

6 Albers J J, Cabana V G, Hazzard W R. Immunoassay of human plasma apolipoprotein B. *Metabolism*, 1975, **24**: 1339~ 1351

7 Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys*, 1969, **134**: 279~ 284

8 Harlow Ed, Lane D. *Antibodies, A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 288~ 299

9 Hurn B A L, Chantler S M. Production of reagent of antibodies. *Methods in enzymology*, 1980, **70**: 104~ 142

10 Harlow Ed, Lane D. *Antibodies, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 547~ 552

Quantitative Determination of Apo-E with Apo-B (LpB-E) in Human Plasma. XIE Yonghong (*Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China*). GUO Gang (*Tianjin Prevention and Control Center of Metabolic Disease, Tianjin Medical Univer-*

sity, Tianjin 300070, China).
Abstract A non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for LpB-E was developed. Microtiter plates were used as solid-phase and coated with affinity purified goat antibodies to human apo-B. After incubating the antigen in standards and samples with coated plates, a horseradish peroxidase-labelled goat antibodies to human apo-E were added to the plates to estimate the apo-E with apo-B (LpB-E) by comparing with the standard carried out simultaneously. 120 samples of fasting human plasma randomly collected were quantitated for LpB-E and the results obtained were briefly discussed.
Key words lipoprotein, apolipoprotein, ELISA

阿达玛变换显微图象法测定 乳腺癌 DNA 含量^{*}

唐宏武¹⁾ 陈观铨 梅二文 曾云鄂¹⁾
(武汉大学分析测试科学系, 武汉 430072)

摘要 以吖啶橙为细胞 DNA 荧光探针, 用阿达玛 (Hadamard) 变换显微图象分析仪和显微荧光光度计分别测定了 4 例乳腺癌的细胞 DNA 含量 (倍性), 并对分析结果进行了比较, 二者的分析结果均与病理学诊断结论相吻合. 阿达玛变换显微图象分析仪作为一种新的细胞定量分析仪器, 其分析结果的准确度可与显微荧光光度计相媲美, 而且阿达玛变换显微图象分析仪还具有其独特的优点, 如信噪比高、具有同时分析多个细胞和同步扣除背景信号的能力等.
关键词 阿达玛变换, 图象分析, 显微荧光光度计, 乳腺癌, DNA 含量

正常人各种组织内 DNA 含量是较恒定的二倍体, 不随性别、年龄、种族而改变. 恶性肿瘤细胞 DNA 含量和细胞群体的细胞增殖活性是判断肿瘤恶性程度、预后好坏的重要指标, DNA 含量倍体水平不断增高, 异倍体的出现是恶性肿瘤的一种重要生物学标志^[1]. 因此对肿瘤细胞 DNA 含量进行测定具有十分

重要的意义. 目前对细胞群体的细胞增殖活性的研究大多采用流式细胞术 (FCM), 但该分析术所用仪器价格昂贵, 难以推广. 显微光度 (荧光) 法是常用的另一种方法, 它既能提供

^{*} 国家自然科学基金 (29375206) 和湖北省自然科学基金 (94J092) 资助课题.
¹⁾ 武汉大学化学系.
收稿日期: 1996-05-24, 修回日期: 1996-10-15

细胞的定量信息，又能用显微照相的方法提供试样的显微图象或物质分布信息。目前，在细胞定量分析领域，一些新方法得到了广泛应用，其中，图象细胞术 (ICM) 是较为成熟的一种方法^[2]。

阿达玛变换 (Hadamard transform, HT) 显微图象分析是近几年发展起来的一种分析方法，它把 HT 多通道空间成像技术与显微技术结合起来，以获取微小试样 (细胞) 的图象，并从图象中获取试样的定量分析数据。在前面的报道中，我们介绍了自制的 HT 显微图象分析系统的结构、工作原理和有关性能^[3~5]。本文将以正常人外周静脉血淋巴细胞或乳腺肿瘤标本涂片中的正常上皮细胞为标准二倍体细胞，分别以 HT 显微图象分析仪和显微荧光光度计对同一或乳腺肿瘤细胞涂片进行细胞 DNA 含量 (倍性) 分析，并对分析结果进行比较。

