

文章编号:1000-582X(2008)05-0581-06

# Epithalon 对人胎肝细胞端粒酶活性和端粒长度的影响

高文娟, 王远亮, 童师亮

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030)

**摘要:**以松果体分泌物,“Epithalamin”缩氨酸为基础,人工合成多肽“Epithalon”。通过用细胞形态学观察用药后细胞的生长情况,MTT 法检测 Epithalon 多肽对人肝细胞株 L-02 增殖与活力的影响,以及运用端粒酶重复序列扩增——焦磷酸根酶联发光技术检测人肝细胞株 L-02 端粒酶活性,流式荧光原位杂交法检测端粒长度。研究了多肽作用于人肝细胞 L-02 后对细胞的生长情况、细胞端粒长度以及细胞端粒酶活性所产生的影响。研究显示 Epithalon 多肽具有提高端粒酶活性,延缓端粒缩短的作用。

**关键词:**Epithalon; 端粒; 端粒酶

**中图分类号:**Q576

**文献标志码:**A

## Effect of Epithalon on cellular telomere and telomerase

GAO Wen-juan, WANG Yuan-liang, TONG Shi-liang

(Bioengineering of Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

**Abstract:** The synthetic polypeptide Epithalon was synthesized based on an acid compound of Epithalamin which is the secretion of conarium. Cellular morphology observation and the Thiazolyl blue (MTT) method were used to investigate the effects of Epithalon polypeptide on the growth and multiplication of L-20 cells. An enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay (TRAP-ELIDA) was used to measure the telomerase activity of L-02 cells. Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization (FLOW-FISH) was used to measure the telomere length. The research shows that the Epithalon polypeptide can activate cellular telomerase and slow down the shortening of the telomere length.

**Key words:** Epithalon; telomere; telomerase

动物染色体末端,有一种被称为“端粒”的保护性结构。端粒由 2~20 kb 串联的重复序列片段 (TTAGGG)<sub>n</sub> 和一些结合蛋白组成。端粒的功能除保证 DNA 完整复制外,还在维持染色体结构稳定(保护染色体不分解和染色体重排及末端不相互融合等),染色体在细胞中的定位(使之不随机分布)和引

起细胞衰老等方面起着重要作用<sup>[1-4]</sup>。Stewart<sup>[5]</sup>等认为端粒酶的作用主要在于延长了端粒悬垂的长度。由于人体细胞中的端粒酶未被活化,从而导致了端粒 DNA 缩短<sup>[6]</sup>。因此,只有那些重新获得端粒酶活性的细胞才能继续生存下去,对于那些无法激活端粒酶的细胞将只能面临趋向衰老的结果。

收稿日期:2008-01-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO. 30470474)

作者简介:高文娟(1977-),女,重庆大学博士研究生,主要从事生物材料、细胞生物学及组织工程学方向研究。

王远亮(联系人),男,重庆大学教授,(Tel)13098757805;(E-mail)wyl@cqu.edu.cn.

欢迎访问重庆大学期刊网 <http://jks.cqu.edu.cn>

动物的一种内分泌腺—松果体,能分泌一种名为“Epithalamin”的缩氨酸,这种成分可被人工合成名叫“Epithalon”的多肽。人们不断的研究揭示出 Epithalon 多肽具有许多生物活性及调节功能。其中,俄罗斯研究人员运用胎儿肺细胞试验发现在正常对照组细胞老化停止分裂的情况下,Epithalon 多肽作用后的细胞依然具有较强的增殖能力。Epithalon 多肽能使小鼠寿命延长<sup>[7]</sup>。目前,Epithalon 多肽越来越受到国外研究人员的关注,对其抗肿瘤、抗氧化、抗衰老作用进行不断地了解。目前国内还没有关于 Epithalon 多肽的研究报告。

研究将初步探讨 Epithalon 多肽在细胞中的初步作用机制,观察其作用过程中对细胞的毒性情况,对细胞的生长状态影响情况。讨论 Epithalon 多肽对细胞端粒的延长,端粒酶的激活是否更安全、有效。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人肝细胞株 L-02 购于武汉大学中国典型培养物培养保藏中心;Epithalon 由上海生工提供,纯度为 98%;RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 $(C_3TA_2)_3$  端粒 DNA 序列特异性肽核酸(PNA)探针[FITC- $(C_3TA_2)_3$  PNA probe]购于大连 TaKaRa 生物技术公司。

### 1.2 细胞形态学观察

将细胞分组,加药培养 72 h 后,于倒置显微镜下观察并拍照。然后吸出孔内液体,用 PBS 洗两遍,5 mg/L AO 染色 20 min 后,在荧光显微镜下,用荧光激发,并拍照。

### 1.3 MTT 法检测细胞生长状态

取生长状态良好的 L-02 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化制成细胞悬液,计数调整细胞的密度为 3 000~10 000 个/mL,取该细胞悬液 20  $\mu$ L 接种于 96 孔细胞培养板中,补充 180  $\mu$ L 培养基,常规培养 24 h 后,弃旧的培养基,加入新鲜的培养基,每种细胞分组如下:1)正常对照组,加入完全培养基;2)补充 Epithalon 组,每组加入 Epithalon,使其终浓度分别为 0.00256  $\mu$ mol/L、0.0128  $\mu$ mol/L、0.0256  $\mu$ mol/L、0.256  $\mu$ mol/L、0.128  $\mu$ mol/L、1.28  $\mu$ mol/L,每组均为 6 孔。加药后分别培养 24、48 和 72 h。测定前 4 h 每孔加入 20  $\mu$  LMTT,继续培养 4 h,小心吸出孔内的液体,每孔加入二甲基亚砜 50  $\mu$ L 后,放在低速摇床上溶解 MTT 的还原产物 10 min,在酶标仪

上于 490 nm 波长测定各孔的吸光度值,由此检测细胞的生长状态。

### 1.4 细胞培养

人肝细胞株 L-02 常规培养于含 10% 新生小牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素和 0.25 U/mL 胰岛素的 RPMI 1640 完全培养基中。培养条件为 37  $^{\circ}$ C 和 5%  $CO_2$ 。将上述细胞随机分为 4 组:1)正常对照组,未经药物作用的对照组(即相应溶剂处理组)以下图中简称 B;2)培养基中补充终浓度为 0.002 56  $\mu$ mol/L 的 Epithalon;3)培养基中补充终浓度为 0.012 8  $\mu$ mol/L 的 Epithalon;4)培养基中补充终浓度为 0.025 6  $\mu$ mol/L 的 Epithalon。培养一个月收集细胞。

### 1.5 TRAP-ELIDA 法检测端粒酶活性

TRAP-ELIDA 法测定基本原理,TRAP 反应产物有两种:1)端粒重复序列 PCR 扩增产生的双链 DNA;2)端粒酶延长反应及 PCR 扩增的副产物焦磷酸根( $PP_i$ )。因为  $PP_i$  在端粒酶延长反应中释放的数量大大小于 PCR 扩增中的数量,所以它可以忽略不计。在 PCR 扩增中,随着一个核苷掺入 DNA,一个  $PP_i$  被释放。PCR 扩增中释放的  $PP_i$  数量和 TRAP 产生的 DNA 数量成比例。因此可通过测定 TRAP 反应中  $PP_i$  的数量来测定端粒酶活性。

TRAP-ELIDA 测定步骤:1)将正常对照组及补充 Epithalon 一个月的生长状况良好的细胞用 0.25% 胰酶消化后,用冰冷的 0.9% NaCl 生理盐水洗 2 次。再加入定量体积的生理盐水配成细胞悬液,台盼兰染色法计数细胞,活细胞占总细胞的比例大于 98%;2)向其中加入 200  $\mu$ L CHAPS 裂解液,冰上反应 30 min,离心取上清液,测定总蛋白质含量,调节蛋白质浓度为 2 g/L;3)取所得上清液 1.0  $\mu$ L,加入 TRAP 缓冲液、dNTP 和 TS 引物(5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'),使终体积为 25  $\mu$ L。将混合物于 30  $^{\circ}$ C 反应 30 min,然后于 90  $^{\circ}$ C 加热 3 min;4)加入 CX 引物(5'-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TTA-3')和 Taq DNA 聚合酶,在 PCR 仪上于 94  $^{\circ}$ C、30 s,55  $^{\circ}$ C、40 s,72  $^{\circ}$ C、1 min,循环 33 次,最后于 72  $^{\circ}$ C 再延伸 2 min;5)然后向混合物中加入 2  $\mu$ g ADA,于 37  $^{\circ}$ C 培养 30 min,再将其于 90  $^{\circ}$ C 加热 4 min,使其 ADA 失活;6)反应产物稀释 5 倍,取 2  $\mu$ L 加入到 95  $\mu$ L ELIDA 混合物中。在室温下于 BPCL 微弱发光仪上记录前 6 s 的发光点数。ELIDA 混合物含有 0.1 mol/L Tris-乙酸盐、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L 乙酸钠、0.1% BSA、

1 mmol/L 二硫代苏糖醇、0.4 mg/mL PVP、5 mg/L 荧光素、5  $\mu\text{mol/L}$  腺苷-5'-磷硫酸盐、66U/L ATP-硫酸化酶和 4 mg/L 荧光素酶。混合物中  $\text{PP}_i$  的摩尔数等于用荧光素酶系统检出的 ATP 量。设 1  $\mu\text{g}$  端粒重复序列等于 3.24 nmol 核苷,则 ELIDA 混合物中 1 pmol 的  $\text{PP}_i$  来源于 310 pg 端粒重复序列的延长。

### 1.6 流式荧光原位杂交法(Flow-FISH)检测端粒长度的变化

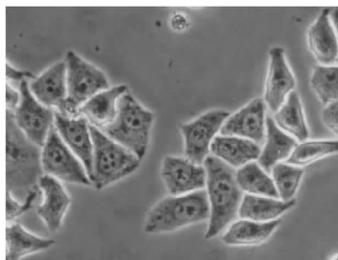
取 Epithalon 预处理后生长状态良好的  $5 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液,置于 1.5 mL EP 管中,离心去培养基,将细胞重新悬浮于 100  $\mu\text{L}$  杂交液中<sup>[8]</sup>、加入 FITC-( $\text{C}_3\text{TA}_2$ )<sub>3</sub>PNA 探针。阴性对照组以相同体积的三蒸水代替 FITC-( $\text{C}_3\text{TA}_2$ )<sub>3</sub>PNA 探针。将样品变性后暗处室温杂交 2 h。之后,细胞用洗液 1 洗 2 次,洗液 2 洗一次。洗液 1 含 70% 去离子甲酰胺、10mmol/L Tris-HCl、0.1% BSA 和 Tween-20。洗液 2 为含 0.1% BSA 和 Tween-20 的 PBS。将细胞重悬于 300  $\mu\text{L}$  含碘化丙锭(PI)的磷酸缓冲液中,于 4  $^\circ\text{C}$  下放置过夜,于流式细胞仪上,由 FL-2 通道测定 PI 荧光强度,FL-1 通道测定端粒 FITC 线形范围内的荧光强度。为进行数据分析,细胞控制为单一二倍体细胞。端粒平均荧光强度表示与 FITC-( $\text{C}_3\text{TA}_2$ )<sub>3</sub>PNA 探针杂交细胞的平均荧光强度减去无探针杂交细胞的平均荧光强度。端粒长度与端粒平均荧光强度成正比<sup>[9-11]</sup>,所以用端粒平均荧光强度检测端粒长度变化。

## 2 结果

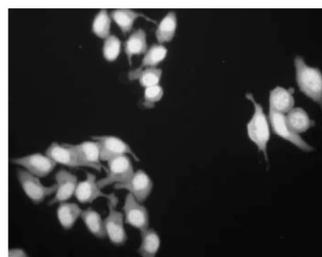
### 2.1 细胞形态观察

光镜下直接观察 L-02 细胞形态变化:

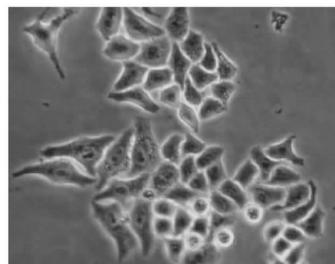
1) 未经药物作用的对照组。L-02 细胞生长良好,细胞饱满完整,细胞间界限清楚,胞浆丰富,可见明显核仁,荧光显微镜照片可见,胞膜光滑,荧光均匀(如图 1 (a<sub>1</sub>)、(a<sub>2</sub>))。



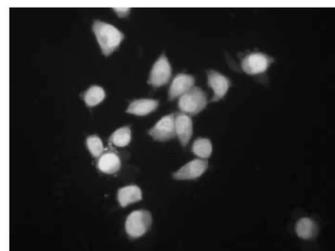
(a<sub>1</sub>) 对照组



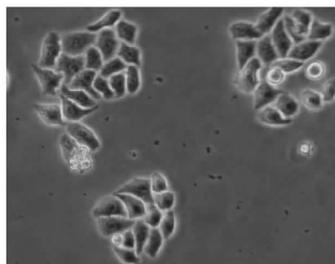
(a<sub>2</sub>) 对照组



(b<sub>1</sub>) 25.6  $\mu\text{mol/L}$



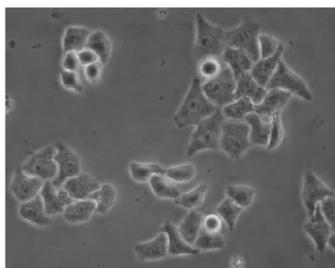
(b<sub>2</sub>) 25.6  $\mu\text{mol/L}$



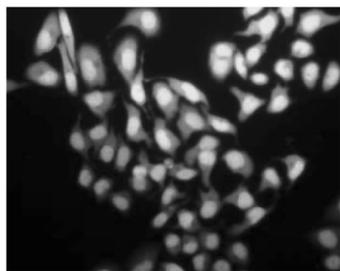
(c<sub>1</sub>) 1.28  $\mu\text{mol/L}$



(c<sub>2</sub>) 1.28  $\mu\text{mol/L}$



(d<sub>1</sub>) 0.025  $\mu\text{mol/L}$

(d<sub>2</sub>)0.025 μmol/L

(a<sub>1</sub>~d<sub>1</sub>)显微镜下观察并拍照的结果;

(a<sub>2</sub>~d<sub>2</sub>)为荧光染色处理细胞后观察拍照结果。

图1 Epithalon 多肽对 L-20 细胞形态的影响

2) Epithalon 多肽作用组: 不同浓度 Epithalon 处理 L-02 细胞 24~72 h, 双目倒置显微镜下观察, 与其相应的对照组细胞相比形态无明显差异, 细胞饱满完整。由荧光显微镜照片可知, 各浓度细胞均外形饱满、荧光发光均匀。从细胞形态的观察认为 Epithalon 多肽对细胞的毒性小, 具较安全的特点。

## 2.2 MTT 法检测结果

加入多肽 24 h 后检测显示不同浓度的 Epithalon 多肽作用的细胞与对照组细胞的生长情况变化不明显; 48 h、72 h MTT 检测显示加入 Epithalon 多肽的细胞生长情况显示(见图 2)。0.002 56~0.256 μmol/L 区间, 细胞生长情况良好。根据 MTT 检测结果及细胞形态观察的结果, 选择 0.002 56 μmol/L、0.012 8 μmol/L 及 0.025 6 μmol/L 3 种浓度 Epithalon 对细胞进行长期用药。

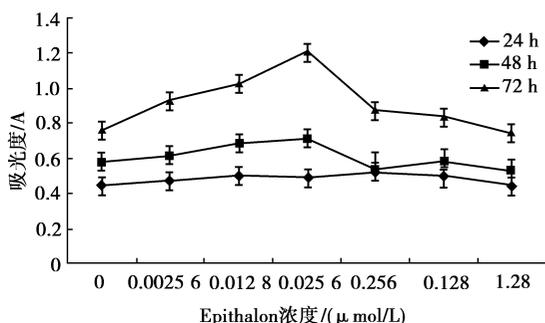


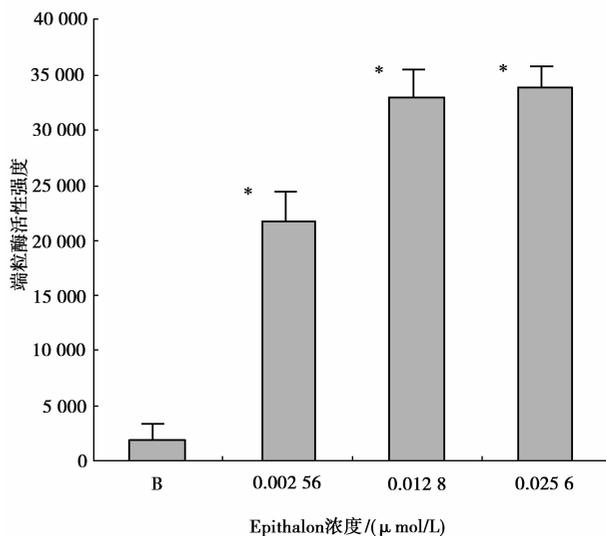
图2 Epithalon 多肽对 L-20 细胞生长的影响

## 2.3 端粒酶的活性

在 ATP-硫酸化酶的催化下 PP<sub>i</sub> 能和端粒酶底物腺苷-5-磷酸反应, 生成 ATP。在荧光素酶催化下 ATP 与荧光素发出微弱光, 利用微弱发光仪检测并记录开始 6sec 内发光的点数。

在不同浓度下培养出的 L-02 细胞的端粒酶活性变化情况如图 3 所示。对照组人肝细胞 L-02 的端粒活性非常弱, 而 Epithalon 多肽不同浓度用药组

的 L-02 细胞的端粒酶活性明显增强, 图 3 显示, Epithalon 浓度为 0.012 8 μmol/L 与浓度为 0.025 6 μmol/L 端粒酶活性差别不大。端粒酶活性与多肽间存在一定的剂量-一效应关系。



\* 表明与对照组相比  $p < 0.01$

图3 TRAP-ELISA 法检测 Epithalon 对 L-02 细胞端粒酶的活性的影响(B 为正常对照组)

## 2.4 端粒长度检测结果

Epithalon 促进 L-02 细胞端粒的延长 FLOW-FISH 的测定原理主要根据端粒由高度重复序列 TTAGGG 组成, 其长度越长, 所含重复碱基数目越多, 结合的 FITC-(CCCTAA)<sub>3</sub> 探针就越多, 其荧光也就越强; 此外, 荧光强度还与每个细胞的染色体数目有关, 染色体越多, 端粒就越多, 荧光就越强。因此, FLOW-FISH 的荧光强度直接反映了端粒长度的变化。端粒平均荧光为与 FITC-(C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub> PNA 探针杂交的细胞的平均荧光减去阴性对照组细胞(即不含探针杂交液作用的细胞)的平均荧光的差值。在 FSC/FL2 散点(PI 荧光与前散射光的直方图 4)图中, 被圈起来的 R1 部分为二倍体细胞, 在测定该区细胞端粒特异性 FITC 荧光。

由图 5 可知, 加 Epithalon 多肽的细胞荧光强度与对照组细胞相比有明显提高, 即施用 Epithalon 多肽的细胞组的端粒长度明显比对照组的细胞端粒长, 且在一定范围内有浓度依赖性。

但在浓度 0.012 8 μmol/L 和 0.025 6 μmol/L 之间端粒的延长长度差异不大。提示在这两浓度间的细胞端粒的长度与 Epithalon 多肽的浓度依赖性不大, 总体来说, 此结果表明 Epithalon 多肽增加端粒长度。

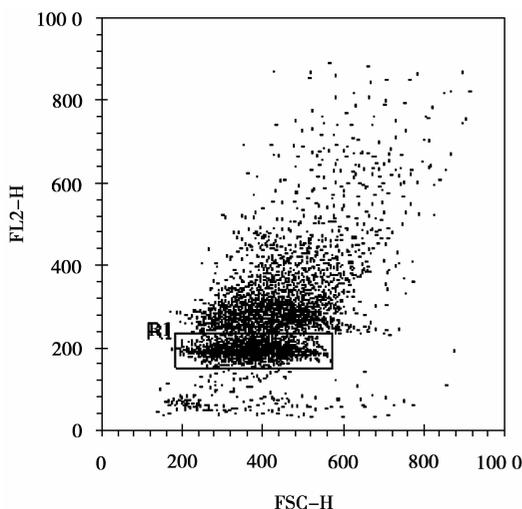
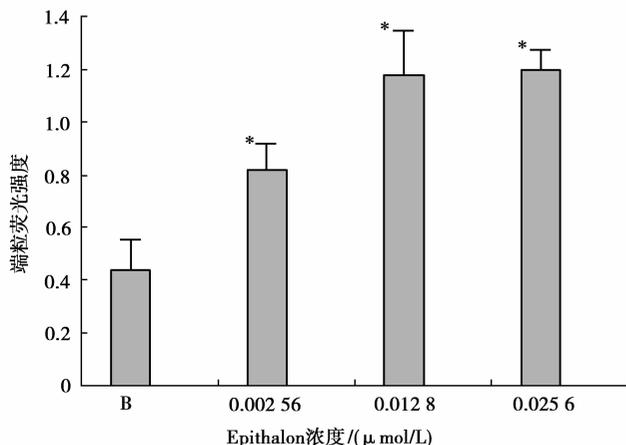


图 4 PI 荧光与前散射光的直方图

\* 表明与对照组相比  $p < 0.01$ 图 5 Epithalon 对 L-02 端粒荧光强度的影响  
(B 为正常对照组)

### 3 讨论

众所周知,真核 DNA 是线性 DNA,复制时由于模板 DNA 起始端为 RNA 引物先占据,新生链随之延伸;引物 RNA 脱落后,其空缺处的模板 DNA 无法再度复制成双链。因此,每复制一次,末端 DNA 就缩短若干个端粒重复序列,即出现真核细胞分裂中的“末端复制问题”。当端粒缩短到一定程度时即引起细胞衰老,故端粒又称“细胞分裂计时器”。虽然端粒序列不含功能基因,但是如果没有这些类似染色体的“帽子”(cap)结构的端粒,染色体之间就会出现端一端融合(end-to-end fusion)、降解(degradation)、重排(rearrangement)和染色体丢失(chromosome loss)等变化,这些变化威胁着染色体

的正确复制和细胞的存在,因此,端粒是至关重要的。而端粒酶可以防止端粒的缩短,它是端粒复制所必须的一种特殊的 DNA 聚合酶,具有逆转录酶活性,能以 hTR(human Telomerase RNA)为模板,向染色体末端添加 TTAGGG 序列。因此,端粒长度和端粒酶活性与细胞的衰老紧密相关。

曾有报道 Epithalon 多肽能增强某些基因转录,其中可能就有端粒酶基因,从而特异的激发相应蛋白质合成。目前,在细胞试验中俄专家发现此施用多肽后细胞传代次数较对照组明显增加,Anisimov 等研究者也发现 Epithalon 多肽能使小鼠寿命延长 34.2% ( $p < 0.05$ )。但对此肽具体作用机制还未进一步研究。本研究在上述结论基础上以端粒酶活性不明显的 L-02 细胞进行此肽作用机制的初步研究。有关衰老和端粒酶的研究表明:端粒酶阴性的细胞的增殖引起端粒缩短,并最终导致细胞死亡。人体内有一些细胞属永生性细胞,如造血干细胞、生殖细胞等,这些细胞不分裂或处于静止期时,细胞呈端粒酶阴性;当进行细胞增殖时,细胞呈端粒酶阳性。研究表明:通过 MTT 的结果选用 3 个浓度对细胞进行培养,然后进行端粒酶检测,显示用药的细胞端粒酶活性比对照组细胞明显提高。肝细胞 L-02 在常规培养下呈低端粒酶活性,而在 Epithalon 处理后,端粒酶活性明显增高,表明 Epithalon 多肽能有效的促进端粒酶的合成。流式荧光原位杂交法检测实验细胞端粒,结果表明端粒得到增加,可推测 Epithalon 多肽可能通过激活端粒酶,间接达到增加端粒长度的目的。因此,Epithalon 可能有延长细胞寿命功能,进而可能有延缓衰老的作用。但对由端粒非正常缩短所带来的一些疾病,如端粒异常缩短导致的早衰等,是否可以利用此肽促进端粒酶活性,缓解端粒的缩短进而减缓衰老进程。此多肽是否还有其他作用机制,这还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] NORRBACK K F, ROOS G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells [J]. Eur J Cancer, 1997, 33 (5): 774-80.
- [2] LANGE T. Telomeres and senescence: ending the debate [J]. Science, 1998, 279(5349):334-335.
- [3] NUGENT C I, LUNDBLAD V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation [J]. Genes & Development, 1998, 12(8):1073-1085.
- [4] BLACKBURN E H. Telomerase [J]. Ann Rev Biochem, 1992, 61:113-129.
- [5] STEWART S A. Erosion of the telomeric single-strand

