

## 实验技术

## 马蛔虫受精卵有丝分裂的图像分析定量测定

王家奎 王 琰 夏顺仁\* 徐根兴

(南京, 海军神经生物学研究中心细胞生物学研究室 210049)

从细胞形态学的角度观察, 整个细胞增殖周期唯有分裂期(M期)细胞的变化显著, 便于从形态上区别与鉴定。M期细胞的形态分期, 基本上是以核形变化为依据的。人们借助光学显微镜, 观察M期各期的形态差异, 并作出定性描述。但由于缺乏客观尺度, 难以比较M期各期形态差异的程度, 因而需要从定性描述走向定量测量<sup>[1]</sup>, 通过定量测定各期的形态特征参数, 以揭示各期的形态定量差异。我们用图像分析仪对马蛔虫(*Parascaris equorum*)受精卵的M期各期进行多参数定量测定, 以探讨M期各期之间形态差异的程度, 为M期各期的形态变化提供一些定量指标。

## 材 料 和 方 法

## 一、观测材料和分裂各期的划分

以马蛔虫受精卵的有丝分裂为观测对象。马蛔虫子宫内充满着许许多多的受精卵, 包括处于M期各期的受精卵。首先用常规石蜡切片方法和苏木精染色方法, 将马蛔虫子宫制成厚度为5 μm的切片标本, 然后随机选取各切片标本中处于分裂各期的受精卵细胞进行测定。所选取的分裂各期细胞的划分, 按一般细胞学中描述的形态学特征<sup>[2]</sup>进行, 即以染色体出现, 核仁解体, 核膜破裂为前期; 以纺锤体形成, 染色体排列到细胞赤道面上为中期; 以姐妹染色单体分开, 子染色体形成明显的两组并分别向两极移动为后期; 以两组子染色体分别到达两极并解旋松散形成染色质, 核仁复现, 核膜重建, 各自形成子核, 胞质进行分裂为末期。

## 二、仪器和测量方法

用本研究室研制的真彩色图像分析系统<sup>[3]</sup>进行测

量。该系统主要部件由 Compaq 386/20 e 微型计算机、CA-C 540 彩色图像卡、Olympus 显微镜、摄像机、解码器、视频监视器及鼠标器等组成。在显微镜下, 按上述划分M期各期细胞的形态学特征, 在用上述方法制作的切片标本上, 随机选择分裂各期的受精卵细胞, 每期各选择50个, 统一放大倍数和其它观测条件, 通过电视摄像于视频监视器512×512像素点范围内进行测量。首先将所测卵细胞定格在一方框内, 用鼠标器沿细胞膜跟踪一圈, 自动得出被测切片上卵细胞的周长和所围面积。接着, 将光标移至卵细胞长轴的一端, 按动鼠标键, 记下起始点, 再将光标移至长轴另一端, 按动鼠标键, 表明长轴终点, 并得出长轴长度。依同样方法, 可测得卵细胞的短轴值。染色体面积和胞质面积, 由图像分析系统自动测量<sup>[4]</sup>。在卵细胞内, 采用类间方差最小的阈值化方法<sup>[5,6]</sup>自动选择最合适的图像二值化阈值, 大于该阈值的灰度图像部分为胞质部分, 其像素点之和经计算自动得出胞质面积; 小于或等于该阈值的灰度图像部分则为染色体部分, 其像素点之和经计算自动得出染色体面积<sup>[4]</sup>。所有操作进程均由计算机程控, 并将测得数据自行存入数据文件, 进而进行统计处理, 结果由打印机打出。

## 三、两项细胞形态参数的计算公式和意义

所测的反映分裂各期细胞形态的参数中, 有两项由直接测得数值根据公式推导而成, 其计算公式和意义如下:

1. 细胞轴比 = 细胞长轴 / 细胞短轴

2. 细胞形状因子 = (细胞周长)<sup>2</sup> / 4π · 细胞面积  
细胞轴比反映细胞的形状特征, 圆形时比值为

1。细胞形状因子反映细胞形状的不规则程度, 如圆形的形状因子为1, 数值越大, 则形状越不规则。

• 东南大学无线电系。

表1 分裂各期马蛔虫受精卵细胞的形态参数(均值±标准差)

	前期(P <sub>1</sub> )	中期(P <sub>2</sub> )	后期(P <sub>3</sub> )	末期(P <sub>4</sub> )
细胞周长(μm)	1.1×10 <sup>2</sup> ±0.1×10 <sup>2</sup>	1.3×10 <sup>2</sup> ±0.1×10 <sup>2</sup>	1.3×10 <sup>2</sup> ±0.1×10 <sup>2</sup>	1.5×10 <sup>2</sup> ±0.3×10 <sup>2</sup>
细胞面积(μm <sup>2</sup> )	8.2×10 <sup>2</sup> ±1.3×10 <sup>2</sup>	10.8×10 <sup>2</sup> ±0.7×10 <sup>2</sup>	10.6×10 <sup>2</sup> ±0.8×10 <sup>2</sup>	11.6×10 <sup>2</sup> ±1.1×10 <sup>2</sup>
细胞长轴(μm)	34±5	39±2	38±2	45±2
细胞短轴(μm)	30±4	35±2	35±2	21±3
细胞轴比	1.13±0.08	1.10±0.06	1.10±0.09	2.26±0.39
细胞形状因子	1.22±0.04	1.17±0.03	1.21±0.16	1.64±0.73
胞质面积(μm <sup>2</sup> )	7.4×10 <sup>2</sup> ±1.0×10 <sup>2</sup>	9.6×10 <sup>2</sup> ±0.7×10 <sup>2</sup>	9.6×10 <sup>2</sup> ±0.8×10 <sup>2</sup>	10.4×10 <sup>2</sup> ±0.6×10 <sup>2</sup>
染色体面积(μm <sup>2</sup> )	62±25	86±25	79±14	85±20

表2 分裂各期间8项参数的统计学处理结果

P <sub>i,j</sub>	细胞周长	细胞面积	细胞长轴	细胞短轴	细胞轴比	细胞形状因子	胞质面积	染色体面积
P <sub>1,2</sub>	**	**	**	**	×	**	**	**
P <sub>1,3</sub>	**	**	**	**	×	×	**	**
P <sub>1,4</sub>	**	**	**	**	**	**	**	**
P <sub>2,3</sub>	×	×	*	×	×	×	×	×
P <sub>2,4</sub>	**	**	**	**	**	**	**	×
P <sub>3,4</sub>	**	**	**	**	**	**	**	×
显著差异率(%)	83	83	100	83	50	67	83	50

注: P<sub>i,j</sub>表示i期与j期间参数的显著性检验。×表示P>0.05, \*表示P<0.05; \*\*表示P<0.01。显著差异率表示各参数在各期间的统计差异(P<0.05, P<0.01)所占的百分率。

## 结 果

所测卵细胞分裂各期的8项形态计量参数(均值±标准差)见表1。

全部测量数据输入微型计算机,利用Fortran语言编制的自检索T检验程序,先进行F检验,若方差齐性,自动选择t检验;若方差不齐性,则自动选择t'检验。为了明确每一参数在分裂各期的显著差异,对上述8项参数在各期内进行了48次两两比较,自动给出t或t'值和P值,并以显著差异率(各参数在分裂各期间显著差异P<0.05与高度显著差异P<0.01所占的百分率)来表示8项参数在分裂各期间的统计学差异,以显示具有区别分裂各期意义的细胞形态特征参数(表2)。

## 讨 论

马蛔虫受精卵的M期各期之间,在所测8项参数中,除中期与后期之间有7项参数无显著差异(P>0.05)外,其余各期之间均存在多

项参数的高度显著差异(P<0.01),其中以末期与其他各期之间的差异更为明显。末期与其他各期相比较,除染色体面积这项参数与中期以及后期之间无显著差异外,其余各项参数均有高度显著差异,尤以细胞轴比和细胞形状因子这两项参数最为显著。末期的细胞轴比高达2.26±0.39,为其他各期的2倍以上。末期的细胞形状因子亦高达1.64±0.73,显示出末期的细胞形状比其他各期更不规则。末期的这两项参数之所以如此显著,与末期细胞的中部向内凹陷,形成哑铃状有关。然而,从总体来说,M期仍是一个连续变化的过程。所测的细胞周长和面积,以及胞质面积等参数值,从前期到末期,基本上均呈递增趋势,反映出各期形态变化的连续性。这与周宁新等电镜观察的各时期有着明显的动态趋向<sup>[7]</sup>相符。

本文还观测到前期的染色体面积与其他各期间均有高度显著差异,以前期值为低,而其他各期之间均无显著差异。这可能与染色质由前期到中期的螺旋化程度逐渐加深形成染色体

有关。有人<sup>[8]</sup>观察到大蒜根尖细胞,在M期的早前期,染色线的螺旋结构并不紧密,晚前期才进一步螺旋化,前中期则比晚前期更加紧密,形成染色体。

形态定量测量是集先进的计算机、图像处理、模式识别和定量测试为一体的新技术<sup>[1]</sup>,具有客观性强、重复性好等优点。本研究采用该技术对马蛔虫受精卵细胞分裂各期的形态特征进行测量和计算,建立了8个参数组成的细胞二维形态计量参数数据资料。统计学处理结果,有5项参数的显著差异率在83%以上。这5项参数从不同角度反映了M期各期细胞的异型性。选择这些参数进行观测,将有助于分析分裂各期的形态特征变化。目前,有关细胞分裂各期的形态定量测定报道尚不多见,缺乏反映细胞分裂各期形态异型性的定量指标。我们拟进一步根据这些参数,选取其他细胞进行分裂各期的观测,以建立细胞分裂各期的形态定量指标,从而从量的角度进一步分析细胞分裂各期的形态特征变化。

### 摘 要

用彩色图像分析仪,对马蛔虫受精卵有丝

分裂各期进行形态学测量,每期测量50个细胞。从细胞水平测量计算了8项形态计量参数,其中5项参数的显著差异率在83%以上,反映了分裂各期的卵细胞的异型性。这些形态计量参数,为分析细胞有丝分裂形态变化的定量指标提供了参考。

### 参 考 文 献

- [1] 姚志洪, 1990, 上海第二医科大学学报, 10(2): 154—156.
- [2] 汪德耀等, 1988, 普通细胞生物学, 上海科学技术出版社, pp, 335—344.
- [3] Xu Genxing et al, 1991, Proceeding of Xi'an Satellite Conference of 1991 World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, D<sub>4-3</sub>
- [4] 吕维雪, 1989, 医学图象处理, 北京, 高等教育出版社, pp, 251—265.
- [5] Nobuyuki Ostu, 1979, A threshold selection method from grey-level histogram, *IEEE Transaction on SMC*, 9(1): 62—66.
- [6] 王积分等, 1988, 计算机图像识别, 北京, 中国铁道出版社, pp, 352—355.
- [7] 周宁新等, 1985, 细胞生物学杂志, 7(4): 177—178.
- [8] 牛怡聪等, 1989, 实验生物学报, 22(1): 9—11.

## 一种快速简便检测 TGF-β 生物活性的细胞光度比色法\*

吴 军 季闻行

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

转化生长因子是一类影响细胞生长和表型的生物活性多肽<sup>[1]</sup>。它在不同靶细胞和微环境下,不仅具有刺激或抑制细胞生长、诱导细胞分化和其它多种生物学效应<sup>[2]</sup>,还能引起一些正常细胞失去接触抑制,转化成为锚着不依赖生长。通常利用这种特性使长在软琼脂上的成纤维细胞形成细胞集落来检测TGF-β活性<sup>[3]</sup>。此法操作繁琐,周期长至一周以上。另一种检测TGF-β活性方法是利用TGF-β能抑制貂肺

上皮细胞(CCL/64)生长的特性<sup>[4]</sup>,结合放射性同位素<sup>3</sup>H-TdR标记技术,测定<sup>3</sup>H-TdR参入细胞的脉冲数,计算出TGF-β抑制CCL/64细胞生长的抑制率。但此法需要放射性同位素实验设备,操作也不简便。

最近,我们实验室在分离纯化人血小板的TGF-β 1和测其生物活性过程中,利用最新发

\* 施涓康老师对本文实验提出了宝贵的意见,并对本文作了多次修改,特表谢意。