

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880008207.6

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101632012A

[22] 申请日 2008.3.10

[21] 申请号 200880008207.6

[30] 优先权

[32] 2007.3.13 [33] EP [31] 07103980.4

[86] 国际申请 PCT/IB2008/050856 2008.3.10

[87] 国际公布 WO2008/110974 英 2008.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.14

[71] 申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

[72] 发明人 S·凯珀 B·H·W·亨德里克斯

R·W·I·德博尔 G·胡夫特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘鹏 刘红

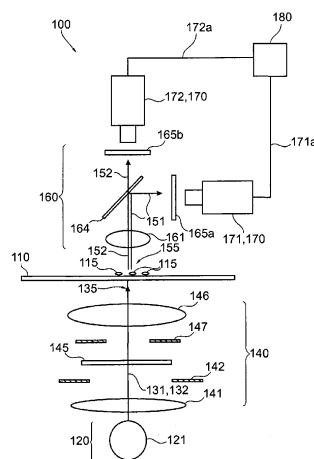
权利要求书4页 说明书19页 附图4页

[54] 发明名称

基于照明光与细胞成分之间的不同相互作用
分析生物细胞材料

[57] 摘要

描述了用于分析生物细胞材料(115)的设备(100)。该设备(100)包括光源装置(120)，其适于将第一(131)和第二照明光(132)导向细胞材料(115)，其中第一(131)和第二(132)照明光分别包含第一和第二光谱辐射成分。该设备(100)还包括检测器装置(170)，其适于接收基于第一照明光(131)与细胞材料(115)的第一相互作用的第一测量光(151)以及基于第二照明光(132)与细胞材料(115)的第二相互作用的第二测量光(152)。此外，该设备(100)包括评估单元(180)，其耦合到检测器装置(170)并且其适于评估分别指示第一(151)和第二测量光(152)的第一信号(171a)和第二信号(171b)。该设备(100)可以用于实现与NAD(P)H的自发荧光测量相结合的紫外DNA图像细胞计量术。



1. 一种用于分析生物细胞材料(115, 215, 315, 415)的设备, 该设备包括:

光源装置(120, 220, 320, 420), 其适于将第一照明光(131, 231, 331, 431)和第二照明光(132, 232, 332, 432)导向生物细胞材料(115, 215, 315, 415), 其中第一照明光(131, 231, 331, 431)包含第一光谱辐射成分并且第二照明光(132, 232, 332, 432)包含第二光谱辐射成分;

检测器装置(170, 270, 370, 470), 其适于接收

- 第一测量光(151, 251, 351, 451), 所述第一测量光基于第一照明光(131, 231, 331, 431)与细胞材料(115, 215, 315, 415)的第一相互作用, 和

- 第二测量光(132, 232, 332, 432), 所述第二测量光基于第二照明光(132, 232, 332, 432)与细胞材料(115, 215, 315, 415)的第二相互作用; 以及

评估单元(180, 280, 380, 480), 其耦合到检测器装置(170, 270, 370, 470)并且其适于评估

- 指示第一测量光(151, 251, 351, 451)的第一信号(171a, 271a, 371a, 471a), 和

- 指示第二测量光(132, 232, 332, 432)的第二信号(172a, 272a, 372a, 472a)。

2. 依照权利要求1的设备, 还包括:

用于支撑细胞材料(115, 215, 315, 415)的承载元件(110, 210, 310, 410)。

3. 依照权利要求1的设备, 其中所述第一相互作用是吸收和/或所述第二相互作用是发射荧光。

4. 依照权利要求3的设备, 其中

第一照明光(131, 231, 331, 431)适于借助于所述第一相互作用与生物细胞材料(115, 215, 315, 415)的第一细胞成分相互作用, 和/或

第二照明光(132, 232, 332, 432)适于借助于所述第二相互作用与生物细胞材料(115, 215, 315, 415)的第二细胞成分相互作用。

5. 依照权利要求4的设备, 其中
所述第一细胞成分为DNA, 和/或
所述第二细胞成分为用于细胞新陈代谢的酶, 尤其是NAD(P)H。
6. 依照权利要求1的设备, 其中
第一照明光(131, 231, 331, 431)和第二照明光(132, 232, 332, 432)是包括一定波长的紫外光, 所述波长介于150nm与350nm之间, 优选地介于200nm与300nm之间, 更优选地介于230nm与270nm之间。
7. 依照权利要求1的设备, 其中
第二照明光(132, 232, 332, 432)是包括一定波长的紫外光, 所述波长介于280nm与400nm之间, 优选地介于320nm与360nm之间, 更优选地介于330nm与350nm之间, 并且
第二测量光(152, 252, 352, 452)是包括一定波长的可见光, 所述波长介于345nm与545nm之间, 优选地介于400nm与490nm之间, 更优选地介于430nm与460nm之间。
8. 依照权利要求1的设备, 其中
所述光源装置(120, 220, 320, 420)包括宽光谱紫外光源(121, 221)。
9. 依照权利要求1的设备, 其中
所述光源装置(120, 220, 320, 420)包括
产生第一照明光(131, 231, 331, 431)的第一光源(321, 421),
以及
产生第二照明光(132, 232, 332, 432)的第二光源(322, 422)。
10. 依照权利要求1的设备, 还包括
用于将第一照明光(131, 231, 331, 431)和/或第二照明光(132, 232, 332, 432)聚焦到生物细胞材料(115, 215, 315, 415)上的光学装置(140, 240, 340, 440)。
11. 依照权利要求1的设备, 其中
所述检测器装置(170, 270, 370, 470)包括
用于接收第一测量光(151, 251, 351, 451)的第一检测器(171, 471), 以及
用于接收第二测量光(132, 232, 332, 432)的第二检测器(172, 472)。

12. 依照权利要求1的设备, 其中
所述检测器装置(170, 270, 370, 470)包括
用于接收第一测量光(151, 251, 351, 451)和第二测量光(132, 232, 332, 432)的公共检测器(270, 370), 并且其中
该设备还包括
用于以交替的方式允许第一测量光(151, 251, 351, 451)和第二测量光(132, 232, 332, 432)通过的斩波器设备(245, 265, 345, 365)。

13. 依照权利要求1的设备, 其中
第一照明光(131, 231, 331, 431)和第二照明光(132, 232, 332, 432)沿着公共入射光束路径(135, 235, 335, 435)撞击到生物细胞材料(115, 215, 315, 415)上, 并且

第一测量光(151, 251, 351, 451)和第二测量光(132, 232, 332, 432)沿着公共出射光束路径(155, 255, 355, 455)离开生物细胞材料(115, 215, 315, 415), 其中

公共入射光束路径(135, 235, 335, 435)和公共出射光束路径(155, 255, 355, 455)相对于彼此是共线的。

14. 依照权利要求3的设备, 其中
所述检测器装置(470)适于测量指示第二测量光(432)的第二信号(472a)的时间依赖关系, 并且

所述评估单元(480)适于评估第二信号(472a)的时间依赖关系。

15. 依照权利要求14的设备, 还包括
光调制设备(490), 其适于调制作为时间的函数的第二照明光(432)的强度。

16. 一种用于分析生物细胞材料(115, 215, 315, 415)的方法, 该方法包括:

将来自光源装置(120, 220, 320, 420)的包含第一光谱辐射成分的第一照明光(131, 231, 331, 431)导向细胞材料(115, 215, 315, 415);

将来自光源装置(120, 220, 320, 420)的包含第二光谱辐射成分的第二照明光(132, 232, 332, 432)导向细胞材料(115, 215, 315, 415);

借助于检测器装置(170, 270, 370, 470)接收第一测量光(151, 251, 351, 451), 所述第一测量光基于第一照明光(131, 231, 331, 431)与细胞材料(115, 215, 315, 415)的第一相互作用;