1 材料与方法

1.1 仪器

自制的 HT 显微图象分析仪，仪器工作原理参见文献 [3, 4]。仪器工作条件：40×物镜，BG12/2 激发滤片，单色器出射狭缝 30 μm，最大发射波长 530 nm，PMT 负高压 900 V，700 倍信号增益。

奥地利 Univar 显微荧光光度计。仪器工

作条件：λ_{ex} = 490 nm，λ_{em} = 530 nm，测量光栏 6，25×物镜。

1.2 试剂及试样

50 mg/L 吖啶橙 (AO) (含 1% Triton X-100)：用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 配制；健康人新鲜外周静脉血涂片：按常规细胞生物学方法制备；乳腺肿瘤细胞涂片：湖北省肿瘤医院提供。所用试剂均为优级纯或分析纯，水为二次蒸馏水。

1.3 实验方法

在 70% 乙醇固定的肿瘤细胞涂片和血涂片上分别滴几滴 AO 染色液，染色 15 min，用双蒸水和 pH 6.8 PBS 各冲洗三次，用 50% 缓冲甘油 (pH 6.8 PBS 配制) 封片。在血涂片上，红细胞不着色，其存在对分析结果无影响。用自制 HT 显微图象分析仪测定 5 个以上淋巴细胞的荧光强度，取其平均值作为二倍体 (2c) DNA 含量的标准对照值 (也可用肿瘤细胞涂片上的正常上皮细胞作标准二倍体细胞)。在乳腺肿瘤细胞涂片上随机测定 50 个以上细胞的荧光强度。运行自编软件，计算出肿瘤细胞倍性和有关参数，并自动画出 DNA 直方图。

