

• 基础实验研究 •

流式单平台和双平台计数定量检测外周血淋巴细胞亚群的实验研究

吴丽娟¹, 刘霞², 赵文利³

(成都军区总医院:1. 检验科;2. 体检中心;3. 儿科, 成都 610083)

摘要:目的 建立并标准化流式细胞术外周血淋巴细胞亚群绝对含量的测定方法,探讨单平台和双平台法检测的特点与适用性。方法 以三色流式细胞术,采用单平台和双平台法定量测定 194 例健康人外周血 T 细胞、B 细胞、NK 细胞亚群,并调查两种方法检测结果的精密性。结果 单平台法健康人外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞、T₄/T₈ 比值、DN-T 细胞、DP-T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的绝对含量依次为(1.69±1.10)、(1.10±0.74)、(0.73±0.60)、(1.51±0.62)、(0.15±0.10)、(0.02±0.03)、(0.36±0.32)和(0.37±0.41)×10⁹/L;双平台法结果依次为(1.87±0.70)、(1.07±0.41)、(0.74±0.31)、(1.45±0.38)、(0.15±0.07)、(0.02±0.01)、(0.36±0.16)和(0.36±0.16)×10⁹/L,两种方法检测结果之间差异无统计学意义(*t* 检验, *P*>0.05)。双平台法检测结果的变异系数在 4.5%~9.0%,均低于单平台法检测结果的变异系数值(*F* 检验, *P*<0.01)。结论 流式淋巴细胞亚群绝对计数的单平台法和双平台法均可用于临床检验,且单平台法检测结果的精密度更高,稳定性更好。

关键词:流式细胞术; 外周血淋巴细胞; 亚群; 定量测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0143-03

Experimental study on the quantitative assay of PBL subgroup by flow cytometric single-platform method and dual-platform method

Wu Lijuan¹, Liu Xia², Zhao Wenli³

(1. Department of Medical Laboratory; 2. Medical Examination Center; 3. Department of Pediatrics, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To establish and standardize the quantitative assay of peripheral blood lymphocytes (PBL) subgroup by flow cytometry, and investigate the characteristic and the applicability of single-platform method and dual-platform method. **Methods** 3-color flow cytometric single-platform method and dual-platform method were respectively used to detect quantity of each PBL subgroup from 194 healthy persons and compared in result precision. **Results** The levels of T cell, T₄ cell, T₈ cell, DN-T cell, DP-T cell, B cell and NK cell were (1.69±1.10), (1.10±0.74), (0.73±0.60), (1.51±0.62), (0.15±0.10), (0.02±0.03), (0.36±0.32) and (0.37±0.41)×10⁹/L respectively by single-platform method, but (1.87±0.70), (1.07±0.41), (0.74±0.31), (1.45±0.38), (0.15±0.07), (0.02±0.01), (0.36±0.16) and (0.36±0.16)×10⁹/L by dual-platform method. There was no difference between the results from above two methods by *t* test. The CV of dual-platform method was from 4.5% to 9.0%, and lower than single-platform method by *F* test. **Conclusion** The dual-platform method might be more precise and more stable than single-platform method, but both the two methods could be used as quantitative assay of PBL subgroup.

Key words: flow cytometry; peripheral blood lymphocyte; subgroup; quantitative assay

淋巴细胞是机体执行免疫防御的主要细胞,淋巴细胞亚群绝对含量的改变在很大程度上反映了机体的免疫功能状况,因此对淋巴细胞亚群绝对含量的测定在临床疾病的诊断、治疗方案选择、特定药物的使用剂量判断以及疗效检测中均有重要意义。近年来,流式细胞学检验技术(FCM)在临床得到越来越多的应用,在免疫功能监测领域,FCM可以使用多种不同荧光素标记的白细胞表面标记单抗对白细胞进行荧光染色标记,再利用流式细胞仪逐一区分每一个白细胞上的不同白细胞标记荧光阳性模式,即可对白细胞进行细致分类,简便、快捷地获得各种白细胞亚类的百分含量^[1-2]。为了达到对各种淋巴细胞亚群分别进行绝对含量测定的目的,作者将流式细胞仪和血细胞计数仪结合起来,设计了基于流式细胞仪和血细胞计数仪的双平台法淋巴细胞亚群绝对计数测定方法。同时,由于商售标准荧光微球的问世,也可以直接建立基于流式细胞仪的单平台法淋巴细胞亚群绝对计数检测方法^[3]。本研究旨在建立和标准化上述两种淋巴细胞亚群绝对含量的测定方法,并比较两者的优劣,供同行参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 来自 194 例健康体检者中被证实的健康个