借助于检测器装置(170, 270, 370, 470)接收第二测量光(132, 232, 332, 432), 所述第二测量光基于第二照明光(132, 232, 332, 432)与细胞材料(115, 215, 315, 415)的第二相互作用;

评估指示第一测量光(151, 251, 351, 451)的第一信号; 以及
评估指示第二测量光(132, 232, 332, 432)的第二信号。

基于照明光与细胞成分之间的不同相互作用分析生物细胞材料

技术领域

本发明涉及用于例如为了区分癌性肿瘤细胞和良性肿瘤细胞而分析生物细胞材料的设备和方法。

背景技术

肿瘤的早期检测是有效地战胜肿瘤的最重要的前提条件。这也将决定性地提高治愈肿瘤患者的希望。为了避免多次手术，希望的是在一次手术期间识别肿瘤组织。为了进一步从患者中移除组织，外科医生因而可以考虑有关肿瘤细胞类型的可靠信息。

目前，肿瘤划界（border demarcation）是由病理学家通过分析所谓的“冷冻切片”来实现的。这种技术花费大约一个小时；通常，由于等待时间长，因而不进行术中研究，在所述等待时间期间，患者敞开着躺在手术台上。一种可替换方案是执行DNA细胞计量术以实现肿瘤划界，条件是结果可快速地获得。然而，病理学家对可疑细胞和正常细胞的选择是费时并且因而昂贵的过程。病理学家典型地花费半小时来选择足够的细胞以便得到统计上可靠的结果。此外，用于DNA细胞计量术的标准福尔根（Feulgen）染色过程花费五个小时。

US2002/0128557A1公开了一种用于检测肿瘤组织的器械，其包括至少一个激发光源，所述第一激发光源发射波长介于300nm与314nm之间的第一激发光并且包括至少一根用于将第一激发光导向待检查组织的目标场的光纤。该器械还包括至少一个用于将由第一激发光产生的组织的自发荧光信号和/或重发射信号投射到相机的CCD或ICCD芯片上的透镜。此外，该器械包括用于处理由相机传送的信号的数据处理系统。所述透镜能够处理UV光并且被设计成使得来自荧光目标场的不同光谱区域的至少两幅图像被产生并且投影到CCD或ICCD芯片上。至少一幅图像代表所述目标场的自发荧光信号和/或重发射信号的UV范围并且另一幅代表不同的波长范围。

US5131398公开了一种用于使用本体荧光（native fluorescence）将癌性肿瘤和组织与良性肿瘤和组织或正常组织区分开来的方法和器械。待

检查的组织利用300nm的单色光束来激发。从组织发射的本体荧光的强度在340nm和440nm处进行测量。然后，计算这两个强度之比并且将其用作确定组织是否为与良性或正常相对的癌性的基础。该方法和器械依赖于以下发现：当以300nm的单色光激发组织时，从大约320nm到600nm的区域上的本体荧光光谱是癌性的组织，并且与在组织为良性或正常的情况下得到的本体荧光光谱截然不同。这个技术对于人类以及动物组织的活体内和活体外测试都是有用的。

可能存在提供允许快速而可靠地分析生物细胞材料的设备和方法的需要。

发明内容

这个需要可以通过依照独立权利要求的主题来满足。从属权利要求描述了本发明的有利实施例。

依照本发明的第一方面，提供了用于分析生物细胞材料的设备。所描述的设备包括：(a)光源装置，其适于将第一照明光和第二照明光导向细胞材料，其中第一照明光包含第一光谱辐射成分并且第二照明光包含第二光谱辐射成分；以及(b)检测器装置，其适于接收第一测量光和第二测量光，所述第一测量光基于第一照明光与细胞材料的第一相互作用，所述第二测量光基于第二照明光与细胞材料的第二相互作用。所描述的生物细胞材料分析设备还包括(c)评估单元，其耦合到检测器装置并且其适于评估指示第一测量光的第一信号以及指示第二测量光的第二信号。

本发明的这个方面基于以下思想：在许多应用中，至少修改一些细胞的结构和/或组成的疾病的不同指示器是彼此独立的。因此，通过组合至少两个指示细胞材料的不同特性的独立测量结果，可以显著地增大诊断的精度。这尤其对于癌细胞的识别是成立的。

细胞材料的组合分析可以使得由病理学家选择可疑细胞和正常细胞不再是必要的。因此，实际的细胞计量术测量之前的费时且昂贵的细胞分类过程可能变得过时了。这可以提供以下优点：可以快速得多地分析已经从患者中取出的组织，并且也可以快速得多地获得诊断过程的结果。因此，可以显著地降低其间患者敞开着躺在手术台上的时间跨度以及因而受感染的风险。

应当提及的是，在本申请中，术语光用于包括紫外、可见和红外光谱范围的电磁辐射。因此，第一照明光、第二照明光、第一测量光以及第二测量光都可以具有该光谱范围内的任何波长。

应当提及的是，所描述的细胞分析设备可以用于活体内和活体外应用。在活体内应用的情况下，可以通过将第一和第二照明光直接定向到所研究的患者组织上来直接地分析该组织。

依照本发明的一个实施例，所述设备还包括用于支撑细胞材料的承载元件。该承载元件可以是适合用于将生物细胞材料保持在第一或第二测量光的光路上的任何元件。该承载元件可以是例如显微术中公知的物体支持器。然而，该承载元件也可以是管状物，所述管状物用于在生物细胞材料通过第一或第二测量光的光路时引导该生物细胞材料。这种管状物在流量细胞计量术器械（例如荧光激励细胞分类（FACS）仪器）中是公知的。

依照本发明的另一个实施例，所述第一相互作用是吸收和/或所述第二相互作用是发射荧光。这可以提供以下优点：可以借助于相对简单的光学设置实现所述设备。

在这个方面，应当提及的是，在本申请中，术语吸收不仅用于所研究的生物细胞材料内物理地吸收的电磁辐射或光子。相反地，术语吸收被假定涵盖了降低穿过细胞材料的光束强度的所有的物理作用。这种强度降低作用例如光散射，其使得散射的辐射从主光束中去除。当然，代替测量透射光束的强度降低的是，也可以通过测量旁边的散射光的强度来获取第一相互作用的强度。

在这点上，应当提及的是，当然由所描述的发射荧光相互作用产生的第二测量光被发射到 4π 的立体角内。这意味着可以在相对于第二照明光的方向的任何方向上检测第二测量光。

依照本发明的另一个实施例，(a) 第一照明光适于借助于第一相互作用与生物细胞材料的第一细胞成分相互作用，和/或 (b) 第二照明光适于借助于第二相互作用与生物细胞材料的第二细胞成分相互作用。这意味着可以优化所描述的生物细胞分析设备，以便独立地分析不同的测量值，所述测量值指示不同的细胞成分的特性。由于诸如癌症之类的许多疾病引起对于病原细胞的不同修改，因而所描述的设备允许以高的精度分析生物细胞。因此，可以显著地增大识别和/或评估病原细胞数量的

可靠性。

依照本发明的另一个实施例，所述第一细胞成分为DNA和/或所述第二细胞成分为用于细胞新陈代谢的酶。特别地，第二细胞成分为NAD(P)H。这基于以下观察：用于癌症的为细胞核中DNA的增量的第一指示器以及用于癌症的为NAD(P)H的增加的水平第二指示器基本上是独立的。这意味着可以同时研究两种不同的细胞成分，这两者据发现在很大程度上指示恶性癌细胞的识别。

特别地，吸收的程度可以高度地指示细胞材料内存在的DNA材料的数量。由于恶性细胞典型地包含较高数量的DNA，因而由生物细胞材料引起的吸收可以用作将细胞分类成良性细胞或恶性细胞的第一指示器。欲知DNA吸收测量的综述，请参见“G. Haroske, F. Giroud, A. Reith and A. Bocking, 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry, *Analytical Cellular Pathology* 17 (1998) 189-200”。该出版物的公开通过引用合并于此。

为了增大检测所述第一相互作用的灵敏度，可以利用适当的荧光分子对DNA染色。为了对DNA染色，特别是已知的福尔根方法被认为是合适的。

关于代表第二细胞成分的NAD(P)H，应当提及的是，当第二照明光包含用于激发NAD(P)H的适当的光谱成分时，相应的荧光信号的强度将在很大程度上指示所研究的细胞内的NAD(P)H的含量。由于在癌细胞中，该含量比在正常细胞中高得多，因而第二测量光的强度也指示将细胞分类成良性细胞或恶性细胞。欲知有关不同类型细胞内NAD(P)H的不同含量的细节，请参见出版物“*I. Georgakoudi et al., NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes, Cancer Research* 62 (2002) pp. 682-687”。该出版物的公开通过引用合并于此。

对于识别癌细胞，所研究的细胞内DNA的数量和NAD(P)H的含量二者的所描述的组合评估比仅仅依赖于NAD(P)H含量的过程可靠得多。情况之所以如此，是因为可能出现一些正常细胞由于偶然增大的细胞活性的原因（例如增殖细胞）也可能表现出增大的NAD(P)H含量。因此，所描述的细胞分析设备可以提供以下优点：与已知的器械（例如FACS仪器）相比，识别癌细胞的可靠性显著地增大了。

依照本发明的另一个实施例，所述第一照明光和第二照明光是包括一定波长的紫外光，所述波长介于150nm与350nm之间，优选地介于200nm与300nm之间，更优选地介于230nm与270nm之间。

这可以提供以下优点：可以检测细胞内第一细胞成分的数量或DNA的数量，而不必执行复杂的染色过程，比如福尔根染色过程。这基于以下事实：DNA对所描述的260nm周围的光谱范围的紫外光的吸收比其他细胞成分强烈得多。因此，通过省略细胞染色，所描述的设备允许实现快速且便宜得多的DNA细胞计量。

依照本发明的另一个实施例，所述第二照明光是包括一定波长的紫外光，所述波长介于280nm与400nm之间，优选地介于320nm与360nm之间，更优选地介于330nm与350nm之间。此外，所述第二测量光是包括一定波长的可见光，所述波长介于345nm与545nm之间，优选地介于400nm与490nm之间，更优选地介于430nm与460nm之间。

这可以提供以下优点：可以检测第二细胞成分的含量或NAD(P)H的含量，而不必执行复杂的染色过程。这基于以下事实：NAD(P)H本身可以由紫外光激发。其中，紫外光包含所描述的340nm周围的光谱范围内的光谱成分。随后的去激发产生445nm周围的光谱范围内的荧光或第二测量光。由于无需利用荧光分子对NAD(P)H染色或标记，因而激发和去激发NAD(P)H的物理效应都由术语自发荧光描述。

依照本发明的另一个实施例，所述光源装置包括宽光谱紫外光源。光源可以是例如宽光谱UV灯。这种UV灯可以代表所描述的细胞分析设备的适当光源。

可以使用适当的光谱通带滤波器 (pass filter)，其在光谱域对来源于紫外光源的光定形，使得第一照明光和第二照明光可以从光谱上彼此区分。然而，第一照明光和第二照明光的光谱重叠是可能的。

公共的空间光路可以用于第一和第二照明光。这意味着可以是单通带滤波器或者至少两个不同的光谱滤波器的适当组合的光谱通带滤波器表现出两个透射最大值。第一透射最大值可以为所述第一相互作用而优化，并且第二透射最大值可以为所述第二相互作用而优化。

在测量所研究的细胞内DNA的数量以及NAD(P)H的含量二者的情况下，在光谱域中，第一透射最大值应当位于260nm附近（针对DNA的吸收最大值）并且第二透射最大值应当位于340nm附近（针对NAD(P)H

自发荧光的激发最大值)。

应当提及的是，为了使得NAD(P)H的自发荧光测量更灵敏，来源于宽光谱紫外光源的光路内的光谱通带滤波器或者另外的阻挡滤波器应当确保没有445nm周围的可见光能够撞击所研究的细胞材料。在这种情况下，保证了可能已经被检测的所有可见光或445nm周围的光由NAD(P)H的自发荧光效应产生。

依照本发明的另一个实施例，所述光源装置包括(a)产生第一照明光的第一光源以及(b)产生第二照明光的第二光源。

在测量所研究的细胞内DNA的数量和NAD(P)H的含量二者的情况下，发射包含253nm线的光谱的深UV灯(例如汞灯)适用于执行上述DNA UV吸收测量。为了执行NAD(P)H自发荧光测量，优选地可以使用诸如发光二极管之类的340nm UV灯。

应当提及的是，在使用不同的光源时，同样可以使用适当的滤波器元件。特别地，如上面已经描述的，阻挡445nm周围的可见光的滤波器可以用于增大NAD(P)H自发荧光测量的灵敏度。

所述第一照明光和第二照明光可以以不同的入射角撞击到所研究的细胞材料上。这可以提供以下优点：与第一照明光有关的第一测量光以及与第二照明光有关的第二测量光在空间上分离，从而可以简单地通过采用两个设置在不同位置的相应检测器来实现第一照明光和第二照明光的分开的检测。

然而，第一照明光和第二照明光也可以以相同的入射角撞击到所研究的细胞材料上。这意味着在撞击细胞材料之前，第一照明光和第二照明光沿着公共的入射光束路径传播。为了将来源于第一光源的光和来源于第二光源的光与该公共入射光束路径耦合，可以采用分束器或者优选地采用二向色镜。

依照本发明的另一个实施例，所述设备还包括用于将第一照明光和/或第二照明光聚焦到生物细胞材料上的光学装置。这可以提供以下优点：可以以高的空间分辨率照明生物细胞材料，从而甚至可以研究单独的细胞。

所述光学装置可以包括两个透镜或光学器件，其被设计和设置成使得第一照明光和/或第二照明光沿着与显微镜光路相应的光路传播。因此，可以实现用于照明所研究的生物材料的特别高的空间分辨率。

在借助于分束器和/或二向色镜光学耦合第一照明光和第二照明光的情况下，单个光学装置可以用于这两个照明光。

依照本发明的另一个实施例，所述检测器装置包括（a）用于接收第一测量光的第一检测器以及（b）用于接收第二测量光的第二检测器。

所述第一和/或第二检测器可以是例如包括一定空间分辨率的相机。这可以提供以下优点：也可以以一定空间分辨率进行光检测。因此，可以采用至少一个适当的光学器件以便提供一定空间分辨率，这允许单独地分析所研究的细胞。

在检测的第一测量光和检测的第二测量光沿着相同的方向来自生物细胞材料的情况下，第一测量光可以借助于分束器或二向色镜与第二测量光在空间上分离。

依照本发明的另一个实施例，所述检测器装置包括用于接收第一测量光和第二测量光的公共检测器，并且整个细胞分析设备还包括用于以交替的方式允许第一测量光和第二测量光通过的斩波器设备。

其中，所述斩波器设备可以配备（a）用于允许第一测量光通过并且阻挡第二测量光的第一光谱滤波器元件以及（b）用于允许第二测量光通过并且阻挡第一测量光的第二光谱滤波器元件。这可以提供以下优点：甚至当使用单个公共检测器时，所描述的细胞分析设备也适于单独地测量第一测量光和第二测量光。

可以提供另外的斩波器设备，其设置在第一照明光或第二照明光的光路上。该另外的斩波器设备可以配备（a）用于允许第一照明光通过并且阻挡第二照明光的另外的第一光谱滤波器元件以及（b）用于允许第二照明光通过并且阻挡第一照明光的另外的第二光谱滤波器元件。

应当提及的是，也可以借助于空间解析检测器（例如相机）实现所述公共检测器。特别地，与适当的光学装置相结合，这可以提供以下优点：可以以一定空间分辨率实现测量光检测，这允许单独地分析所研究的细胞。

依照本发明的另一个实施例，（a）第一照明光和第二照明光沿着公共入射光束路径撞击到生物细胞材料上，并且（b）第一测量光和第二测量光沿着公共出射光束路径离开生物细胞材料。其中，所述公共入射光束路径和公共出射光束路径相对于彼此是共线的。

这可以提供以下优点：可以以包括单个主光轴的相对简单的光学设

置实现所描述的生物细胞分析设备。优选地，由所述公共入射光束路径的方向和公共出射光束路径的方向限定的这个光轴被定向成至少近似垂直于生物细胞材料的表面。

依照本发明的另一个实施例，(a)所述检测器装置适于测量指示第二测量光的第二信号的时间依赖关系，并且(b)所述评估单元适于评估第二信号的时间依赖关系。这可以提供以下优点：可以评估健康细胞和癌细胞之间的另外的区别性特性。因此，可以进一步提高利用所描述的设备进行细胞分析的可靠性。

优选地，可以使用NAD(P)H的自发荧光信号的平均荧光寿命。这种可能性基于以下观察：在癌细胞中，NAD(P)H的平均自发荧光寿命比在健康细胞中短得多。欲知有关荧光寿命与细胞类型的依赖关系的更多细节，请参见出版物“*D. Elson et al., Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue, Photochem. Photobiol. Sci. 3, p. 795-801 (2004)*”。该出版物的公开通过引用合并于此。

依照本发明的另一个实施例，所描述的生物细胞材料分析设备还包括光调制设备，其适于调制作为时间的函数的第二照明光的强度。

这可以提供以下优点：可以产生第二照明光的预定时间依赖关系，所述第二照明光产生例如细胞内NAD(P)H的荧光激发。因此，可以仅仅通过以与第二照明光的调制同步的方式测量第二测量光的时间依赖关系，以精确而容易的方式观察荧光去激发的时间依赖关系。其中，荧光去激发可以在时间上与荧光激发对准。

所述调制设备可以以许多不同的方式来实现。例如，该调制设备可以是适当的电子电路，其控制发射第二照明光的光源。在光源是可以以高的重复率重复地打开和关闭的发光二极管的情况下，这种调制的控制是特别有利的。

所述调制设备还可以是斩波器设备，其重复地阻挡至少第二照明光。在其中阻挡第二照明光的时间跨度期间，不发生荧光激发并且可以观察到先前激发的分子的荧光去激发。显然，当以脉冲方式执行荧光激发时，测量荧光寿命的灵敏度最大。这意味着在两个荧光激发时间窗之间，第二照明光完全被抑制。这当然(a)对于其中控制发射第二照明光的光源的实施例以及(b)对于其中斩波器设备用于调制第二照明光的实施例是成立的。

应当提及的是，利用第一照明光执行的吸收测量结果并没有表现出任何时间依赖关系，因为吸收和散射效应总是相对于荧光去激发跃迁的时间标度迅速地发生。因此，假如第一照明光束的时间依赖关系已知，那么就可以仅仅通过将第一测量光的强度与第一照明光的强度进行比较来精确地测量第一照明光束的吸收。这意味着也对第一照明光束的调制并不使得第一照明光束的吸收测量结果较不可靠。

依照本发明的另一个方面，提供了用于分析生物细胞材料的方法。所描述的方法包括：(a) 将来自光源装置的包含第一光谱辐射成分的第一照明光导向细胞材料；(b) 将来自光源装置的包含第二光谱辐射成分的第二照明光导向细胞材料；(c) 借助于检测器装置接收第一测量光，所述第一测量光基于第一照明光与细胞材料的第一相互作用；以及(d) 借助于检测器装置接收第二测量光，所述第二测量光基于第二照明光与细胞材料的第二相互作用。所描述的生物细胞材料分析方法还包括(e) 评估指示第一测量光的第一信号以及(f) 评估指示第二测量光的第二信号。

本发明的这个方面基于以下思想：通过组合指示特定细胞缺陷和/或特定疾病的两个独立测量参数，可以显著地增大识别这些细胞类型的诊断精度。这尤其对于将细胞识别成良性的或恶性的细胞是成立的，因为与正常良性细胞相比，恶性癌细胞在不同光谱段中表现出光学特性的相对较强的变化。光学特性的这种变化可能基于癌细胞与正常细胞相比的结构和/或化学变化。

所研究的细胞材料的所描述的组合分析可以使得由病理学家选择可疑细胞和正常细胞不再是必要的。因此，实际的细胞计量术测量之前的费时且昂贵的细胞分类过程可能变得过时了。这可以提供以下优点：可以快速得多地分析已经从患者中取出的组织，并且也可以快速得多地获得诊断过程的结果。因此，可以显著地降低其间患者敞开着躺在手术台上的时间跨度。

应当提及的是，所描述的方法仅可以与生物细胞材料一起使用，所述生物细胞材料不可逆地从患者身体中取出。因此，当执行所描述的方法时，不存在与患者活体的直接相互作用。此外，所描述的方法不能够直接导致患者正经受痛苦的诊断。所描述的方法只是能够帮助医生根据其医学知识找到某种诊断结果。其中，医生也可以考虑其他的诊断方法，

其与所描述的方法相结合能够帮助医生进行更可靠的诊断。

换言之，所描述的方法并不用于提供诊断或者关乎治疗患者。所描述的方法以及本发明的所有其他方面和实施例仅仅提供附加的和更详细的信息，其可以帮助医生达到诊断结果和/或决定适当的医疗过程。

应当指出的是，已经针对不同的主题描述了本发明的实施例。特别地，已经参照设备类型权利要求描述了一些实施例，同时参照方法类型权利要求描述了其他的实施例。然而，本领域技术人员根据上述和以下描述应当能够推断，除非另有申明，除了属于一种类型的主题的特征的任意组合之外，与不同主题有关的特征之间，特别是设备类型权利要求的特征与方法类型权利要求的特征之间的任意组合也都被认为由本申请公开。

本发明的上面限定的方面以及其他的方面根据以下将要描述的实施例实例是清楚明白的，并且参照这些实施例实例进行解释。在下文中，将参照实施例实例更详细地描述本发明，但是本发明并不限于这些实施例实例。

附图说明

所有附图都示出了用于执行与NAD(P)H的自发荧光测量相结合的UV DNA吸收细胞计量术测量的细胞分析设备。

图1示出了包括一个UV宽带光源和两个检测器的细胞分析设备。

图2示出了包括一个UV宽带光源和一个检测器的细胞分析设备，其中借助于斩波轮实现了光谱分离。

图3示出了包括两个UV光源和一个检测器的细胞分析设备，其中借助于斩波轮实现光谱分离。

图4示出了用于评估NAD(P)H的自发荧光寿命的细胞分析设备，其中该细胞分析设备包括两个UV光源和两个检测器，并且其中调制设备用于调制自发荧光激发光束的强度。

具体实施方式

附图中的图示是示意性的。应当指出的是，在不同的附图中，给具有相同功能的相同元件或相似元件提供了附图标记，其仅在第一数字与相应的附图标记不同。

图 1 示出了细胞分析设备 100，其适于进行与 NAD(P)H 的自发荧光相结合的 UV DNA 吸收细胞计量术。该设备包括承载元件 110，其借助于例如光学显微术中已知的物体支持器来实现。承载元件 110 支撑细胞材料 115，所述细胞材料可能包含良性或正常细胞以及恶性或癌细胞。设备 100 适于促进细胞 115 类型的识别，从而与用于细胞分类的已知设备相比，细胞识别的速度和可靠性都可以增大。

设备 100 包括光源装置 120，其依照图 1 所示的实施例为宽光谱紫外光源 121。光源 121 发射宽带 UV 光束，其被导向承载元件 110。在光源 121 与承载元件 110 之间，设置了光学装置 140。由图 1 可见，光学装置 140 包括场透镜 141、场光阑 142、聚光器光阑 147 以及聚光透镜 146。所有这些光学元件都以关于 UV 光束的光束路径对称的方式设置。在场光阑 142 与聚光器光阑 147 之间，提供了光谱通带滤波器 145。

光谱通带滤波器 145 被设计成使得具有 260nm 周围的光谱分布的第一照明光束 131 以及具有 340nm 周围的光谱分布的第二照明光束 132 能够通过光谱通带滤波器 145。优选地，光谱通带滤波器 145 包括这些波长附近的两个透射最大值。然而，同样具有单个宽光谱透射最大值的光谱通带滤波器 145，使得具有 250nm 周围的波长分布的第一电磁辐射以及具有 340nm 周围的波长分布的第二电磁辐射能够通过该滤波器 145。

依照这里描述的实施例，场透镜 141、场光阑 142、聚光透镜 146 以及聚光器光阑 147 表示所谓的 Köhler 照明系统。这可以提供以下优点：可以实现对所研究的细胞材料 115 的均匀照明，其中诸如宽光谱紫外光源 121 的螺旋缠绕灯丝之类的内部结构不投影或成像到所研究的细胞材料 115 所在的平面上。

在通过滤波器 145 之后，可以假设具有大约 250nm 的波长的第一照明光 131 以及具有大约 340nm 的波长的第二照明光 132 撞击到细胞材料 115 上。其中，这两个照明光束 131、132 沿着相同的公共入射光束路径 135 传播。

具有大约 260nm 的波长的第一照明光 131 将主要由所研究的细胞 115 的细胞核内的 DNA 吸收。因此，细胞 115 内 DNA 的数量将决定透过细胞材料 115 的第一测量光 152 的强度。

具有大约 340nm 的波长的第二照明光 132 将主要激发 NAD(P)H，使得一旦随后去激发 NAD(P)H，就可以观察到具有大约 445nm 的波长

的自发荧光信号。依照这里所描述的实施例，这个自发荧光信号是沿着与第一照明光束 131 或第二照明光束 132 的方向共线的方向观察的。代表第二测量光的相应自发荧光光束用附图标记 152 表示。第二测量光 152 和第一测量光 151 沿着公共出射光束路径 155 离开细胞材料 115。

细胞分析设备 100 还包括光学装置 160。该光学装置 160 包括物镜 161 以及对于具有大约 260nm 的波长的辐射基本上反射并且对于具有大约 445nm 的波长的辐射基本上透明的二向色镜 164。因此，其强度指示细胞材料 115 中 DNA 的数量的第一测量光 151 被反射。相应地，其强度指示细胞材料 115 中 NAD(P)H 的含量的第二测量光 152 被透射。

细胞分析设备 100 还包括检测器装置 170，该检测器装置包括第一检测器 171 和第二检测器 172。第一检测器 171 配备了对于大约 260nm 的波长具有透射最大值的光谱通带滤波器 165a。第二检测器 172 配备了对于大约 445nm 的波长具有透射最大值的通带滤波器 165b。由图 1 可见，第一检测器 171 在空间上被设置用于接收反射的第一测量光 151，而第二检测器 172 在空间上被设置用于接收透射的第二测量光 152。

第一检测器 171 提供信号 171a，其指示第一测量光 151。第二检测器 172 提供信号 172a，其指示第二测量光 152。信号 171a 和 172a 都被馈送到评估单元 180。评估单元 180 适于通过以适当的方式组合这两个独立的信号 171a 和 172a 来评估它们。因此，可以产生另外的参数，其可以表示包含在细胞材料 115 内的细胞类型的可靠指示器。该另外的参数可以向医生给出有关细胞材料 115 的组成的有价值的信息。

依照这里所描述的实施例，第一检测器 171 和第二检测器 172 是借助于相机来实现的。相机 171、172 具有一定的空间分辨率，其当然也与物镜 161 的焦距有关。一定空间分辨率的提供可以提供以下优点：可以单独地检测来源于各细胞 115 的光。结果，可以单独地研究所研究的细胞材料 115 中包含的细胞。这种单独的研究可以仅仅通过以逐像素的方式评估记录的光强来同时进行。因此，第一相机 171 的每个像素应当分配给第二相机 172 的确定像素以便为可能的两个测量光 151 和 152 进行组合的空间分辨分析。

应当提及的是，自发荧光 152 的检测灵敏度可以通过使用有效地阻挡 445nm 周围的可见光的通带滤波器 145 来增大。在这种情况下，可以保证可能已经被第二相机 172 检测的所有可见光或 445nm 周围的光真正

由 NAD(P)H 的自发荧光效应产生，而不是由例如通过不希望的散射效应到达检测器 172 的光产生。

图 2 示出了细胞分析设备 200，其包括单个宽光谱紫外光源 221 和公共检测器 270。公共检测器 270 (a) 用于接收指示由细胞材料 215 内的 DNA 数量引起的第一照明光 231 (260nm) 的吸收的第一测量光 251 (260nm) 并且 (b) 用于接收指示借助于第一照明光 231 (340nm) 激发 NAD(P)H 而引起的 NAD(P)H 的自发荧光信号的强度的第二测量光 252 (445nm)。

细胞分析设备 200 包括许多部件，这些部件已经参照图 1 所示的实施例进行了详细的解释。因此，为了避免不必要的重复，在下文中将主要描述某些部件，这些部件不同于设备 100 的相应部件或者这些部件不用于细胞分析设备 100 中。

与其中实现了第一测量光 151 和第二测量光 152 之间的空间分离的细胞分析设备 100 形成对照的是，细胞分析设备 200 使用时间分离以便将第一测量光 251 和第二测量光 252 分开。该时间分离由两个斩波轮实现，所述斩波轮即第一斩波轮 245 和第二斩波轮 265。

第一斩波轮 245 包括光谱通带滤波器 245a 和 245b 的交替序列。通带滤波器 245a 对于具有大约 260nm 的波长的辐射是透明的，而通带滤波器 245b 对于具有大约 340nm 的波长的辐射是透明的。

第二斩波轮 265 包括光谱通带滤波器 265a 和 265b 的交替序列。通带滤波器 265a 对于具有大约 260nm 的波长的辐射是透明的，而通带滤波器 265b 对于具有大约 445nm 的波长的辐射是透明的。

这两个斩波轮 245 和 265 以同步方式工作，使得在第一时间段内，通带滤波器 245a 设置在照明光束 131、132 内并且通带滤波器 265a 设置在测量光束 151、152 内。相应地，在第二时间段内，通带滤波器 245b 设置在照明光束 131、132 内并且通带滤波器 265b 设置在测量光束 151、152 内。这意味着以顺序的方式进行 (a) 260nm 波长处的 DNA 吸收测量以及 (b) 对于激发在 340nm 处和对于去激发在 445nm 处的自发荧光测量。

应当提及的是，图 1 和图 2 中示出的实施例都具有以下优点：只有单个 UV 光源 121、221 是必要的，以便进行 UV 细胞计量术吸收测量以及 NAD(P)H 激发。与使用两个单独的 UV 光源形成对照的是，细胞分

析设备 100、200 的光学设置更容易并且构造细胞分析设备 100、200 的费用更低。

图 3 示出了细胞分析设备 300，其与图 2 所示的细胞分析设备 200 的不同之处在于提供了两个 UV 光源 321 和 322 而不是单个宽光谱光源 221。第一光源 321 为深紫外光源，例如汞灯，其发射包含强的 253nm 线的 UV 辐射。第二光源 322 可以是优选地在 340nm 处具有发射最大值的发光二极管。由这两个 UV 光源 321 和 322 发射的 UV 辐射通过使用二向色镜 334 而进行空间组合，所述二向色镜对于 253nm 基本上透明并且对于 340nm 是反射的。

如上面已经参照图 2 所描述的，第一照明光 331 和第二照明光 332 之间的时间分离是通过第一斩波轮 345 实现的。第一测量光 351 和第二测量光 352 之间的分离是通过第二斩波轮 365 实现的，所述第二斩波轮相对于第一斩波轮 345 以同步的方式工作。欲知细胞分析设备 300 的其他部件的细节，请参见前面对于细胞分析设备 100 和 200 的描述。

图 4 示出了细胞分析设备 400，其结合了 UV DNA 吸收测量，用于评估所研究的细胞 415 内存在的 NAD(P)H 的自发荧光寿命。该细胞分析设备包括两个 UV 光源 421 和 422 以及两个相机 471 和 472。

UV 光源 421 光学耦合到第一检测器 471。相应的第一照明光束 431 在撞击到细胞材料 415 上之前透过二向色镜 434 并且穿过光学装置 440。在主要由细胞 415 的细胞核内的 DNA 引起的部分吸收之后，剩余的第一测量光束 431 进入光学装置 460。在二向色镜 464 处，第一测量光束 431 被反射并且在通过通带滤波器 465a 之后，第一测量光束 431 由第一相机 471 检测。

为了能够测量 NAD(P)H 的自发荧光寿命，必须在时间上调制第二照明光束 432 的强度。优选地，不连续地打开和关闭第二照明光束，使得瞬时强度中心 (hub) 最大。在图 4 所描述的实施例中，这是通过斩波器设备 490 实现的，所述斩波器设备置于第二光源 422 和二向色镜 434 之间。

斩波器设备 490 包括分段快门轮，其在旋转时重复地阻挡第二照明光 432。因此，产生了 NAD(P)H 的脉冲式激发。每个脉冲式激发引起相应自发荧光信号的随后的时间衰减，所述自发荧光信号由第二相机 472 作为第二测量光束 452 而接收。由于 NAD(P)H 的激发不是以无限短激

发脉冲而是在快门轮 490 的旋转频率和空间分段给定的有限时间跨度内完成的，因而更容易观察到激发的 NAD(P)H 的平均荧光寿命。

欲知细胞分析设备 400 的其他部件的细节，请参见前面对于细胞分析设备 100、200 和 300 的描述，其中描述了相应的部件。如上面已经指出的，这些部件利用若干附图标记来表示，所述附图标记仅仅在第一数字上与相应的附图标记不同。

应当提及的是，为了观察平均荧光寿命，必不可少的是，至少第二相机 472 能够观察到第二测量光 452 的强度的时间依赖关系。该时间依赖关系可以与相同细胞材料 415 的 DNA 引起的 UV 吸收的值结合使用，以便可靠地评估细胞材料 415 的类型。

此外，应当提及的是，当然本发明并不限于 DNA 吸收和 NAD(P)H 的自发荧光的组合测量。本发明也可以用人类或动物细胞的其他成分来实现。取决于这些成分的光谱光学特性，也可以将其他的波长用于第一照明光和第二照明光。对于滤波器元件也是如此，所述滤波器元件也可以适于第一测量光和第二测量光的其他光谱范围。

用于分析生物细胞材料 115、215、315、415 的所有描述的细胞分析设备 100、200、300、400 可以特别地应用于医院或门诊中的手术期间，这时外科医生在切除肿瘤时需要有关组织恶性的快速信息。此外，所描述的细胞分析设备 100、200、300、400 可以用于癌症筛查目的。

应当指出的是，措词“包括/包含”并没有排除其他的元件或步骤，并且“一”或“一个”并没有排除复数。此外，可以对结合不同实施例描述的元件进行组合。还应当指出的是，权利要求中的附图标记不应当被视为对权利要求范围的限制。

为了概括上面描述的本发明的实施例，可以做如下陈述：

描述了用于分析生物细胞材料 115 的设备 100。设备 100 包括光源装置 120，其适于将第一 131 和第二照明光 132 导向细胞材料 115，其中第一 131 和第二照明光 132 分别包含第一和第二光谱辐射成分。设备 100 还包括检测器装置 170，其适于接收基于第一照明光 131 与细胞材料 115 的第一相互作用的第一测量光 151 以及基于第二照明光 152 与细胞材料 115 的第二相互作用的第二测量光 152。此外，设备 100 包括评估单元 180，其耦合到检测器装置 170 并且其适于评估分别指示第一 151 和第二测量光 151 的第一信号 171a 和第二信号 171b。设备 100 可以用

于实现与 NAD(P)H 的自发荧光测量相结合的紫外 DNA 图像细胞计量术。

附图标记列表:

- 100 细胞分析设备
- 110 承载元件、物体支持器
- 115 细胞材料
- 120 光源装置
- 121 宽光谱紫外光源
- 131 第一照明光
- 132 第二照明光
- 135 公共入射光束路径
- 140 光学装置
- 141 场透镜
- 142 场光阑
- 145 通带滤波器 (260nm 和 340nm)
- 146 聚光透镜
- 147 聚光器光阑
- 151 第一测量光、透射光
- 152 第二测量光、荧光
- 155 公共出射光束路径
- 160 光学装置
- 161 物镜
- 164 二向色镜 (对于 260nm 是反射的, 对于 445nm 是透明的)
- 165a 通带滤波器 (260nm)
- 165b 通带滤波器 (445nm)
- 170 检测器装置
- 171 第一检测器、第一相机
- 171a 第一信号
- 172 第二检测器、第二相机
- 172a 第二信号
- 180 评估单元

- 200 细胞分析设备
- 210 承载元件、物体支持器
- 215 细胞材料
- 220 光源装置
- 221 宽光谱紫外光源
- 231 第一照明光
- 232 第二照明光
- 235 公共入射光束路径
- 240 光学装置
- 241 场透镜
- 242 场光阑
- 245 第一斩波轮
- 245a 通带滤波器 (260nm)
- 245b 通带滤波器 (340nm)
- 246 聚光透镜
- 247 聚光器光阑
- 251 第一测量光、透射光
- 252 第二测量光、荧光
- 255 公共出射光束路径
- 260 光学装置
- 261 物镜
- 265 第二斩波轮
- 265a 通带滤波器 (260nm)
- 265b 通带滤波器 (445nm)
- 270 检测器装置、公共检测器、公共相机
- 271a 第一信号
- 272a 第二信号
- 280 评估单元
- 300 细胞分析设备
- 310 承载元件、物体支持器
- 315 细胞材料
- 320 光源装置

- 321 第一光源、深紫外光源；汞灯
- 322 第二光源、340nm LED
- 331 第一照明光
- 332 第二照明光
- 334 二向色镜（对于 253nm 是透明的，对于 340nm 是反射的）
- 335 公共入射光束路径
- 340 光学装置
- 341 场透镜
- 342 场光阑
- 345 第一斩波轮
- 345a 通带滤波器（260nm）
- 345b 通带滤波器（340nm）
- 346 聚光透镜
- 347 聚光器光阑
- 351 第一测量光、透射光
- 352 第二测量光、荧光
- 355 公共出射光束路径
- 360 光学装置
- 361 物镜
- 365 第二斩波轮
- 365a 通带滤波器（260nm）
- 365b 通带滤波器（445nm）
- 370 检测器装置、公共检测器、公共相机
- 371a 第一信号
- 372a 第二信号
- 380 评估单元
- 400 细胞分析设备
- 410 承载元件、物体支持器
- 415 细胞材料
- 420 光源装置
- 421 第一光源、深紫外光源；汞灯
- 422 第二光源、340nm LED

- 431 第一照明光
- 432 第二照明光
- 434 二向色镜 (对于 260nm 是反射的, 对于 340nm 是透明的)
- 435 公共入射光束路径
- 440 光学装置
- 441 场透镜
- 442 场光阑
- 446 聚光透镜
- 447 聚光器光阑
- 451 第一测量光、透射光
- 452 第二测量光、荧光
- 455 公共出射光束路径
- 460 光学装置
- 461 物镜
- 464 二向色镜 (对于 260nm 是反射的, 对于 445nm 是透明的)
- 465a 通带滤波器 (260nm)
- 465b 通带滤波器 (445nm)
- 470 检测器装置
- 471 第一检测器、第一相机
- 471a 第一信号
- 472 第二检测器、第二相机
- 472a 第二信号
- 480 评估单元
- 490 光调制设备、斩波器设备

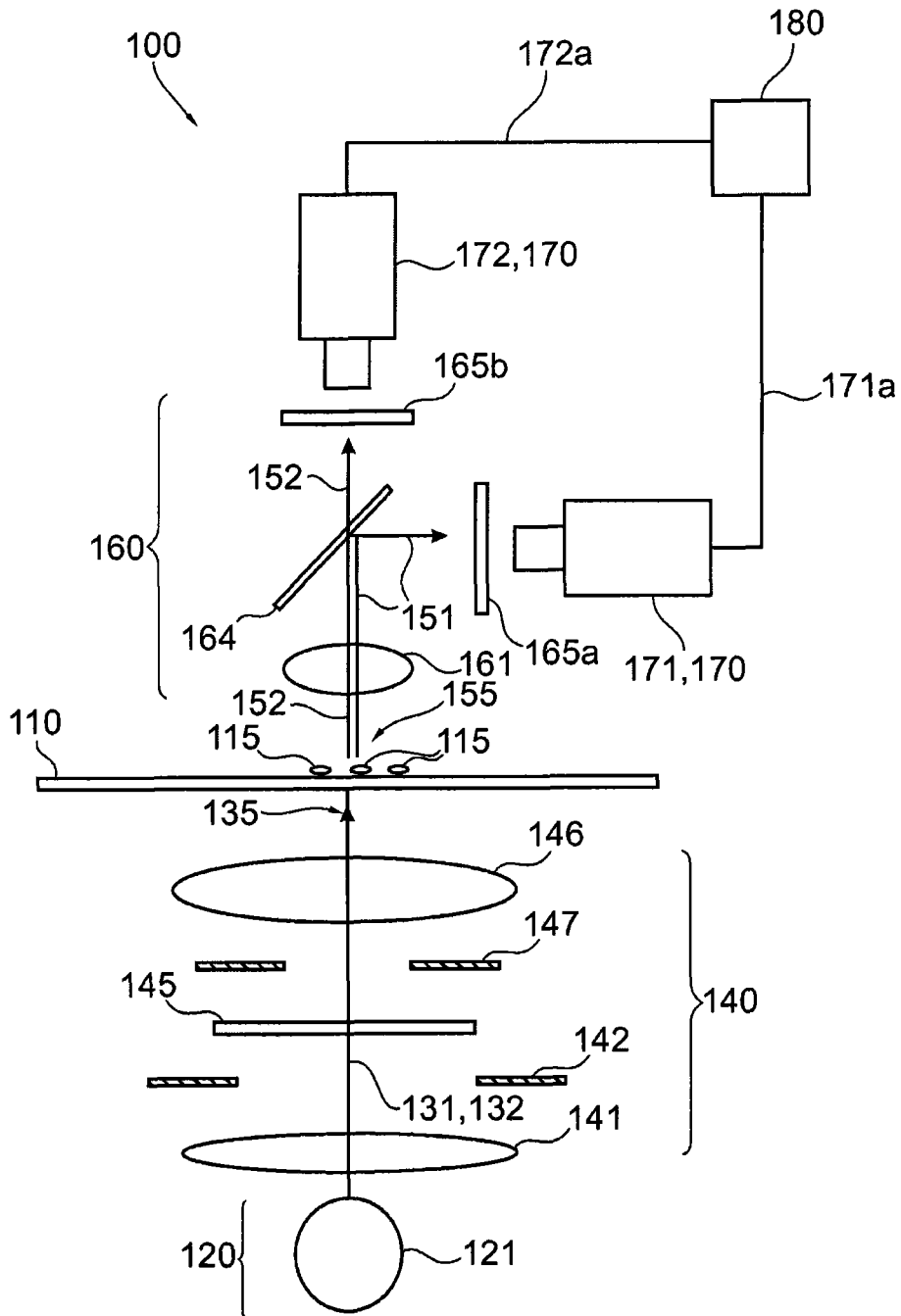


图 1

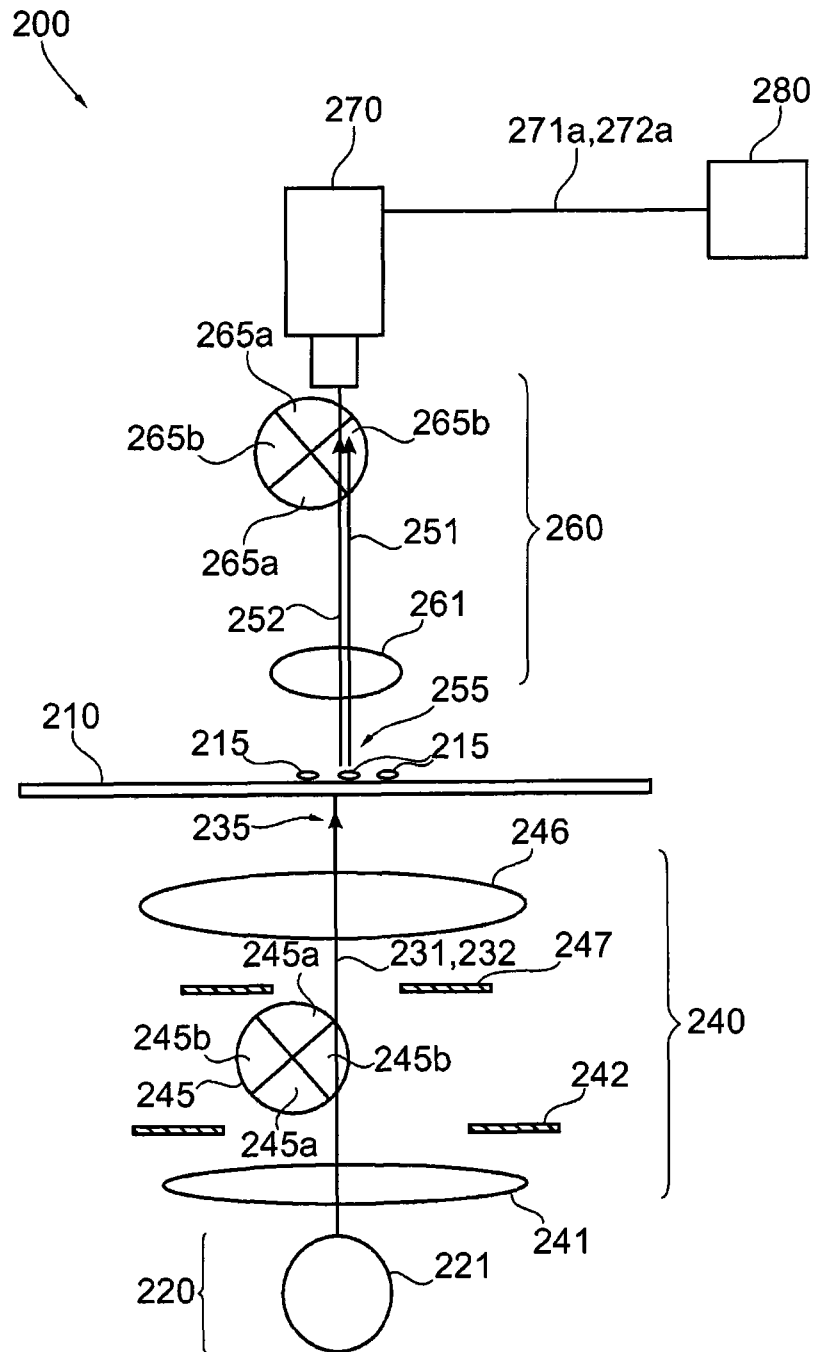


图 2

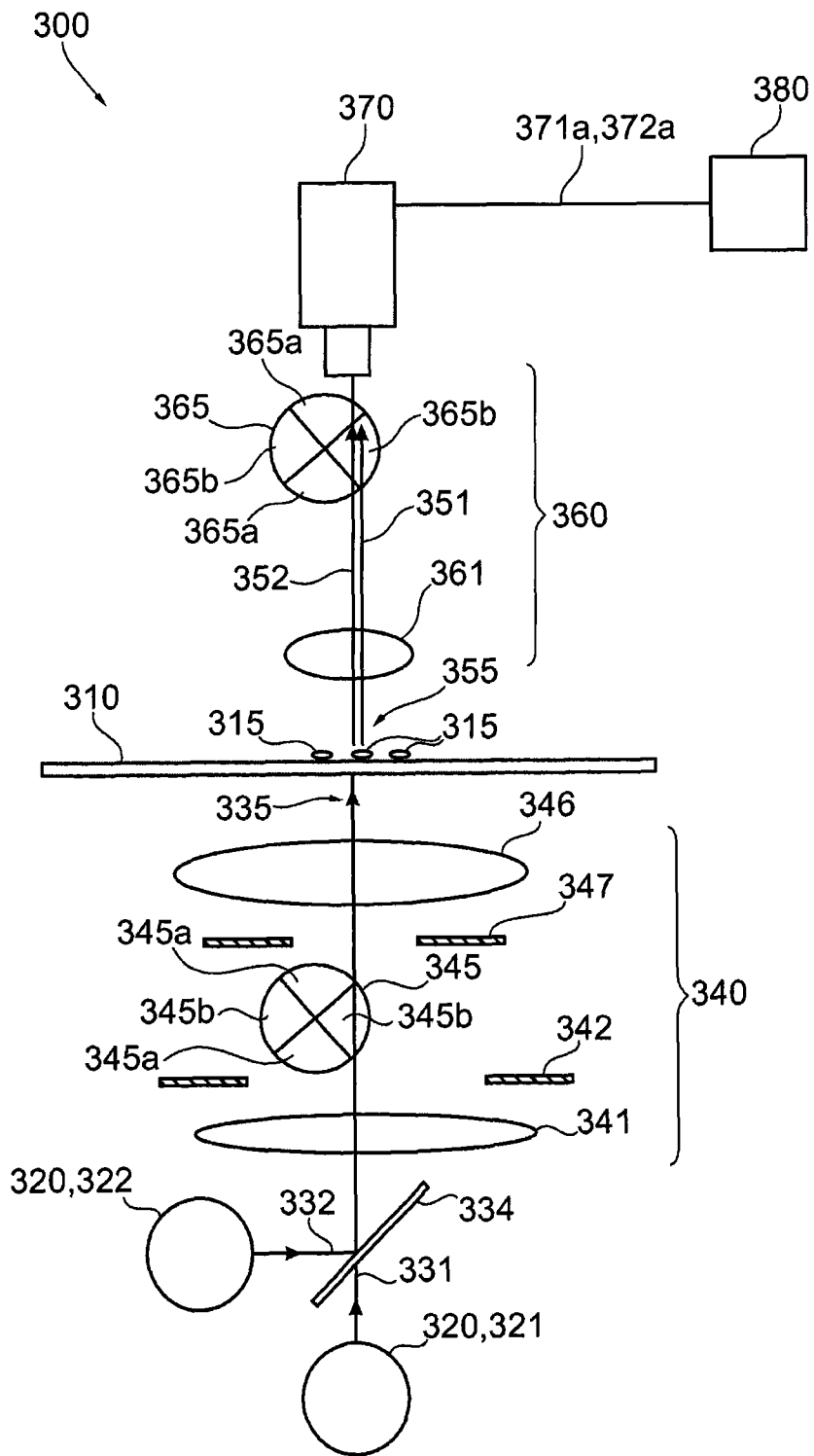


图 3

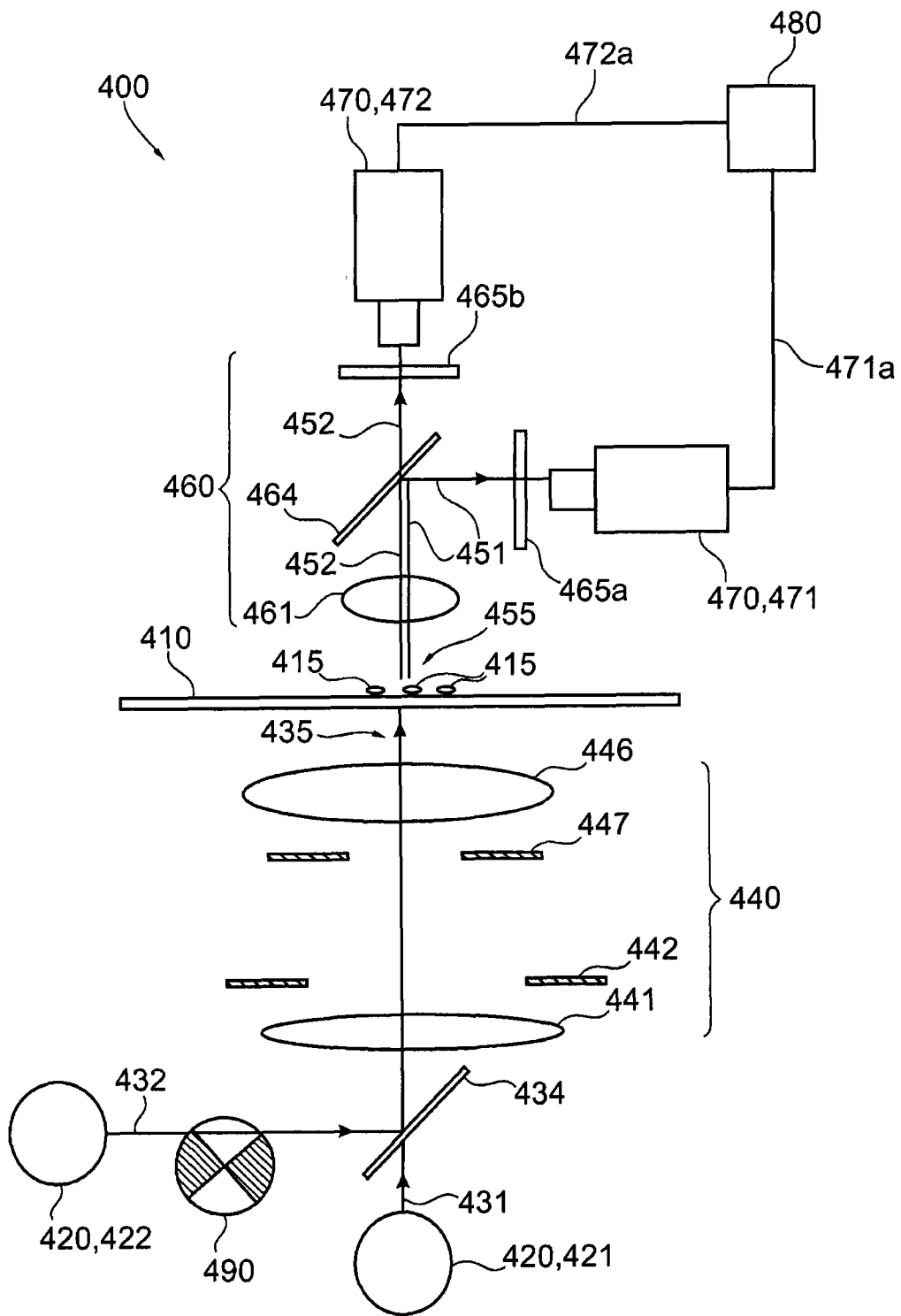


图 4