

论著

彗星图像智能分析软件的应用研究

张文众¹,张丽英²,雍凌¹,刘玉梅¹,张馨¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;

2. 济南市第一人民医院,山东 济南 250013)

摘要:目的 为提高彗星试验的自动化和标准化,对彗星智能分析软件(Comet A)的功能和可靠性进行研究和测试。方法 在3台配置不同的计算机安装Comet A,分别由3名分析员用Comet A软件分析30张图像,并随机选取部分图片用目测法对彗星评分,然后进行统计分析;同时对软件的自动识别、自动分析、结果储存和可溯源性进行测试。结果 3名分析员分析结果未见显著性差异;目测结果和软件分析结果无显著性差异;Comet A软件具有自动识别、自动分析、结果自动存储和可溯源的功能。结论 Comet A软件稳定,结果可重复,有利于彗星试验的自动化和标准化。

关键词:彗星试验;智能软件;生物图像分析;彗星图像智能分析软件

中图分类号:R994 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)03-0197-03

Study and application of comet auto-assay software

Zhang Wenzhong, Zhang Liying, Yong Ling, Liu Yumei, Zhang Xin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To make comet assay automated and standardized; to study and test the function and reliability of comet auto-assay (Comet A) software. **Methods** Comet A software installed on 3 different computers were operated independently by 3 analysers to analyze the same 30 pieces of comet pictures; some pictures were also measured by visual scales. The results were analyzed and the functions of comet A software were tested. **Results** The results analyzed by 3 analysers independently were not significantly different from each other; there were no significant differences between the results analyzed by visual scale and Comet A. The functions of Comet A were auto selection and recognition, auto analysis, auto storage and traceable to the source. **Conclusion** The results analyzed by Comet A software are stable and reproducible, which is helpful to make comet assay automated and standardized.

Key words: Comet assay; intelligent software; bioimage analysis; comet A

彗星试验(comet assay),又称为单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis-assay, SCGE),是一种快速、简便、灵敏的检测单个细胞DNA断裂的技术,被广泛应用于多个学科^[1]。随着成像和图像分析技术的进步,彗星试验结果分析从人工目测发展到了电脑软件分析,软件分析采用多种参数供研究者从不同角度对结果进行比较。国内外应用较多的软件有SICION IMAGE、CASP和IMI等^[2]。上述软件均为手动操作,一次只能分析一个细胞,彗星头部和尾部需要逐项手工选择,受主观因素影响较大。随着IT技术的发展,全自动、高智能的分析软件时代已经来临。

彗星图像智能分析软件(comet auto assay, Comet A)可以同时多个彗星图像自动识别和分析,最大程度地减少人为因素的影响。本研究主要测试Comet A软件的稳定性、可重复性以及其自动分析的性能。

1 材料和方法

1.1 研究材料

彗星图像智能分析软件(Comet A)由北京博乐通生物科技有限公司开发,该软件具有长度校正、杂质过滤、全自动快速捕获彗星图像、自动识别彗星头部和尾部的功能。Comet A分析结果参数包括:全彗星参数(彗星长、彗星光密度、彗星重心、彗星惯量、彗星分布矩),彗星尾参数[尾长、尾光密度、尾重心、Olive尾矩、尾惯量、尾分布矩、尾DNA(%),拖尾率(%)]和彗星头参数[头长、头DNA(%),头光密度、头重心、头惯量、头分布矩、尾长/

收稿日期:2010-06-25

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:张文众 男 博士 副研究员 E-mail:zhangwz2002@sina.com

通信作者:张馨 女 副主任技师

头长]等 20 项指标。

1.2 研究方法

彗星图片采用本研究室的彗星试验图片 30 张,在 3 台配置不同的计算机安装 Comet A 软件,分别由 3 名分析员操作 Comet A 分析 30 张图片;并随机找出分析后的彗星图片用目测法评分,并与 Comet A 软件分析结果比较。同时对软件的长度校正、自动识别、自动分析、溯源和质量控制等功能进行测试。DNA 损伤目测评分法,按彗星尾部 DNA 量占全部 DNA 量的比例分为 5 级。0 级: < 5%, 无损伤;1 级: 5% ~ 20%, 轻度损伤;2 级: 20% ~ 40%, 中度损伤;3 级: 40% ~ 95%, 高度损伤;4 级: >

95%, 重度损伤。

1.3 数据分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,彗星图像智能分析软件结果用单因素方差分析,目测评分法和软件分析结果的比较用卡方分析。

2 结果

2.1 彗星图像智能分析软件分析结果

对 3 名分析员 Comet A 结果的统计分析显示,全彗星参数、彗星尾参数和彗星头参数等 20 项指标的差异均未见显著性,见表 1 ~ 3。

表 1 3 名分析员结果中全彗星参数的比较

Table 1 Comparison of full comet parameters among 3 analysers($\bar{x} \pm s$)

分析员	图片数量(张)	彗星长(μm)	彗星光密度	彗星重心	彗星惯量	彗星分布矩
1	30	142.0 \pm 35.4	84284.3 \pm 49494.6	29.0 \pm 7.9	3457.6 \pm 1864.4	51.8 \pm 14.2
2	30	138.2 \pm 40.7	81873.7 \pm 50011.5	28.7 \pm 8.6	3377.6 \pm 2015.5	50.8 \pm 15.2
3	30	144.4 \pm 35.0	83058.6 \pm 48055.1	29.1 \pm 7.4	3465.8 \pm 1739.8	52.2 \pm 12.9

表 2 3 名分析员结果中彗星尾参数的比较

Table 2 Comparison of comet tail parameters among 3 analysers($\bar{x} \pm s$)

分析员	图片数量(张)	尾光密度	尾长(μm)	尾重心	Olive 尾矩	尾惯量	尾分布矩	尾% DNA	拖尾率(%)
1	30	21729.4 \pm 20445.6	45.7 \pm 27.8	48.2 \pm 12.1	12.1 \pm 12.6	2162.2 \pm 1244.7	42.0 \pm 12.8	26.0 \pm 15.9	89.8 \pm 15.8
2	30	22258.8 \pm 21416.3	45.6 \pm 28.2	47.2 \pm 12.9	12.2 \pm 12.4	2121.0 \pm 1385.2	41.4 \pm 13.8	26.4 \pm 15.3	89.8 \pm 18.1
3	30	20297.3 \pm 20503.3	46.2 \pm 30.3	48.8 \pm 11.1	12.2 \pm 14.2	2133.2 \pm 1119.4	41.8 \pm 11.7	24.4 \pm 16.5	84.9 \pm 20.9

表 3 3 名分析员结果中彗星头参数的比较

Table 3 Comparison of comet head parameters among 3 analysers($\bar{x} \pm s$)

分析员	图片数量(张)	头长(μm)	头% DNA	头光密度	头重心	头惯量	头分布矩	尾长/头长
1	30	94.9 \pm 26.6	73.3 \pm 16.9	62554.9 \pm 38947.4	21.4 \pm 5.8	2174.3 \pm 1420.4	41.3 \pm 13.1	0.53 \pm 0.39
2	30	92.2 \pm 25.2	73.6 \pm 15.3	59615.0 \pm 36985.4	21.0 \pm 5.6	2054.9 \pm 1346.9	40.2 \pm 12.7	0.53 \pm 0.37
3	30	97.7 \pm 25.7	75.6 \pm 16.5	62761.3 \pm 38390.1	21.9 \pm 5.4	2247.3 \pm 1404.3	42.3 \pm 12.4	0.54 \pm 0.46

2.2 用目测评分法验证软件分析结果

目测评分和软件分析结果进行比较,结果显示二者结果略有差异,但是无统计学意义,见表 4。

表 4 目测评分法和 Comet A 软件分析结果比较

Table 4 Results comparison between visual scale and Comet A

目测损伤等级	目测细胞数	软件尾 DNA 含量各级细胞的数量	两种方法一致率(%)
0 级	3	3	100
1 级	15	15	100
2 级	60	61	98
3 级	12	11	98
4 级	0	0	100

2.3 彗星图像智能分析软件的性能测试

2.3.1 长度校正和自动识别功能

手工用线段测定图片中标尺,输入系统线段的长度,结果分析时系统即可自动校正长度。一次打开 10 张图片通过调整敏感度自动选定所要分析的

细胞。细胞选取可以单张调整,也可以 10 张图片同时选取。该软件同时具有人工补选、去除和分割功能,见图 1。

2.3.2 自动分析功能

该软件对于选定好的细胞,能根据光密度和位置自动确定彗星的头部和尾部,10 张图片的分析一次完成,20 个变量,所有图片中彗星的相应数据可同时输出,见图 2。

2.3.3 可溯源性

软件对分析后的图片自动标注所有分析细胞的编号,所有图像一键快速存储,自动命名(在原来图片名称前加下划线)。分析结果数据可以根据细胞的编号和图片名称找到相应的图片达到溯源的目的。

2.3.4 质量控制

图像分析前和分析后都可以进行质量控制,通

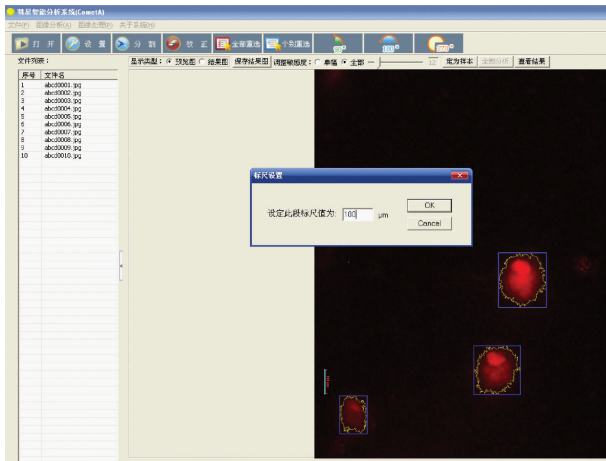


图1 Comet A 软件长度校正和自动选择
Figure 1 Length emendation and auto recognition

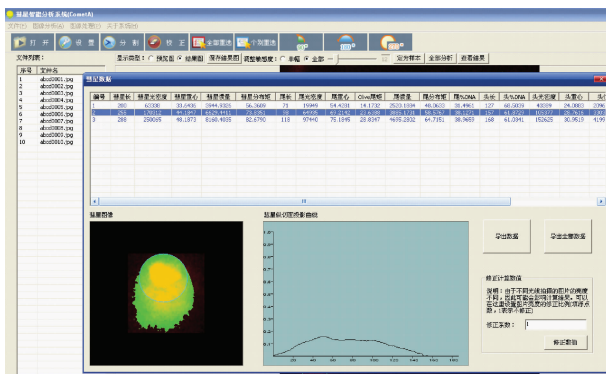


图2 Comet A 软件智能分析功能
Figure 2 Auto analysis function of Comet A

过分析前的图像选择敏感度和分析后的结果数据图像检查两种手段能保证结果的可靠性。

3 讨论

彗星试验结果的判断十分关键,目前较广泛地用于结果判断的方法主要是彗星图像分析软件。彗星图像包含的信息比较多,必须综合分析全面判断,例如彗星的长度、光密度分布和彗星的形状都是需要考虑的因素^[3]。在彗星试验中,有多种图像分析方法,最简单的分析方法是根据目测 DNA 从核心移出的距离来估计 DNA 损伤的程度,再对彗星进行经验打分^[4]。目测法对试验人员的要求比较高,必须经过严格培训并且具备彗星图像分析经验,否则很难做出准确的判断。而用图像分析软件分析则相对简单许多,实验人员培训周期短,图像分析参数可

以定量,因此用图像分析软件判断结果是较好的选择^[3]。对于新的分析软件,由经验丰富的分析员用目测法检验软件的分析结果也比较常用。本研究显示 Comet A 软件分析结果和目测法一致。

Comet A 软件的分析指标包括彗星试验结果判断的所有要素^[5]。分析软件对同一张图片的分析结果依据运行的电脑环境不同而有所不同。不同试验室的彗星成像系统差异较大、倍数不同、图像的像素不同,导致结果缺乏可比性。只有具备长度校正功能才能克服这一问题。目前大部分彗星分析软件不具备该功能。Comet A 软件系统内置长度校正功能,对于长度相关的结果无需转换即可直接反映细胞的实际情况,增加了彗星试验的可比性。本研究显示 Comet A 软件在不同计算机通过长度校正很好地克服了这一问题,不同计算机分析结果差异无统计学意义。Comet A 软件分析图像为彩色图像,不需要对图像进行灰度处理,最大程度上保存了图像的信息。本研究测试结果也显示该软件稳定、结果可重复、操作简便快捷。

此外,该软件的自动化程度高、操作简便,缩短了试验周期,提高了试验的可比性,所有结果均可溯源,有利于彗星试验的标准化和推广。

本研究提示,彗星图像智能分析软件(Comet A)敏感性和特异性好,有利于彗星实验的自动化和标准化。

参考文献

[1] OLIVE P L, RANATH J P, DURAND R. Hererogenicity in radiation induced DNA damage and repair in tumour and normal cell same a sureducing the comet assay [J]. Radiation Res, 1990,122:86-94.

[2] 邢彩虹,李桂兰,纪之莹,等. 单细胞凝胶电泳图像分析软件比较[J]. 毒理学杂志,2005,19(2):141-143.

[3] KUMARAVEL T S, VILHAR B, FAUX S P, et al. Comet Assay measurements; a perspective [J]. Cell Biol Toxicol, 2009, 25 (1):53-64.

[4] 余卫,张慧丽,景洪江,等. 彗星试验目测与图像分析结果比较[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2003,17(4):301.

[5] KALARIYA N M, RAMANA K V, SRIVASTAVA S K, et al. Genotoxic effects of carotenoid breakdown products in human retinal pigment epithelial cells[J]. Curr Eye Res,2009,34(9): 737.