

• 基础实验研究 •

# 抗凝剂、标本保存温度和保存时间对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响

陈 潇, 吴丽娟<sup>△</sup>

(成都军区总医院检验科, 成都 610083)

**摘 要:**目的 调查抗凝剂、标本保存温度和保存时间对流式 T 淋巴细胞亚群检测结果的影响程度, 为流式 T 淋巴细胞亚群检测标准化提供科学依据。方法 采用三色流式细胞术 FSC/SSC 设门策略分析健康体检人群外周血 T 淋巴细胞亚群, 调查 EDTA-K<sub>2</sub> 和肝素锂两种抗凝剂以及标本保存温度与标本保存时间对检验结果的影响。结果 常温(18 ℃)保存的标本检测结果最为稳定, 极端低温和极端高温都将引起检测结果的降低。EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的标本 18 ℃可至少保存 3 d, 肝素锂抗凝的标本 18 ℃可保存 2 d。EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的标本检测结果较肝素锂抗凝的标本高。结论 流式 T 细胞亚群检测标本宜采用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝, 不能及时检测时宜 18 ℃保存, 冬季和夏季需要采取措施将标本的保存温度调节至常温为宜。

**关键词:**流式细胞术; T 血淋巴细胞; 抗凝剂; 储存温度; 储存时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0146-02

## Empirical study of the influence of decoagulant, storage temperature and time on the detection of peripheral blood T-lymphocyte subgroups by flow cytometry

Chen Xiao, Wu Lijuan<sup>△</sup>

(Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the influences of decoagulant, storage temperature and time on the detection of peripheral blood T-lymphocyte subgroups by flow cytometry for providing scientific data to standardize the detecting procedure. **Methods** The contents of peripheral blood T-lymphocyte subgroups were detected by a 3-color flow cytometry with FSC/SSC gating for lymphocytes from health-determination persons. The blood samples, anti-coagulated by EDTA-K<sub>2</sub> and heparin lithium respectively, were detected after being stored at different temperatures and different times. **Results** The results of samples, stored at common temperature (18 ℃) were more stable, and of samples, stored at too low or high temperature were decreased. The keeping time of samples, anti-coagulated by EDTA-K<sub>2</sub> and stored at 18 ℃, was three days, but by heparin lithium was only two days. The results of samples, anti-coagulated by EDTA-K<sub>2</sub>, were higher than samples, anti-coagulated by heparin lithium. **Conclusion** It could be more favorable for the treatment of samples for T-lymphocyte detection by flow cytometry to be anti-coagulated by EDTA-K<sub>2</sub> and stored at 18 ℃, if the detection could not be performed in time. During summer and winter, the storage temperature should be regulated to common temperature.

**Key words:** flow cytometry; T-lymphocyte; decoagulant; storage temperature; storage time

流式细胞术(FCM)作为检验医学领域又一个高新技术平台,已经在临床许多疾病的诊断、疗效监测与预后判断中得到很好的应用<sup>[1-3]</sup>。值得注意的是,FCM 技术难度大,影响因素多,来自不同检验室的相同流式检验项目的检验结果之间往往可比性不甚满意,这是 FCM 大规模临床应用首先需要克服的问题。本文以临床开展最为常见的 T 淋巴细胞亚群检测为研究对象,详细调查了常见抗凝剂、标本采集后的保存温度和保存时间对检验结果的影响,为流式 T 淋巴细胞亚群检测的标准化提供依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 全部标本来自 7 例健康捐献者,男 3 例,女 4 例;年龄 21~24 岁,平均年龄 23.2 岁。清晨采集健康捐献者静脉血 2 支,每支 3~4 mL,分别用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝(紫色采血管)和肝素抗凝(绿色采血管),立即送检验科检验。

**1.2 仪器与试剂** 采血管为美国 BD 公司产品。T 淋巴细胞亚群测定用同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5,测定抗体 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5、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。仪器为美国 Beckman-Coulter 公司 XL4-MCL 流式细胞仪。

**1.3 方法** 检验科接收到标本后,立即将 EDTA-K<sub>2</sub> 和肝素锂抗凝的 2 支血标本等分为 4 份,试管加盖后各取 1 支分别置于冰箱冷藏室 4 ℃[(误差±1)℃]、恒温箱 18 ℃[(误差±0.5)℃]、孵箱 30 min、38 ℃[(误差±0.5)℃]中,并于第 1 天(当天采血后 60 min 内)、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天上午 9:00 取出,按照文献[4]的方法进行 T 淋巴细胞亚群测定。流式上机检测时,以 SSC/FSC 分群对淋巴细胞群设门,记录总 T 细胞(CD3<sup>+</sup>)、T<sub>H</sub> 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、T<sub>S</sub> 细胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)、DN-T 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)和 DP-T 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)的百分含量。当天检测结果统计学处理后发现与第 1 天结果相比已经出现明显不同时,自动放弃之后的实验观察。

**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。组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的健康捐献者外周血 T 淋巴细胞亚群检**

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com.