体,男 96 例,女 98 例;年龄 19~62 岁,平均年龄为 37.4 岁。清晨采集静脉血 2 mL,EDTA-K₂ 抗凝(紫色真空采血管)。变异系数实验用血 13~14 mL 来自 1 名 22 岁的女性健康捐献者,仍然选择 EDTA-K₂ 抗凝,标本保持在室温 18~20 °C 环境。

1.2 仪器与试剂 美国 Beckman-Coulter 公司 XL4-MCL 流式细胞仪,Beckman-Coulter 血细胞计数仪。同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5,测定抗体 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5、CD3-FITC/CD19-PE 和 CD3-FITC/CD16/56-PE,Flow-Count 标准荧光微球、标本预处理试剂(包括溶液 A、溶液 B 和溶液 C)、鞘液等均为美国 Beckman-Coulter 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 单平台法 取试管 8 只,分别标记为 T 细胞同型对照管、B 细胞同型对照管、NK 细胞同型对照管、T 细胞测定管、B 细胞测定管和 NK 细胞测定管。分别向各同型对照管加入同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 各 10 μL,向 T 细胞测定管加入抗体 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 10 μL,向 B 细胞测定管加入抗体 CD3-FITC/CD19-PE 10 μL,向 NK 细胞测定管加入 CD3-FITC/CD16/56-PC5 10 μL。向上述同型对照管和测定管各加入血液样品 50 μL,Flow-Count 标准荧光微

球各 50 μL , 轻摇混匀, 室温避光放置 20 min。向各管分别加入溶液 A 625 μL , 振荡混匀 10 s; 加入溶液 B 265 μL , 振荡混匀 10 s; 加入溶液 C 100 μL , 振荡混匀 10 s。上机测定时以 SS/FS 散点图对 WBC 进行分群, 选择淋巴细胞群设门依次分析 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞在淋巴细胞中所占百分比。具体为: 先打开 T 细胞测定流式方案(见文献[4]), 将 T 细胞同型对照管插入主机样品槽, 调节各相关荧光通道的电压值, 使各荧光通道的阳性细胞率刚好为零, 再插入 T 细胞测定管, 测定并记录总 T 细胞($\text{CD}3^+$)、 T_4 细胞($\text{CD}3^+ \text{CD}4^+$)、 T_8 细胞($\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$)、双阴性 T 细胞($\text{CD}3^+ \text{CD}4^- \text{CD}8^-$, DN-T 细胞)、双阳性 T 细胞($\text{CD}3^+ \text{CD}4^+ \text{CD}8^+$, DP-T 细胞)的百分数和绝对含量; 再按照同样的方法依次打开 B 细胞和 NK 细胞的测定方案(见文献[4]), 同法依次测定并记录 B 细胞($\text{CD}3^- \text{CD}19^+$)和 NK 细胞($\text{CD}3^- \text{CD}16/56^+$)的百分数。

1.3.2 双平台法 白细胞总数测定: 利用全自动血细胞分析仪, 采用全血测定模式, 首先测定标本白细胞总数。流式测定: 同 1.3.1 的方法, 只是不加入 Flow-Count 标准荧光微球(检测方案见文献[4])。记录淋巴细胞占全部有核细胞的百分含量以及各淋巴细胞亚群的百分含量。淋巴细胞亚群绝对含量的计算: 以全自动血细胞计数仪测得的标本白细胞总数, 乘以流式细胞仪测定得到的淋巴细胞百分含量, 再分别乘以各淋巴细胞亚群的百分数, 即可得到各淋巴细胞亚群的绝对含量。

