

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.08.005

人工智能数字病理诊断特殊染色研究*

黄荣祥^{1,2}

1. 麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司,福建厦门 361006;2. 福建医科大学基础医学院,福建福州 350122

摘要:目的 通过对人工智能细胞 DNA 倍体诊断技术特异性染色方法的研究,探讨其作用机制,为临床人工智能数字病理诊断提供全新的解决方案。**方法** 收集 2018 年 11 月至 2019 年 12 月厦门麦克奥迪医学检验所保存于细胞保存液的宫颈脱落细胞标本 320 份,非宫颈标本 56 份。采用离心沉降制片、特殊染色技术,绘制不同水平磷酸水解趋势图及水解曲线,统计分析 DNA 诊断结果。**结果** 60%磷酸的反应平台期在 15~40 min,平台期内 15、20、25、30、35、40 min 的 IOD 均值分别为 111.45、114.93、117.34、116.25、113.38、112.19,差异无统计学意义($P>0.05$);70%磷酸的反应平台期在 10~20 min,平台期内 10、15、20 min 的 IOD 均值分别为 116.32、110.43、110.19,差异无统计学意义($P>0.05$)。标本切片分别采用 60%磷酸和 5 mol/L 盐酸水解 25 min, DNA 诊断结果一致(100.00%)。**结论** 特殊染色法适合于细胞人工智能数字病理诊断技术,实验室应根据自身实验室标本属性选择适宜的水解体系。

关键词:染色与标记; 病理学; 图像处理; 计算机辅助; 磷酸

中图法分类号:R730.43

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)08-1042-04

Study on special staining for artificial intelligence digital pathological diagnosis*

HUANG Rongxiang^{1,2}

1. Motic (Xiamen) Medical Diagnostic Systems Co., Ltd, Xiamen, Fujian 361006, China;

2. The School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350122, China

Abstract: Objective Through the research on specific staining methods of artificial intelligence(AI) cell DNA ploidy diagnosis technology, to explore the mechanism of action, and provide a new solution for clinical AI digital pathological diagnosis. **Methods** From November 2018 to December 2019, a total of 320 cervical shedding cell samples and 56 non-cervical samples were collected from the cell preservation solution of Xiamen Motic Medical Laboratory. The centrifugal sedimentation slides and special dyeing method were used to draw different concentration of phosphoric acid hydrolysis trend chart and hydrolysis curve, and the DNA diagnosis results were statistically analyzed. **Results** 60% of the phosphate reaction platform period was 15—40 min, the average integrated optical density (IOD) values at 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min during the platform period were 111.45, 114.93, 117.34, 116.25, 113.38 and 112.19 respectively, with no statistically significant difference ($P>0.05$); 70% of the phosphate reaction platform period was 10—20 min, and the average IOD values during the platform period of 10, 15 and 20 min were 116.32, 110.43 and 110.19 respectively, with no statistically significant difference ($P>0.05$). 60% phosphoric acid and 5 mol/L hydrochloric acid hydrolyzed for 25 min, and the DNA diagnosis results were consistent (100.00%). **Conclusion** Special staining is suitable for AI digital pathological diagnosis. The laboratory should choose a suitable hydrolysis system according to the properties of its own laboratory samples.

Key words: staining and labeling; pathology; image processing; computer-assisted; phosphoric acid

宫颈癌是妇科最常见的癌症,其发生机制与细胞核内 DNA 倍体异常相关。随着宫颈病变的发展,病变部位中二倍体与多倍体细胞此消彼长,最终表现为组织形态学上的异常,故 DNA 倍体诊断作为女性宫颈癌早期筛查和早期干预手段有重要意义^[1-3]。近年

来,越来越多的学者将人工智能(AI)DNA 倍体分析技术应用于各类非妇科肿瘤的诊断,取得了不小的进展。DNA 倍体技术以其无创、经济、高效、敏感的明显优势,对诊断良恶性肿瘤、预测癌变危险度、判断预后及早期筛查均有深远意义^[4-6]。特殊染色由于在显

* 基金项目:福建省科技计划项目(2021H6035);福建省厦门市科学技术局重大科技创新平台项目(3502Z20111007)。

作者简介:黄荣祥,男,工程师,主要从事细胞病理学及细胞图像分析方面的研究。

示细胞核 DNA 含量时具有良好的特异性和精准性而被广泛应用,该方法仍然是细胞 DNA 倍体分析技术的标准染色方法。学者们深入探讨了特异性显示 DNA 的组织化学方法的作用机制及硫酸、硝酸、高氯酸等无机酸作为水解介质的可能性^[7-9],但由于上述介质具有强氧化性、强腐蚀性、易爆性而实际应用价值不高。故本研究通过对 AI 细胞 DNA 倍体诊断技术特异性染色方法的研究,探讨其作用机制,为临床 AI 数字病理诊断提供全新的解决方案。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2018 年 11 月至 2019 年 12 月厦门麦克奥迪医学检验所保存于细胞保存液的宫颈脱落细胞标本 320 份,非宫颈标本 56 份。

1.2 仪器与试剂 Easyscan 数字切片扫描与应用系统,由麦克奥迪实业集团有限公司提供。甲醇、甲醛、冰醋酸、磷酸、盐酸、偏重亚硫酸钠,均为分析纯,均购自西陇科学股份有限公司;硫堇(Thionin acetate salt),经生物染色委员会认证,染料含量 $\geq 85\%$,购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本制备与特殊染色 (1)采用离心沉降法制备细胞片。(2)Bohm-Sprenger 固定液配制:甲醇 80 mL、甲醛 15 mL、冰醋酸 5 mL,搅拌混匀。磷酸酸解液配制:磷酸溶液与蒸馏水按 3:2 比例混合,搅匀。细胞 DNA 染色液配制:称取 0.1 g 硫堇和 0.1 g 偏重亚硫酸钠,量取 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水 98 mL 加入棕色瓶中,加入 2 mL 的磷酸酸解液,在 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温设备中避光搅拌 30~40 min 后过滤保温。以上均以配制 100 mL 为例,用前预热至 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。(3)Bohm-Sprenger 固定液固定细胞片 30 min,室温下流水洗涤 1 min;磷酸酸解液水解,室温下流水洗涤 1 min;细胞 DNA 染色液染色 40 min,室温下流水洗涤 1 min;蒸馏水漂洗 5 min,于 50%、75%、95%、100%、100%乙醇中脱水各 3 min,自然晾干后树脂封固。以上固定、水解、染色、漂洗过程均在 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 环境中进行。

1.3.2 DNA 含量测定与曲线绘制 Easyscan 数字切片扫描与应用系统的结构组成及 DNA MotiCytometer2.0 测定过程:系统由扫描仪主机、片夹、计算机及扫描软件组成,其中扫描仪主机主要由成像装置、X、Y、Z 轴移动装置和控制电路构成。切片随移动装置的移动,每个视野中的宫颈细胞核能被 CCD 成像装置捕获并测量。细胞核 DNA 含量用积分光密度(IOD)表示,分别计算二倍体细胞核的 IOD 平均值及每个细胞的 DNA index(DI)值, $DI = \text{被测量细胞 IOD} / \text{正常二倍体细胞 IOD}$,以上参数值均由系统自主生成。在 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,来自同一宫颈标本的切片,用 40%~90%的磷酸水解,水解不同时间(5、15、25、35、45 min),绘制磷酸水解趋势图。选用宫颈标本切

片为目标标本,60%和 70%的磷酸水解不同时间(5、10、15、20、25、30、35、40、45 min),时间为横坐标,IOD 为纵坐标,绘制水解曲线,以 5 mol/L 盐酸水解 25 min 为对照组。

1.3.3 DNA 诊断 $DI \geq 2.5$ 的细胞定义为异倍体细胞,按照异倍体细胞数量划分,将诊断结果分为未见 DNA 倍体异常细胞(0 个)、可见少量 DNA 倍体异常细胞(1~2 个)、可见 DNA 倍体异常细胞(≥ 3 个)。选取 139 例宫颈标本和 28 例非宫颈标本,每份标本制作 2 张切片,分别用 60%磷酸和 5 mol/L 盐酸水解 25 min,以上述诊断标准对标本进行诊断,评估两种水解体系 DNA 诊断结果的一致性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,两种体系的一致性比较采用 Kappa 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特殊染色效果 细胞核 DNA 呈紫蓝色,核膜边缘及核纹理清晰,细胞质、背景无色。

2.2 磷酸水解反应规律 Easyscan 数字切片扫描与应用系统测定不同水平磷酸水解反应速率的 IOD-时间水解趋势图见图 1。结果显示,使用较高水平的磷酸进行水解反应,可以较快实现最佳水解效果。然而过高水平的磷酸,由于反应平台期短,IOD 较快地下降,不利于质控。中、高水平的磷酸具有较快的反应速率和较缓的平台期,分别选择 60%和 70%的磷酸绘制水解曲线。

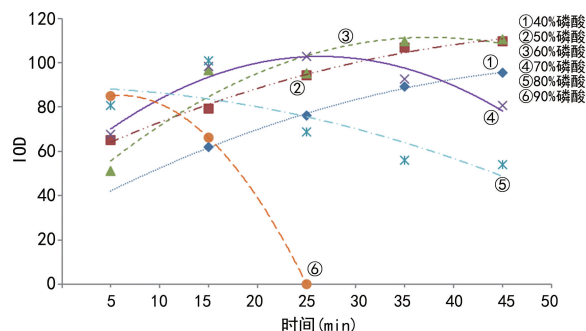


图 1 不同水平的磷酸对二倍体细胞核 DNA 作用变化的水解趋势图

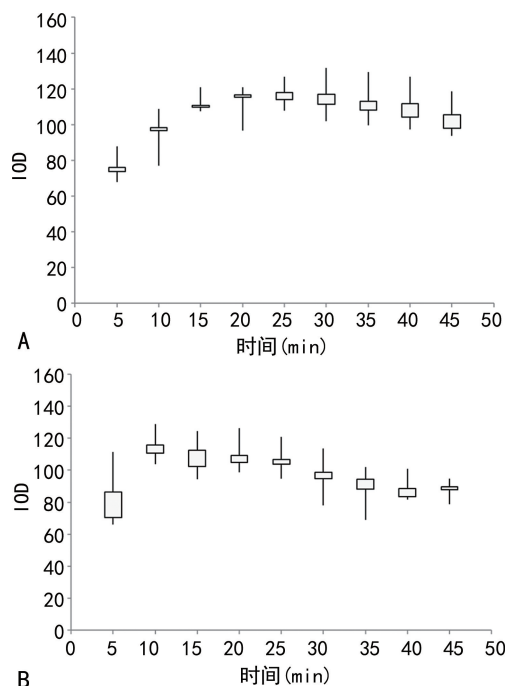
2.3 水解曲线绘制 60%磷酸的反应平台期在 15~40 min,平台期内 15、20、25、30、35、40 min 的 IOD 均值分别为 111.45、114.93、117.34、116.25、113.38、112.19,差异无统计学意义($P > 0.05$),对照组的 IOD 均值为 123.17;70%磷酸的反应平台期在 10~20 min,平台期内 10、15、20 min 的 IOD 均值分别为 116.32、110.43、110.19,差异无统计学意义($P > 0.05$),对照组的 IOD 均值为 117.45。见图 2。

2.4 DNA 诊断结果的一致性比较 Easyscan 数字切片扫描与应用系统测定并计算标本 $DI \geq 2.5$ 细胞

数,结果见表 1。60%磷酸和 5 mol/L 盐酸两种水解体系 DNA 诊断结果一致(100.00%)。

表 1 两种水解体系 DNA 诊断的一致性比较[n(%)]

| 5 mol/L 盐酸水解 | n | 60%磷酸水解 | | |
|------------------------|-----|--------------------|------------------------|---------------------|
| | | 未见 DNA 倍体异常细胞(0 个) | 可见少量 DNA 倍体异常细胞(1~2 个) | 可见 DNA 倍体异常细胞(≥3 个) |
| 未见 DNA 倍体异常细胞(0 个) | 146 | 146(100.00) | 0(0.00) | 0(0.00) |
| 可见少量 DNA 倍体异常细胞(1~2 个) | 2 | 0(0.00) | 2(100.00) | 0(0.00) |
| 可见 DNA 倍体异常细胞(≥3 个) | 19 | 0(0.00) | 0(0.00) | 19(100.00) |



注:A 为 60%磷酸的水解曲线;B 为 70%磷酸的水解曲线。

图 2 不同水平的磷酸水解曲线

3 讨论

近年来,AI 数字病理诊断技术蓬勃发展,作为研究热点之一的宫颈细胞学 AI 辅助诊断技术,为中国边远地区妇女宫颈癌筛查提供了新机遇。当然,AI 辅助诊断技术在临床推广中也面临诸多挑战。专家共识对制片染色提出了标准化要求,而宫颈巴氏染色存在品质参差不齐及染色质量不稳定等问题^[10]。本研究特殊染色法既适合于细胞 DNA 倍体分析,也适合于细胞/组织 AI 诊断的前置染色,可代替苏木素染色,进一步结合细胞/组织形态的定性及核特异着色的定量 AI 分析,为 AI 诊断开发提供新思路。尤其以磷酸为基础进行的染液配方创新,相对于以往的方法,具有不挥发、不危害健康、不破坏环境及商业化应用不受限等优点,可为全国各地妇女宫颈癌筛查事业提供更可及、更现实的意义。

特殊染色之前进行固定的目的是通过固定液各组分的渗透、固定作用,改变细胞核内各分子空间结构,使 DNA 充分暴露及固定,提高 DNA 对水解的灵

敏度和稳定性。渗透速度快的带动速度慢的试剂快速进入细胞核内共同作用,达到 1+1>2 的效果;固定时起收缩作用与膨胀作用的试剂相互搭配,起硬化作用与软化作用的试剂相互搭配,做到相互制约平衡,益处最大化,最大限度地维持细胞原始形态,保留 DNA 片段,提高细胞 DNA 图像分析的准确性。含醛固定液对特殊染色的影响已得到验证^[11],其他固定剂对水解的影响有待进一步研究。

特殊染色原理:细胞 DNA 经盐酸水解,脱氧核糖与嘌呤之间的糖苷键断开,嘌呤碱基被解离,脱氧核糖(五碳糖)一端形成游离醛基。硫堇染液与暴露出的游离醛基相互作用,生成蓝紫色化合物,从而使细胞核中的 DNA 呈紫蓝色。特殊染色既是一种特异性的染色,又是一种特殊的细胞化学反应。DNA 水解反应过程是醛基解离释放的过程,与酸的浓度、温度、时间相关^[12],在一定范围内呈正相关,超出范围则水解过度,显色程度降低,该化学反应可以通过数学公式表达描绘,一般可用于估算在任何温度和酸浓度下达到染色水解最大值所需的时间。

本研究用高水平的磷酸进行试验,以确保有足够的解离酸参与反应,实现最佳水解效果。磷酸水解趋势图表明,较高水平(60%~70%)的磷酸产生强烈的染色。这可能是由于存在高水平的 H⁺ 离子及低水平的水环境,从而最大限度地减少了 DNA 小片段扩散。在曲线高峰处暴露的醛的比例主要由脱嘌呤的速率和链断裂反应的滞后性决定。因此,水解曲线的后半部分可能有很大不同,而在曲线高峰处可用的游离醛基数量没有太大改变。不同体系的水解系统明显改变水解曲线形式,因此,可以通过使用不同的水解系统来揭示反应的某些干扰。

本研究显示,60%磷酸水解体系反应高峰顶点 IOD 略低于盐酸水解体系(IOD 均值 123.17),但从表 1 数据来看,该体系对诊断结果无明显影响。DNA 水解是一个动态反应过程,可能由于不同系统的酸对于水解的特性不同,即脱嘌呤和链断裂反应联动的差异,导致了不同体系的偏差。笔者也曾使用有机酸甲酸、乙二酸作为水解介质,但无法获得良好的水解曲线。相对于临床标本,猪肝片的染色强度、水解曲线

出现偏差,可能与猪肝固定、组织差异有关。不同的水解体系对于不同的目标对象效果不同,应尽可能针对不同目标对象进行适宜性评估。不同水解体系具有不同的水解曲线和反应至高点,DNA 诊断结果仍然是评估水解体系是否适合于临床的金标准。由于反应对磷酸水平的依赖性相当大,因此,即使水解浓度存在很小的差异,也会导致所产生游离醛基的数量出现差异,导致无法获得水解峰。总之,出于实际考虑,本研究更倾向于具有较缓平台期的水解系统使反应速率适中,该系统对染色时间依赖性低,并且以此来抵消时间因素的干扰。采用磷酸配制的 DNA(硫堇)染色液无论是染液颜色还是细胞核颜色均与传统配方一致,呈紫蓝色。相对于盐酸,磷酸的使用具有更宽的水平范围,可能与其多元中强酸有关。

综上所述,新型特殊染色法适合于细胞 AI 数字病理诊断技术,实验室应根据自身实验室标本属性选择适宜的水解体系。

参考文献

[1] 徐薇,范雪梅,赵群,等. DNA 倍体分析技术在宫颈癌早期患者筛查中的价值[J]. 中外医疗,2021,40(26):1-4.
 [2] 张雪梅,覃福宁,孙奇. 宫颈 DNA 倍体分析及 TCT 在宫颈病变早期筛查中的临床意义[J]. 重庆医学,2016,45(14):1974-1976.
 [3] 刘华,李青,曹磊,等. DNA 定量分析在子宫颈 ASC-US 患者中的分层管理作用[J]. 临床与实验病理学杂志,2021,37(4):455-457.
 [4] SHI A, MIN W, XIANG L, et al. Value of automatic DNA image cytometry for diagnosing lung cancer[J]. *Oncology*

Letters,2018,16(1):915-923.

[5] ZAINI Z M, MCPARLAND H, MØLLER H, et al. Predicting malignant progression in clinically high-risk lesions by DNA ploidy analysis and dysplasia grading[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):15874.
 [6] WANG M, HAO C, MA Q, et al. DNA image cytometry test for primary screening of esophageal cancer: a population-based multi-center study in high-risk areas in China [J]. *Chin J Cancer Res*,2016,28(4):404-412.
 [7] SCHULTE E, WITTEKIND D. Standardization of the feulgen-schiff technique. staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation[J]. *Histochemistry*,1989,91(4):321-331.
 [8] MELLO M L, VIDAL B C. The Feulgen reaction; a brief review and new perspectives[J]. *Acta Histochem*,2017,119(6):603-609.
 [9] DISTEFANO H S. Feulgen hydrolysis with perchloric acid[J]. *Stain Technol*,1952,27(3):171-174.
 [10] 中国病理医师协会数字病理与人工智能病理学组,中华医学会病理学分会数字病理与人工智能工作委员会,中华医学会病理学分会细胞病理学组,等. 宫颈液基细胞学的数字病理图像采集与图像质量控制中国专家共识[J]. *中华病理学杂志*,2021,50(4):319-322.
 [11] 黄荣祥,余岚岚,朱晨雁,等. 无醛固定液与醛类固定液对细胞核 DNA 及细胞质着色的影响[J]. *重庆医学*,2017,46(23):3241-3244.
 [12] 黄荣祥. 不同温度及染色方法对细胞 DNA 倍体诊断的影响[J]. *生物医学工程与临床*,2018,22(6):686-691.

(收稿日期:2022-05-11 修回日期:2022-12-24)

(上接第 1041 页)

[9] PHILLIPS R. PGE₂ receptor antagonist has potential to treat osteoarthritis[J]. *Nature Rev Rheumatol*,2022,18(5):245-249.
 [10] 李敏杰,刘瑞林,徐国良. 全程护理干预在良性前列腺增生症合并Ⅲ型前列腺炎患者围手术期中的应用[J]. *黑龙江医药科学*,2019,42(1):80-81.
 [11] WANG S N, FAN Y H, LIN S, et al. Meta-analysis of efficacy and safety of Qianliexin capsule combined with western medicine in benign prostatic hyperplasia treatment[J]. *TMR Integrative Medicine*,2021,5(20):1-13.
 [12] EKEYI Y, UCHENDU N O, ANADUAKA E G, et al. Ethanol extract of cassia sieberiana leaves ameliorates deviations associated with benign prostatic hyperplasia in rats[J]. *All Life*,2021,14(1):473-483.
 [13] VYDRIN P S, KALININA S N, BURLAKA O O, et al. Assessment of copulative function and severity of lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia after transurethral enucleation[J]. *Urologicheskie Vedomosti*,2021,11(2):123-132.

[14] 童占表. 经尿道前列腺电切术对前列腺增生症患者泌尿系统及性功能的影响[J]. *中国性科学*,2019,28(11):15-20.
 [15] 钱珊珊,曹学照. 盐酸氢吗啡酮硬膜外腔单次注射联合 PCIA 在经尿道前列腺电切术后的应用[J]. *中国医学创新*,2020,17(3):29-32.
 [16] 陈峰,陈益金,邹永胜,等. 前列腺激光剝除术对前列腺增生患者尿动力学参数及尿潴留的影响[J]. *实用医院临床杂志*,2021,18(4):208-211.
 [17] 马锐. 经尿道前列腺激光剝除术治疗良性前列腺增生的疗效[J]. *宁夏医科大学学报*,2021,43(8):797-801.
 [18] 徐雅,曹明奎,邓健,等. 经尿道 1 470 nm 激光前列腺剝除术与 PKRP 术对控尿功能、血清 PSA 水平的影响[J]. *四川医学*,2019,40(6):597-601.
 [19] 王成明,李普,张倩,等. 经尿道前列腺激光剝除术治疗小体积前列腺增生的疗效和安全性分析[J]. *中华泌尿外科杂志*,2021,42(11):839-843.

(收稿日期:2022-09-06 修回日期:2022-12-10)