和光密度测定可影响整个细胞核的 IOD 值。

7. 相机成像系统(Camera):一般录相机所用的 CCD 技术由于像素面积较大,只能测定被测物质 30% ~ 40% 的面积,而 60% ~ 70% 面积不能被测到。而改进的 CCD 相机在 $20 \times$ 物镜下的像素为 $0.1 \mu\text{m}^2$ ($0.34 \mu\text{m} \times 0.34 \mu\text{m}$)。这样就可更清晰地测定到细胞核内的内容。

五、质控和标准

DNA-ICM 大多采用或符合欧洲分析细胞病理学会(ESACP, European Society for Analytical Cellular Pathology)1994 年在 Grenoble 第三次会议制定的 DNA-ICM 任务和标准。DNA-ICM 质量控制和标准要符合以下几点: