

应用数学优选法对组织切片中细胞核 DNA 定量分析

朱 荣¹ 唐 峰² 胡锡琪¹ 徐元鼎^{1Δ}

(¹ 复旦大学上海医学院病理学系 上海 200032; ² 复旦大学附属华山医院病理科 上海 200040)

【摘要】 目的 以数学优选法为基础,建立一种全新的组织切片细胞核 DNA 的定量分析方法,应用于良恶性肿瘤的组织学鉴别诊断。**方法** 以 42 例恶性肿瘤和 7 例非肿瘤性良性病变为研究材料,两位资深病理医师光镜观察并做出病理诊断,通过 Feulgen 染色进行 DNA 定量分析。在组织切片上通过大数据统计分析处理技术,即数学中的优选原则结合一定的筛选法则,对切片中的细胞先做处理和优选,再进行分析。**结果** 采用优选法的 DNA 定量分析系统诊断灵敏度为 97.62%,特异度为 100.00%,阳性预测值为 100.00%,阴性预测值为 87.50%,正确指数(Youden 指数)为 0.98,假阳性率为 0,假阴性率为 2.38%,准确度为 97.96%。**结论** 优选法不但获得理论上的成功,通过临床验证同样获得了满意的效果,在人工智能应用于传统组织病理诊断方面具有很大潜力。

【关键词】 DNA 定量分析; 优选法; 细胞核; 组织切片

【中图分类号】 R331 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.06.012

Application of mathematical optimal method in DNA quantification on tissue slices

ZHU Rong¹, TANG Feng², HU Xi-qi¹, XU Yuan-ding^{1Δ}

(¹ Department of Pathology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

² Department of Surgery Pathology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective Based on mathematical optimal method, we tried to set up an innovative DNA quantification analysis on tissue slices, which can be used in histopathological differential diagnoses.

Methods Two senior pathologists microscopically made the diagnoses for 42 cases of malignant tumors and 7 cases of non-tumor benign lesions. Meanwhile, the Feulgen stain was performed for DNA quantification. We treated the data by mathematical optimal method combined with some filter rules before the analysis to optimize the cells in the tissue. **Results** In our DNA quantification system based on mathematical optimization, the diagnostic sensitivity was 97.62%, and specificity was 100.00%. The positive predictive value was 100.00%, and negative predictive value was 87.50%. The false positive rate was 0, and false negative rate was 2.38%. Corrective index (Youden index) was 0.98, and the accuracy was 97.96%. **Conclusions** Our optimal method is not only successful in theory, but also satisfied in clinic test. This method would contribute the traditional histopathological diagnosis by the application of artificial intelligence.

【Key words】 DNA quantification; method of optimization; nuclei; tissue slices

^ΔCorresponding author E-mail: xuyding@126.com

病理是肿瘤诊断的金标准。肿瘤的病理诊断依靠对组织的取材、制片,病理医师显微镜观察,根据形态学变化来诊断。这种传统的定性方法不但效率低,而且主观性大,特别是对某些肿瘤的分级和良恶性界定,不同组织机构或个人,诊断结果大相径庭,给临床治疗带来困扰,所以需要寻找一种更为高效、客观、自动化的诊断手段。20世纪80年代基于细胞核DNA的Feulgen染色和计算机图像分析技术的一种新的病理诊断方法,即图像分析细胞仪问世,简称ICM。美国CAS公司生产的CAS细胞分析系统问世以来获得了广泛应用^[1]。直到20世纪90年代末,人们发现这种技术虽然在细胞涂片的诊断上获得了巨大成功,但在组织切片上的应用存在致命缺陷:细胞学样品中的绝大多数细胞核是完整的,一个完整的正常二倍体细胞其DNA含量是7.18pg,而组织切片中的细胞核不完整,仅是一个片段或一个平面。不仅如此,不同切片其面积也有大小,所以无法核定其完整细胞核的DNA含量^[2]。由于细胞核DNA含量的测定与倍体分析都应以单个完整细胞核个体(或体积)内的DNA含量为测量和分析基础,因此不少学者对ICM技术在组织切片中的应用提出异议。采用ICM技术对细胞涂片进行辅助病理诊断一直延用至今,国内厦门麦克奥迪公司生产的细胞DNA定量分析系统针对妇产科病理的临床细胞学诊断,在界定肿瘤良恶性方面得到广泛的应用。而此项技术在病理组织切片上的应用已遭淘汰,尚无改进方法。我们找到一种在组织切片上通过大数据统计分析处理技术,即数学中的优选原则结合一定的筛选法则,对切片中的细胞先做处理筛选再分析,获得理论上的成功,并对此进行了临床验证,获得了满意的效果。

资料和方法

研究对象 49例恶性肿瘤和非肿瘤性良性病变病例来自2018年复旦大学附属华山医院病理科存档,临床和病理诊断明确,资料完整。其中恶性肿瘤42例,非肿瘤性良性病变7例。42例恶性肿瘤中,胃肠腺癌19例、肝胆管细胞癌2例、肝细胞癌10例、肝转移性腺癌1例、肺腺癌3例、肺腺鳞癌1例、肺鳞状细胞癌1例、食管鳞状细胞癌1例、乳腺浸润性导管癌2例、甲状腺微灶癌1例、脑恶性胶质瘤1例;7例非肿瘤性良性病变分别为肝硬化2例,

乳腺病、结肠炎、成骨细胞增生、肝炎伴肝坏死、胃癌阴性淋巴结各1例。

组织切片的制备、染色和DNA定量分析 标本经4%甲醛水溶液固定,组织取材后常规脱水、石蜡包埋,制成2张5 μ m厚连续切片,其中1张HE染色后由两位资深医师进行光镜观察并作出病理诊断;另一张按国际细胞学会制定的操作流程进行Feulgen染色,用于DNA定量分析。

DNA定量检测 采用motocytometer系统(厦门麦克奥迪医疗诊断系统有限公司),通过自动数码显微镜以及摄像头对整张标本切片进行高速扫描,获得切片中全部细胞,自动测量每个细胞的DNA含量(光密度 \times 面积),常规选择正常淋巴结内的淋巴细胞作为对照,比值即为DNA指数(DNA index,DI)。作为对照的正常淋巴细胞,其DI值设定为1。将整张切片中所有细胞的测量值导入自行设计的数学分析软件,经分析处理,对数据进行筛选后得出最终DNA含量值。

统计学分析 DI值的判定标准:DI值 ≤ 1 为良性病变; >1 为异常,即异倍体细胞,判定为恶性^[1]。使用SPSS 21.0软件,以组织病理学诊断结果作为金标准, χ^2 四格表计算DNA定量分析系统诊断的灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值、阴性预测值和Youden指数等。

结 果

以数学优选为原则的统计处理方法 将每例病理切片中所有细胞的DNA含量值按数学中位数排序,淘汰小于中位数值值的细胞。例如:病理号为1802746,病理诊断为结肠腺癌的切片中,共计有22 000个细胞,将其中大于中位数的细胞求得DNA含量均值为4.01。正常淋巴结切片18268301按同法处理,求得DNA含量均值为1.52。癌组织与正常组织的比值为2.64,此即DI值。由于DI >1.0 ,可诊断为恶性。此数值越高,恶性程度越高。所有病例均按此方法统计处理。

研究对象的DNA定量分析基本情况 病理组织标本的取材大小一般为1.5 cm \times 1.5 cm \times 0.5 cm。但由于组织的来源不同,切片的截面积存在很大差异:如活检或穿刺标本很小,而手术根治标本取材组织可以很大。另外,不同组织内实质和间质的比例不同,样本中可含有黏液分泌物等非细胞

成份,而恶性肿瘤常伴有出血、坏死等改变,对整张标本切片进行扫描后,获得切片中全部细胞数存在差异:最高 36 899 个,最少 323 个细胞,平均(7 183. 38 ± 9 144. 56)个;单个细胞 DNA 含量值(光密度×面积)最高为 39. 96,最低为 0. 14,平均 1. 33 ± 0. 85。各疾病样本所测细胞数、细胞 DNA 定量($\bar{x} \pm s$)、DNA 定量分析结果与传统组织病理学诊断的比较

详见表 1。7 例非肿瘤性良性病变的 DI 值全部<1,与传统组织病理学诊断完全符合(100%);42 例恶性肿瘤中有 41 例 DI 值>1,DNA 定量分析判定为恶性。但有 1 例甲状腺微灶癌病例的 DI 值为0. 93,被判为良性,与传统组织病理学诊断不符合。恶性肿瘤 DNA 定量分析的符合率为 97. 62%。

表 1 组织病理学诊断和 DNA 定量分析基本情况
Tab 1 The general information of histopathology and DNA quantification

Histopathology	DNA quantification		DNA index		Case (n, coincidence%)
	Numbers of cells	OD×area	Benign (-)	Malignant (+)	
Malignant tumors	323 - 36 899	1. 32 ± 0. 01	1	41	42 (97. 62%)
Gastrointestinal adenocarcinoma	323 - 22 379	1. 27 ± 0. 01	0	19	19
Cholangiocarcinoma	2 396 - 29 965	1. 11 ± 0. 00	0	2	2
Hepatocellular carcinoma	2 038 - 36 899	1. 41 ± 0. 01	0	10	10
Metastatic adenocarcinoma of liver	21 271	1. 11 ± 0. 00	0	1	1
Adenocarcinoma of lung	797 - 2 225	1. 10 ± 0. 02	0	3	3
Adenosquamous carcinoma of lung	2 804	1. 10 ± 0. 02	0	1	1
Squamous cell carcinoma of lung	1 546	1. 65 ± 0. 03	0	1	1
Squamous cell carcinoma of esophagus	8 239	1. 01 ± 0. 00	0	1	1
Infiltrating ductal carcinoma of breast	1 187 - 3 029	1. 31 ± 0. 01	0	2	2
Thyroid micro-carcinoma	1 115	0. 94 ± 0. 01	1	0	1
Malignant glioma of brain	6 729	2. 52 ± 0. 02	0	1	1
Benign non-tumorous lesions	717 - 18 965	1. 41 ± 0. 02	7	0	7 (100%)

OD:Optical density.

DNA 定量分析系统的诊断效力 组织病理学诊断和 DNA 定量分析诊断的比较见表 2。DNA 定量分析系统诊断灵敏度为 97. 62%,特异度为 100. 00%,阳性预测值 100. 00%,阴性预测值 87. 50%,正确指数(Youden 指数)为 0. 98,误诊率为 0,漏诊率为 2. 38%,假阳性率为 0,假阴性率为 2. 38%,准确度为 97. 96%。

表 2 组织病理学诊断和 DNA 定量分析诊断的比较
Tab 2 The comparison of histopathological diagnosis and DNA quantification

Diagnosis	Histopathological diagnosis (+)	Histopathological diagnosis (-)	Case No.
DNA quantification (+)	41	0	41
DNA quantification (-)	1	7	8
Case (n)	42	7	49

讨 论

细胞核 DNA 定量越来越多地被应用于良恶性肿瘤的界定和恶性肿瘤的病理诊断及分级。应用组

织切片的 Feulgen 染色和图像分析系统进行细胞 DNA 含量测定和统计分析,能显示 2 倍体或多倍体及非整倍体 DNA 的百分含量,可反映染色体的畸变及程度^[3]。其临床应用价值主要有以下方面:(1)早期检测出癌及癌前病变。癌症是一种染色体疾病,致癌物质和偶发的有丝分裂错误都是通过产生非整倍体引发肿瘤。80%~90%的实体肿瘤内存在非整倍体细胞,这种细胞的出现是提示早期恶性病变的重要标志。癌症早期,在病理医师的显微镜观察还不能感知病变的情况下,可以通过非整倍体来区分恶性肿瘤和“相貌雷同”的良性肿瘤或正常组织,实现癌及癌前病变的早发现、早诊断、早治疗,对患者的预后至关重要。(2)肿瘤恶性程度及预后评估和指导肿瘤治疗。整倍体肿瘤预后通常较非整倍体更好,同时非整体细胞是否消失直接反映放、化疗的效果好坏。癌症晚期,检查与耐药或转移性相关的非整倍体,有助于临床医师选择最适合患者的个性化治疗方案,也是目前提倡的精准医疗中不可或缺的重要手段之一。(3)减少病理诊断中的主观因素,提高病理学检测工作效率,减轻病理医师的劳动

强度。传统的病理学人工诊断,在显微镜下逐一视野观察,费时费力,且主观性强,敏感度较低,易受人为因素影响。通过细胞 DNA 定量分析系统,病理医师仅需对少数可疑或阳性病例进行复核,大大减轻劳动强度。此技术敏感性高($>95\%$),能有效降低漏诊率;具有完备的质控体系,能消除人工诊断中的主观性,使结果更加客观,可重复性高。

图像分析技术将肿瘤细胞 DNA 含量,倍体分析与病理组织形态学相结合,在病理诊断中显示出很好的价值。但也存在一些缺点,其中最主要的是某些人为因素或计算机程序的选择处理不当,会直接影响测定结果^[4]。近年来随着病理学技术的不断发展和完善,Feulgen 染色的标准化和机械化、图像分析系统硬件质量的提高和软件学习能力的增强等极大地方便了操作和减少了人为因素对结果的影响,选择更加合适的计算方法和程序对图像及数据进行处理,成为提高测定结果的准确性、增加肿瘤诊断的敏感性、降低非特异性的关键。细胞核 DNA 含量的测定与倍体分析都应以单个完整细胞核个体(或体积)内的 DNA 含量为测量和分析基础。细胞学样品中的绝大多数细胞核是完整的,但组织切片内的细胞核只是完整细胞核的一部分,以体积(面积 \times 切片厚度)为单位的 DNA 含量取决于细胞核截面积和平均 DNA 含量。前者与完整细胞核个体的体积大小、形状、空间取向和截面在细胞核内的位置有关;后者与切片厚度和单位细胞核体积的 DNA 含量密度有关。即使相同厚度或同一组织切片,不同的细胞核个体在体积、形状、大小、空间分布与空间取向也不完全相同,切片中的细胞核在完整细胞核内的位置、体积占其完整体积的比率也不一样,以此为基础选择参照和计算不同样本中肿瘤细胞的 DNA 倍体存在不客观性^[5]。实验表明,与细胞学涂片相比,组织切片测量结果精确性与准确性较差,不能正确评估细胞核 DNA 含量倍体状态,分析测量结果时可能将正常四倍体或八倍体细胞核误判为非整倍体,得出错误结论^[2]。因此,图像分析组织切片内细胞核 DNA 的含量和倍体数,必须采用与之相适应的、更为科学的测量和分析方法。

对组织切片中细胞核 DNA 含量和倍体的分析,采用以往图像数据处理的方法,存在的主要问题有:(1)相同倍体、形状和体积,或相同倍体和形状、不同体积或相同倍体和体积、不同形状的完整细胞核在同一薄切片内可形成不同大小的细胞核切片,

测得不同的积分吸光度值,被误认为是不同倍体的细胞;(2)不同倍体、相同形状和体积或不同倍体和形状、相同体积或不同倍体和体积、相同形状的完整细胞核,在同一薄切片内不同大小的细胞核切片,可测得相同的积分吸光度,被误认为是相同倍体的细胞;(3)组织内大多数二倍体参考细胞核的体积小于肿瘤细胞核的体积,在同一薄切片内的切片体积占自身完整体积的百分率大于肿瘤细胞,以其测量均值为基础计算的肿瘤细胞 DNA 倍体值偏小,偏小的程度难以估计^[3]。因此,我们建立了一种全新的对组织切片中细胞核 DNA 含量和倍体分析的方法,采用大数据统计分析处理技术,即数学中的优选原则结合一定的筛选法则,对切片中的细胞先做处理再分析。从以上 49 例测定结果来看,对良恶性的判定与传统病理诊断的符合率较高。只有 1 例不符合的病例为甲状腺微灶癌,此肿瘤微小,直径小于 0.5 cm。组织学形态上细胞异型性小,预后极好,几乎无复发转移,治疗以单纯结节切除为主^[6]。现认为临床上甲状腺微灶癌存在过度诊断现象,诊断标准有待进一步商榷。

本研究是对新的计算处理法则的初步应用,今后将用更多的临床样本进行验证。选取的病种数较多正是此方法的优点之一。当前的人工智能病理诊断主要集中在对图像的学习和识认方面,由于不同组织器官和肿瘤间的图像差异巨大,再加上个体之间以及恶性肿瘤自身的异质性,使得不同的肿瘤需要不同的图像识别诊断体系,各病种间的诊断系统不能通用,这样就大大降低了智能诊断系统的效率。而本研究基于对 DNA 含量分析的技术可以不变应万变,在良恶性肿瘤的判定上具有通用性和高效性的优点。49 例病例虽较少,且组织来源、大小和细胞数均存在差异,但仍初步说明能区别各病种的良性和恶性,有进一步研究的价值。这种应用 DNA 定量分析系统结合人工智能大数据以及数学统计分析的方法在病理切片中的应用是一种打破传统的创新手段,病理切片诊断有望进入一个非人工定量的新阶段。如把此项技术转化为系统,即把现有的 DNA 定量分析系统与数学分析软件一体化,则可形成一键搞定全自动的组织学诊断系统,有利于进一步推广。最后值得注意的是,虽然人工智能在医学领域的应用越来越广泛,但能应用到病理分析方面的难度系数相对较大。医学水平决定人工智能水

(下转第 813 页)

- Anesthesiology*, 2018, 129(2): 373 – 375.
- [10] SCHWARTZ AE. Electroencephalogram and anesthetics [J]. *Anesthesiology*, 2018, 129(2): 375.
- [11] FERREIRA AL, CORREIA R, VIDE S, *et al.* Patterns of hysteresis between induction and emergence of neuroanesthesia are present in spinal and intracranial surgeries [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2018. doi: 10.1097/ANA.0000000000000559.
- [12] LANIER WL, IAIZO PA, MILDE JH, *et al.* The cerebral and systemic effects of movement in response to a noxious stimulus in lightly anesthetized dogs. Possible modulation of cerebral function by muscle afferents [J]. *Anesthesiology*, 1994, 80(2): 392 – 401.
- [13] LIU N, CHAZOT T, HUYBRECHTS I, *et al.* The influence of a muscle relaxant bolus on bispectral and datex-ohmeda entropy values during propofol-remifentanyl induced loss of consciousness [J]. *Anesth Anal*, 2005, 101(6): 1713 – 1718.
- [14] KUIZENGA MH, COLIN PJ, REYNTJENS K, *et al.* Test of neural inertia in humans during general anaesthesia [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 120(3): 525 – 536.
- [15] LYSAKOWSKI C, DUMONT L, PELLEGRINI M, *et al.* Effects of fentanyl, alfentanil, remifentanyl and sufentanil on loss of consciousness and bispectral index during propofol induction of anaesthesia [J]. *Br J Anaesth*, 2001, 86(4): 523 – 527.
- [16] SEPÚLVEDA P, CARRASCO E, TAPIA L, *et al.* Evidence of hysteresis in propofol pharmacodynamics [J]. *Anaesthesia*, 2018, 73(1): 40 – 48.
- [17] ZHANG Y, WANG Y, WANG C, *et al.* Investigation of hysteresis during anesthetic-induced unconsciousness by using brain functional networks [J]. *Biomed Signal Proc Control*, 2018, 46: 314 – 322.
- [18] BROWN EN, PURDON PL, VAN DORT CJ. General anesthesia and altered states of arousal: a systems neuroscience analysis [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 601 – 628.
- [19] PROEKT A, HUDSON A. A stochastic basis for neural inertia in emergence from general anaesthesia [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 121(1): 86 – 94.
- [20] TARNAL V, VLISIDES PE, MASHOUR GA. The neurobiology of anesthetic emergence [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2016, 28(3): 250 – 255.

(收稿日期: 2018-12-24; 编辑: 王蔚)

(上接第 796 页)

平, 人工智能终究代替不了医师。人工智能应该与人类病理专家形成互补, 以此提高人工诊断的效率和准确性, 这是最合理的应用方式。

参 考 文 献

- [1] BACUS JW, GRACE LJ. Optical microscope system for standardized cell measurements and analyses [J]. *Appl Opt*, 1987, 26(16): 3 280 – 3 293.
- [2] 魏清柱, 夏潮涌, 刘江欢. 组织切片对细胞核 DNA 含量检测的影响 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2008, 13(4): 259 – 260.
- [3] BÖCKING AH, FRIEDRICH D, MEYER-EBRECHT D, *et al.* Automated detection of cancer cells in effusion specimens by DNA karyometry [J]. *Cancer Cytopathol*, 2019, 127(1): 18 – 25.
- [4] DUNN JM, HVEEM T, PRETORIUS M, *et al.* Comparison of nuclear texture analysis and image cytometric DNA analysis for the assessment of dysplasia in Barrett's oesophagus [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(8): 1 218 – 1 223.
- [5] KESARKAR K, TAMGADGE A, PEIRERA T, *et al.* Evaluation of mitotic figures and cellular and nuclear morphometry of various histopathological grades of oral squamous cell carcinoma; comparative study using crystal violet and feulgen stains [J]. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2018, 18(2): 149 – 154.
- [6] MIYAUCHI A, ITO Y, ODA H. Insights into the management of papillary microcarcinoma of the thyroid [J]. *Thyroid*, 2018, 28(1): 23 – 31.

(收稿日期: 2019-03-01; 编辑: 王蔚)