2 结果与讨论

2.1 淋巴细胞荧光强度的测定

图 1 为一个小淋巴细胞核的 HT 多通道显微荧光图象，在该图象上，淋巴细胞的核面积

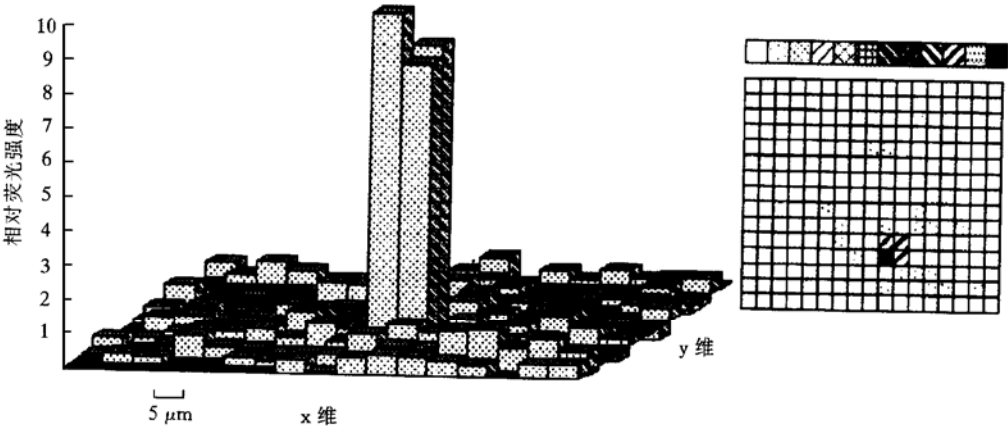


图 1 AO 染色淋巴细胞的 HT 多通道显微荧光图象
总强度：67.9；最大强度：21.4；平均强度：17.0；信噪比：20.3。

为 4 个象素点, 长和宽各为 2 个象素点, 由于在 40× 物镜下该图象的空间分辨率为 5 μm, 这表明淋巴细胞核的直径约为 10 μm, 这与用目镜标尺测得的结果相吻合. 在进行细胞荧光强度的统计时, 将细胞所在范围的所有象素点的强度进行累加即可. 由于 HT 多通道显微荧光图象能同时提供样品信号、背景和噪音信号的强度及强度分布, 从而为从图象和定量数据中同步扣除背景和噪音信号提供了可能性. 而常规显微荧光光度计无法从所测试样信号中对背景信号进行同步扣除. 此外, 在常规显微光度 (荧光) 分析中, 仪器噪声、杂散光或外界光线的干扰, 对定量分析结果均有显著影响. 阿达玛变换的多通道同时检测能力使得 HT 显微图象分析仪具有较高的信噪比, 在实际试样

分析中, 我们一般能获得 8~ 10 倍于常规显微荧光光度计的信噪比.

表 1 列举了同一血涂片上分别由显微荧光光度计和 HT 显微图象分析仪随机测定的 20 个淋巴细胞的荧光强度值 (DNA 含量). 从表 1 可看出, 由两种方法测得的淋巴细胞 DNA 含量的变异系数分别为 4.9% 和 4.4%, 二者较为接近. 这表明淋巴细胞的 DNA 含量仅在一个较小的范围内变动, 这是因为人外周静脉血淋巴细胞不再进行 DNA 的合成, 因此其 DNA 保持在 2c 含量水平. 在临床医学和细胞生物学中, 淋巴细胞常常被用作细胞内 DNA 定量分析的标准细胞. 同时, 表 1 也表明 HT 显微图象分析仪的分析精度是令人满意的, 可用于细胞内生物组分的定量分析.

表 1 淋巴细胞的 DNA 荧光强度

方法 ¹⁾	荧光强度										$\bar{x} \pm s$	CV / %
MF	147	145	142	146	148	138	145	155	160	157	149.55 ± 7.36	4.9 ²⁾
	158	163	146	148	150	156	144	138	144	161		
HT	53.1	56.0	50.8	49.8	55.0	56.0	54.9	48.6	49.7	55.0	53.17 ± 2.35	4.4
	51.8	53.2	55.5	50.8	51.8	55.8	54.6	56.0	53.5	51.5		

¹⁾MF: 显微荧光光度法; HT: HT 显微图象分析法. ²⁾不扣荧光背景时变异系数 (CV) 为 5.6%.

2.2 乳腺肿瘤细胞 DNA 含量分析

2.2.1 乳腺肿瘤细胞的 HT 显微荧光图象:

图 2 为同一乳腺肿瘤细胞涂片上三个相邻细胞

的 HT 多通道显微荧光图象. 该图象同时提供了三个肿瘤细胞的核面积大小及其强度和强度分布, 当其中一个细胞为正常细胞时, 即可确

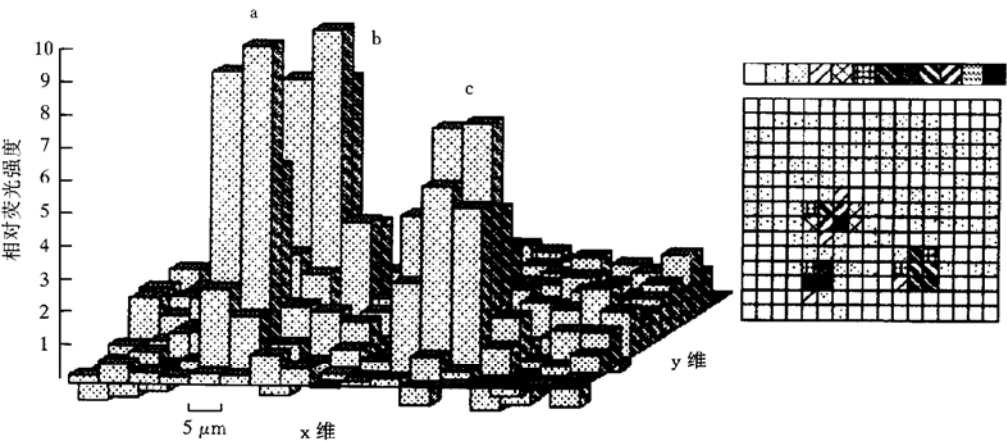


图 2 人乳腺肿瘤细胞的 HT 多通道显微荧光图象
DNA 倍性: 细胞 a: 2.6; 细胞 b: 4.2; 细胞 c: 3.4.

定其他细胞的 DNA 倍性. 这表明 HT 显微图象分析仪可同时分析多个细胞, 这在常规显微光度 (荧光) 计上是无法实现的.

2.2.2 乳腺肿瘤细胞 DNA 含量分析: 本系统采用图象细胞术常用的参数衡量肿瘤的恶性程度, 即: 二倍体偏离指数 (2cDI)^[6]、DNA 恶性度 (DNA-MG)^[7]、平均倍性 (m-

Ploidy)、四倍体超过率 ($\geq 4c$, 4cER) 和五倍体超过率 ($\geq 5c$, 5cER). 2cDI 和 DNA-MG 常用于肿瘤的预后研究. 当 4cER 大于 5% 时, 该肿瘤可确定为恶性^[8], 而 5cER 可用以识别非整倍体细胞^[6]. 表 2 列举了分别用 HT 显微图象分析仪和显微荧光光度计对四例乳腺肿瘤细胞 DNA 含量的分析结果.

表 2 四例乳腺肿瘤细胞 DNA 定量分析结果比较¹⁾

病例号	方法	n	2cDI	DNA-MG	m-Ploidy	4cER/ %	5cER/ %	结论	病理学诊断
96-274	HT	55	16.57	2.2	5.2	67.3	49.1	恶性	浸润性
	MF	55	16.55	2.2	5.5	78.2	61.8	恶性	导管癌
953836	HT	60	1.56	0.7	2.8	15.0	1.7	恶性	浸润性
	MF	60	3.03	1.1	3.3	18.3	10.0	恶性	导管癌
96-773	HT	70	0.52	0.3	2.4	2.9	0	良性	良性纤
	MF	70	0.40	0.3	2.5	2.9	0	良性	维腺瘤
960755	HT	65	0.92	0.5	2.8	1.5	0	良性	良性纤
	MF	65	0.37	0.2	2.5	0	0	良性	维腺瘤

¹⁾HT: HT 显微图象分析法; MF: 显微荧光光度法; n: 测定细胞的数量.

从表 2 可以看出, 由两种分析方法得出的结论完全一致, 而且均与病理学诊断结论相吻合. 其中, 病例 96-274、96-773 由两种方法得到的各参数值更为接近. 测定的细胞数量越多, 代表性越强 (越能反映整个肿瘤的增殖状况), 各参数值越接近真实值. 由于测定的细胞数量有限, 表 2 中的参数值可能有一定的偶然性, 但在判断肿瘤的良恶性 (即定性分析) 方面是较为可靠的. 图 3a、3b 分别为病例 96-274 由两种方法得到的 DNA 分布直方图, 除正常的二倍体峰外, 两图均出现了三个异倍体峰, 但峰的位置有所差异. 在图 3b 中出现了三个独立的细胞群, 这可能是由于该肿瘤细胞涂片的局部背景荧光强度有差异, 特别是恶性肿瘤细胞形态差异很大, 在用显微荧光光度法进行大批细胞的荧光测定之后, 对这些细胞逐一扣除背景荧光的平均值, 使得局部背景荧光较强的细胞荧光强度偏高, 从而使该恶性肿瘤的细胞 DNA 含量测定值偏高, 异倍体细胞峰右移.