- overhang at replicative senescence [J]. *Nature Genet.*, 2003, 10:1038-1127.
- [6] HIYAMA K, HIRAI Y K, YOIZUMI S, AKIYAMA M, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells [J]. *J Immunol*, 1995, 155(8):3711-3715.
- [7] 赵朝晖, 陈晓春, 朱元贵. 人参皂苷 Rg1 延缓细胞衰老过程中端粒长度和端粒酶活性的变化[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(1):61-65.  
ZHAO CHAO-HUI, CHEN XIAO-CHUN, ZHU YUNAN-GUI, et al. Roles of telomere and telomerase in the process of ginseno- side Rg1 protection against tert-butyl h · roperoxide-induced senescence in WI-38 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2005, 21(1):61-65.
- [8] ANISIMOV S V. Epithalon decelerates aging and suppresses development of breast adenocarcinomas in transgenic HER-2/neu mice [J]. *Bulletin Experimental Biological Medicine*, 2002, 134(2):187-190.
- [9] BATLIWALLA F M, DAMLE R N, METZ C, CHIORAZZI N, GREGERSEN P K. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: Analysis of human tonsillar B cells [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 247(1):103-109.
- [10] RUFER N, DRAGOWSKA W, THORNBURY G, ROOSNEK E, LANSDORP P M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry [J]. *NotBiotechnol*, 1998, 16(8):743-747.
- [11] BATIHWALLA F M, RUFER N, LANSDORP P M, GREGERSEN P I C. Oligoclonal expansions in CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> Tcell largely explain the shorter telomeres dated in this subset: analysis by flowFISH [J]. *Hum Immunol*, 2000, 61(10): 951-958.

(编辑 侯 湘)

(上接第 552 页)

## 参考文献:

- [1] 于起峰, 陆宏伟, 刘肖琳. 基于图像的精密测量与运动测量[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 刘桂雄, 申柏华, 冯云庆, 等. 基于改进的 Hough 变换图像分割方法[J]. *光学精密工程*, 2002, 6(3):257-260.  
LIU GUI-XIONG, SHEN BO-HUA, FENG YUN-QING, et al. Method of image segmentation based on improved hough transform [J]. *Optics Precision Engineering*, 2002, 6(3):257-260.
- [3] 张强劲, 杨丹, 张小洪, 等. 基于多尺度模糊逻辑的小波边缘检测方法[J]. *重庆大学学报*, 2005, 28(10):62-65.  
ZHANG QIANG-JIN, YANG DAN, ZHANG XIAO-HONG, et al. Wavelet edge detection method based on multi-scale fuzzy logic [J]. *Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)*, 2005, 28(10): 62-65.
- [4] 朱颖, 江泽涛. 基于 Sobel 算子的亚像素边缘检测方法[J]. *南昌航空工业学院学报(自然科学版)*, 2005, 19(2):100-102.  
ZHU YING, JIANG ZE-TAO. A Sub-pixel edge detection method based on Sobel operator [J]. *Journal of Nanchang Institute of Aeronautical Technology (Natural Science)*, 2005, 19(2):100-102.
- [5] LYVERS EDWARD P, MITCHELL OWEN ROBERT. Subpixel measurements using a moment-based edge operator [J]. *IEEE Transactionson Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1989, 11(12):1293-1307.
- [6] TABATABAI A J, MITCHELL O R. Edge location subpixel values in digital imagery [J]. *IEEE Trans on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1984, 6(2): 188-201.
- [7] 张永宏, 胡德金, 张凯, 等. 基于灰度矩的 CCD 图像亚像素边缘检测算法研究[J]. *光学技术*, 2004, 30(6): 693-695.  
ZHANG YONG-HONG, HU DE-JIN, ZHANG KAI. Gray moment operators for subpixel edge detection on CCD images [J]. *Optical Technique*, 2004, 30(6): 693-695.
- [8] 曲迎东, 崔成松, 陈善本, 等. 利用 Sobel-Zernike 矩算子的快速亚像素边缘检测方法[J]. *光电工程*, 2003, 30(5):59-61.  
QU YING-DONG, CUI CHENG-SONG, CHEN SHAN-BEN, et al. A fast subpixel edge measurement method based on sobel-zernike moment operator [J]. *Opto-electronic Engineering*, 2003, 30(5):59-61.
- [9] 李金泉, 王建伟, 陈善本, 等. 一种改进的 Zernike 正交矩亚像素边缘检测算法[J]. *光学技术*, 2003, 29(4): 500-503.  
LI JIN-QUAN, WANG JIAN-WEI, CHEN SHAN-BEN, et al. Improved algorithm of subpixel edge detection using Zernike orthogonal moments [J]. *Optical Technique*, 2003, 29(4):500-503.
- [10] LIU XIANG-DONG, ERICH R W. Subpixel edge location in binary images using dithering [J]. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1995, 17(6):629-634.

(编辑 侯 湘)