1.3.3 精密度调查实验 批内变异系数测定: 取健康捐献者静脉血分别用单平台法和双平台法在同一天的同一时间段内重复加样 20 次, 按照 1.3 的方法处理后, 上机测定各淋巴细胞亚群的绝对含量, 共测定 20 次。批间变异系数测定: 取健康捐献者静脉血, 连续 3 d, 每一天按照 8:00、10:00、12:00、14:00、16:00、18:00 和 20:00 各加样 1 次, 按照 1.4 的方法处理后上机测定各淋巴细胞亚群的绝对含量, 共测定 20 次(第 3 天取消 20:00 测定)。

1.4 统计学处理 应用 Excel 2003 软件进行统计学处理和分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的组间比较采用 t 检验, 两种检验方法的比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定结果 见表 1。将双平台法检测结果与单平台法检测结果进行比较, t 检验显示各项结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 但是各淋巴细胞亚群检测结果中, 单平台法检测结果的标准差均大于双平台法检测结果, 推测单平台法检测结果的离散度可能较双平台法大。

2.2 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定精密度实验的检测结果 见表 2。采用 t 检验, 将单平台法批内变异系数调查实验检测结果与双平台法检测结果进行比较, 各项目检测结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$); 将单平台法批间变异系数调查实验检测结果与双平台法检测结果进行比较, 各项目检测结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。但是各淋巴细胞亚群检测结果中, 单平台法检测结果的标准差均较双平台法结果偏高, 进一步提示单平台法检测结果的离散度可能较双平台法更大。

2.3 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定的变异系数调查结果 见表 3。从表 3 可见, 两种方法的批内变异系数数值均低于其各自的批间变异系数数值, 双平台法无论是其批内变异系数数值还是批间变异系数数值均低于单平台法的批内变异系数值和批间变异系数值, 且单平台法 8 项指标的 16 个变异系数值中就有 9 个(56.25%)超过了 20.00%, 双平台法中仅有 SP-T 细胞的 2 个变异系数值(12.50%)超过了 20.00%。方差分析提示, 单平台法和双平台法测批内变异系数和批间变异系数之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果表明, 双平台法较单平台法稳定性更好, 结果更加精密可靠。

表 1 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定结果($\times 10^9/\text{L}$)

方法	<i>n</i>	总 T 细胞	T_4 细胞	T_8 细胞	T_4/T_8	DN-T 细胞	DP-T 细胞	B 细胞	NK 细胞
单平台法	194	1.69 \pm 1.10	1.10 \pm 0.74	0.73 \pm 0.60	1.51 \pm 0.62	0.15 \pm 0.10	0.02 \pm 0.03	0.36 \pm 0.32	0.37 \pm 0.41
双平台法	194	1.87 \pm 0.70	1.07 \pm 0.41	0.74 \pm 0.31	1.45 \pm 0.38	0.15 \pm 0.07	0.02 \pm 0.01	0.36 \pm 0.16	0.36 \pm 0.16

表 2 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定精密度实验的检测结果($\times 10^9/\text{L}$)

方法		总 T 细胞	T_4 细胞	T_8 细胞	T_4/T_8	DN-T 细胞	DP-T 细胞	B 细胞	NK 细胞
单平台法	批内	2.76 \pm 0.29	1.60 \pm 0.19	1.00 \pm 0.16	1.63 \pm 0.28	0.11 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.33 \pm 0.07	0.37 \pm 0.07
	批间	2.75 \pm 0.38	1.60 \pm 0.33	1.05 \pm 0.24	1.55 \pm 0.25	0.10 \pm 0.06	0.01 \pm 0.01	0.34 \pm 0.10	0.37 \pm 0.11
双平台法	批内	2.74 \pm 0.12	1.64 \pm 0.09	1.05 \pm 0.08	1.58 \pm 0.12	0.10 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.33 \pm 0.03	0.39 \pm 0.35
	批间	2.68 \pm 0.14	1.60 \pm 0.14	1.03 \pm 0.12	1.58 \pm 0.20	0.09 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.32 \pm 0.04	0.37 \pm 0.04

表 3 两种方法流式细胞学淋巴细胞亚群绝对含量测定的变异系数调查结果(%)

方法	CV	<i>n</i>	总 T 细胞	T_4 细胞	T_8 细胞	T_4/T_8	DN-T 细胞	DP-T 细胞	B 细胞	NK 细胞
单平台法	批内	20	10.50	11.65	16.23	17.34	36.82	65.39	20.85	18.53
	批间	20	13.98	20.45	22.78	15.89	53.37	105.12	30.86	28.70
双平台法	批内	20	4.56	5.65	7.75	7.44	8.71	43.10	8.73	8.99
	批间	20	5.98	7.93	11.62	11.19	16.26	57.57	13.16	10.66

3 讨 论

流式淋巴细胞亚群测定过去主要是测定各种淋巴细胞亚群的百分含量, 如总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞、B 细胞和 NK 细胞等的百分含量; 通过患者外周血各淋巴细胞亚群百分含量

的消长, 即内部细胞所占比例的改变, 来帮助临床判断患者体内的免疫功能状态。这是一种非常单一、片面的方法, 常常不能解释临床实际情况, 甚至误导临床医师的判断等。每一种淋巴细胞亚群的改变, 可以是单纯百分含量的升高或降低, 但是

其绝对含量保持正常;也可以是百分含量正常,绝对含量升高或降低;还可以是百分含量与绝对含量同时升高或降低。因此,只有同时检测淋巴细胞亚群的百分含量和绝对含量才能全面、客观反映机体的免疫功能状态。为此,作者建议一个规范的流式淋巴细胞亚群检验报告,必须先同时报告淋巴细胞亚群的百分含量和绝对含量。

流式单平台绝对计数法是指技术上只依赖流式细胞仪一个分析平台而完成的细胞定量分析,流式双平台绝对计数则是指需要依赖流式细胞仪和血细胞计数仪两个分析平台才能完成的细胞定量分析。单平台法定量的原理在于向反应体系中加入已知浓度的标准荧光微球,单位时间内流式细胞仪计数的标准荧光微球与计数的待测细胞数量之间存在确定的比例关系,根据标准荧光微球的浓度即可计算出待测细胞的浓度^[3]。双平台法则利用血细胞计数仪在全血有核细胞计数(白细胞计数)上的成熟技术优势和成熟质量控制措施,首先测定全血标本中有核细胞(白细胞计数)的绝对含量,再利用流式细胞仪在细胞分群上的技术优势,获得待测细胞群在全部有核细胞中的百分比,计算待测细胞的绝对含量。由于流式细胞术目前还未实现全程自动化,还需要用手工方法加样试剂、血液标本并做上机前的红细胞裂解操作等,手工加样和处理环节多,误差较难掌控。双平台法在全血有核细胞绝对计数阶段实现了全程自动化,无手工操作环节,而流式检测阶段只需提供细胞的百分含量的这种“比例性”指标,加样量的多与少并不影响比例的测定,于是规避了单平台法的误差,结果反而更加稳定和精密。本文结果表明,双平台法和单平台法虽然在检测结果的统计学比较上并无差异,但是其检测数据的变异系数均较单平台法低,有力证实了双平台法优于单平台法的事实。但是,流式双平台法分析淋巴细胞亚群绝对含量的变异系数仍然较高,除 SP-T 细胞外,其余项目的变异系数在 4.5%~9.0%,说明流式分析的方法学还有很大改进空间,还达不到精细分析的要求(一般地,要求检验分析的变异系数在 5.0%以内,精细分析的变异系数在 2.0%以内)。同时,流式检验这种“高复杂性实验

(上接第 142 页)

高,同时患者外周血 NK 细胞绝对含量也明显增高,表明强直性脊柱炎患者存在不同程度的以 T 细胞、B 细胞数量增高为特点的特异性细胞免疫功能亢进和以 NK 细胞数量增高为特点的非特异性免疫功能增强。是 AS 患者淋巴细胞高表达 HLA-B27 引起体内免疫功能紊乱进而导致患者脊柱关节炎改变,还是体内免疫功能的先期异常引起淋巴细胞对 HLA-B27 表达的异常应答,进而导致患者脊柱关节炎改变,目前尚不能推断,也无合适的证据加以鉴别。此外,还发现临床腰痛患者存在与 AS 患者相似的免疫异常情况,B27⁺ 无症状者免疫功能也已经开始出现一定的免疫异常。遗憾的是 B27⁺ 非 AS 组各项测定值与 AS 组比较时差异无统计学意义,推测可能与观察病例数太少有关,还需要增加病例数以鉴别。

另外,流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群、B 细胞和 NK 细胞即可作为 AS 患者免疫功能检测的手段,也可用于病情判断和疗效监测。对不同临床分期的 AS 患者进行大规模外周血淋巴细胞亚群检测,动态分析患者淋巴细胞亚群的变迁规律,适时掌握患者体内的免疫功能状态,仍然是十分必要的。

参考文献

[1] Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylar-

测试类别”,对技术人员的技术水平和培训也提出了更高要求,只有推行严格的标准化操作才能缩小不同医院、不同检验员对检验结果带来的影响^[5]。

另外,单平台法需要购买标准荧光微球,该类试剂价格昂贵,单人份成本是血常规检验成本的数倍,经济上很不合算。临床上,医师在申请淋巴细胞亚群检测时往往都同时申请了血常规检验,本室统计发现,流式淋巴细胞亚群检测标本中没有同时申请血常规检验的标本仅占 20.0%~30.0%。从临床的角度出发,同时检测血常规和流式淋巴细胞亚群,医师既掌握了白细胞的总体情况,又了解了淋巴细胞亚类的变化,病情掌握会更准确。

总之,单平台和双平台流式淋巴细胞亚群绝对计数检测均可用于临床检验;对于综合性医院检验科,建议尽量采用双平台法;对于实验室或研究室,由于缺乏血常规分析平台的支持,可以采用单平台法。

参考文献

[1] Cherian S, Levin G, Lo WY, et al. Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(5): 319-328.
 [2] Lovvorn AE, Patnaik P, Walker CJ, et al. Variations in CD4 cell counts among HIV-uninfected and infected women in Uganda and Zimbabwe[J]. *Int J STD AIDS*, 2010, 21(5): 342-345.
 [3] Nantakomol D, Nuchnoi P, Noulstri E, et al. Enumeration of the absolute CD4 T-lymphocyte count by cell-bead assay[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 260-266.
 [4] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:81,86-87,121,126.
 [5] 吴丽娟,许东升. 流式细胞术表型分析的质量控制[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 389-394.

(收稿日期:2011-08-11)

thro pathiesin HLA B27 positive and negative-blood donors[J]. *Arthrits Rheum*, 1998, 41(1): 58-67.

[2] Santos FP, Bastos E, Ligeiro D, et al. Genetic basis of ankylosing spondylitis[J]. *Acta Reumatol Port*, 2007, 32(3): 243-252.
 [3] 刘进子,马春梅,董淑婷,等. 强脊壮督颗粒联合抗炎药治疗强直性脊柱炎 102 例临床观察[J]. *河北医药*, 2008, 30(12): 1997-1998.
 [4] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:491-493.
 [5] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:78-88.
 [6] Olivieri I, D'Angelo S, Cutro MS, et al. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis may give the typical postural abnormalities of advanced ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(11): 1709-1711.

(收稿日期:2011-12-08)