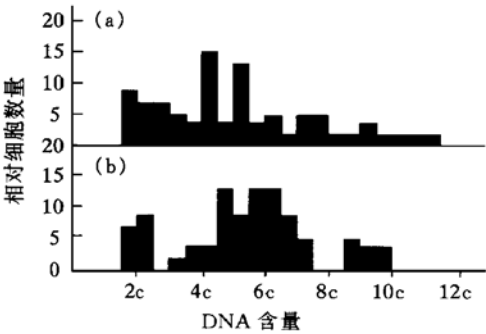


图 3 乳腺癌细胞 DNA 含量分布直方图

(a) HT 显微图象分析仪分析结果; (b) 常规显微荧光光度计分析结果.

本文实验结果表明: HT 显微图象分析仪是一种新的能用于定量细胞分析和图象分析的分析仪器; 与常规显微光度 (荧光) 计相比, 它具有较高的信噪比; 用于临床细胞学形态检查的普通乳腺肿瘤细胞涂片, 由于细胞间的粘连和重叠, 用常规显微荧光光度计进行大批单个细胞的定量分析较为困难, HT 显微图象分

析仪同步扣除背景信号和同时分析多个细胞的能力, 使得它更合于人乳腺肿瘤标本涂片的细胞 DNA 定量分析.

致谢 感谢湖北省肿瘤医院毛永荣主任医师提供人乳腺肿瘤细胞涂片和病理学诊断结论.

参 考 文 献

1 Barlogie B. Abnormal cell DNA content as a marker of neoplasia: Perspectives and commentaries. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1984, **20**: 749~ 752

2 Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1995, **17** (1): 1~ 7

3 梅二文, 陈观铨, 顾文芳等. Hadamard 变换显微荧光成像技术的研究. *中国科学, B 辑*, 1995, **25** (1): 7~ 13

4 Chen G Q, Mei E W, Gu W F *et al.* Instrument of Hadamard transform three-dimensional fluorescence microscope image analysis. *Anal Chim Acta*, 1995, **300**: 261~ 267

5 梅二文, 顾文芳, 陈观铨等. 阿达玛变换显微图象分析 (I) -细胞定量分析初探. *生物物理学报*, 1995, **11** (4): 633~ 638

6 Böcking A, Alder C P, Common H H *et al.* Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1984, **6** (1): 1~ 8

7 Böcking A, Chatelain R, Biesterfeld S *et al.* DNA grading of malignancy in breast cancer: Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1989, **11** (1): 73~ 80

8 van Volten W A, van Duijn P, Schaberg A. Cytodiagnostic use of Feulgen: DNA measurements in cell imprints from the skin of patients with mycosis fungoides. *Br J Dermatol*, 1974, **91**: 365~ 371

Measurements of DNA Content in Breast Cancer Cell by Hadamard Transform Microscopic Image Analysis. TANG Hongwu¹⁾, CHEN Guanquan, MEI Erwen, ZENG Yun'e¹⁾ (*Department of Analysis and Measurement Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;* ¹⁾ *Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Using acridine orange as fluorescence probe for DNA in cell, measurements of cellular DNA contents of four cases of human breast tumor were done by the system of Hadamard transform microscopic image analysis and conventional microfluorometry respectively, and the analytical results were compared. The results by the two methods are in agreement and both are concordant with pathological diagnosis. It shows that the new instrument for quantitative cytological analysis-Hadamard transform microscopic image analysis system, can provide precise analytical results as that by microfluorometer. In addition, the instrument has outstanding advantages such as high signal to noise ratio, the capability of analyzing two cells or more simultaneously and subtracting background signal synchronously.

Key words Hadamard transform, image analysis, microfluorometer, breast tumor, DNA content

琼脂糖电内渗对电泳的影响

郭尧君 李辛晖 方 勇

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用电内渗不同(0 .0. 03 .0. 08 .0. 20 mr)的琼脂糖制成凝胶或电极缓冲液凝胶条, 观察对