测结果,见表 1。EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝时,4℃ 存放标本 2 d 内检测结果无明显改变( $P>0.05$ );18℃ 存放标本 3 d 内检测结果无明显改变( $P>0.05$ );30℃ 存放标本第 2 天检测结果已经出现明显下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );38℃ 存放标本第 2 天检测结果较第 1 天已经明显下降( $P<0.01$ )。提示随着标本保存时间延长,T 细胞亚群检测结果逐渐降低,且极端低温和极端高温保存检测结果下降幅度更快,以常温(18℃)保存的标本检测结果最为稳定。

2.2 肝素锂抗凝的健康捐献者外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果,见表 2。肝素锂抗凝时,4℃ 存放标本 2 d 内检测结果无

明显改变( $P>0.05$ );18℃ 存放标本 2 d 内检测结果无明显改变( $P>0.05$ );30℃ 存放标本第 2 天检测结果已经出现明显下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );38℃ 存放标本第 2 天检测结果较第 1 天已经明显下降( $P<0.01$ )。提示随着标本保存时间延长,T 细胞亚群检测结果逐渐降低,且极端高温保存检测结果下降幅度更快,以低温(4℃)和常温(18℃)保存的标本检测结果较为稳定,4℃ 保存的标本较 18℃ 保存的标本虽然检测结果之间差异无统计学意义,但数值上仍然较 18℃ 保存的标本低,提示标本常温保存更好。

表 1 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的健康捐献者外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果(%, $\bar{x}\pm s$ )

| 时间    | 温度(℃) | 总 T 细胞      | T <sub>4</sub> 细胞 | T <sub>8</sub> 细胞 | DN-T 细胞    | DP-T 细胞    |
|-------|-------|-------------|-------------------|-------------------|------------|------------|
| 第 1 天 | 18    | 72.02±6.00  | 37.33±4.58        | 25.94±5.12        | 6.53±3.87  | 0.66±0.40  |
| 第 2 天 | 4     | 64.56±5.87  | 33.46±6.13        | 23.06±4.90        | 4.01±5.27  | 0.34±0.42  |
|       | 18    | 72.62±5.98  | 35.16±5.22        | 26.04±5.01        | 6.61±4.03  | 0.58±0.39  |
|       | 30    | 61.31±6.00* | 30.11±4.05*       | 22.12±6.15        | 2.01±2.27# | 0.14±0.05# |
|       | 38    | 44.39±5.40# | 24.18±7.06#       | 17.90±5.67#       | 2.12±6.32# | 0.22±0.54# |
| 第 3 天 | 4     | 60.38±6.05* | 32.18±5.32        | 22.86±5.04        | 4.00±5.17  | 0.33±0.24* |
|       | 18    | 71.00±5.91  | 35.68±5.54        | 25.71±5.12        | 5.59±4.42  | 0.50±0.42  |
|       | 30    | 54.68±7.09# | 27.18±4.17*       | 19.12±6.15*       | 1.08±3.01# | 0.04±0.10# |
| 第 4 天 | 4     | 57.11±6.25* | 29.01±4.98*       | 22.18±7.31        | 3.01±7.01* | 0.21±0.45# |
|       | 18    | 59.15±7.78* | 30.67±7.02*       | 19.61±6.36*       | 2.57±6.01# | 0.14±0.15# |
| 第 5 天 | 4     | 53.11±6.25# | 28.01±4.98#       | 19.08±7.31#       | 2.21±6.24# | 0.24±0.34# |

\*: $P<0.05$ ;#: $P<0.01$ ,与第 1 天检测结果比较。

表 2 肝素锂抗凝的健康捐献者外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果(%, $\bar{x}\pm s$ )

| 时间    | 温度(℃) | 总 T 细胞      | T <sub>4</sub> 细胞 | T <sub>8</sub> 细胞 | DN-T 细胞    | DP-T 细胞    |
|-------|-------|-------------|-------------------|-------------------|------------|------------|
| 第 1 天 | 18    | 70.38±5.49  | 35.07±6.11        | 24.87±4.78        | 5.55±4.39  | 0.56±0.40  |
| 第 2 天 | 4     | 63.94±6.14  | 33.87±4.52        | 22.98±5.08        | 4.25±4.36  | 0.39±0.33  |
|       | 18    | 65.04±5.66  | 33.54±5.86        | 24.10±6.05        | 4.43±5.12  | 0.51±0.16  |
|       | 30    | 54.07±6.67# | 25.77±6.05#       | 20.33±4.00*       | 2.13±1.57# | 0.12±0.11# |
|       | 38    | 42.94±3.87# | 20.16±4.48#       | 17.12±6.12#       | 1.86±2.30# | 0.11±0.07# |
| 第 3 天 | 4     | 57.01±4.38* | 26.89±6.01*       | 20.53±4.20        | 2.15±2.20# | 0.21±0.41# |
|       | 18    | 60.67±4.60* | 31.04±5.51        | 21.01±3.58        | 2.38±2.40* | 0.23±0.12* |
|       | 30    | 49.09±5.51# | 21.10±46.00#      | 19.80±4.56#       | 1.09±0.87# | 0.09±0.11# |
| 第 4 天 | 4     | 49.01±5.73* | 22.64±5.01*       | 16.48±3.46*       | 1.10±0.45# | 0.09±0.10# |
|       | 18    | 51.31±4.72# | 23.43±6.01#       | 21.11±4.87#       | 2.01±0.91# | 0.11±0.24# |

\*: $P<0.05$ ;#: $P<0.01$ ,与第 1 天检测结果比较。

2.3 两种抗凝血流式 T 细胞亚群检测结果的比较显示,将表 1、2 的结果进行方差分析,发现 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝和肝素抗凝的血标本第 1 天 4、18℃ 保存的,第 2 天标本做流式 T 细胞亚群检测的各项指标之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但在数值上 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的标本结果均比肝素抗凝的标本高;18℃ 保存的标本第 3 天的检测结果显示,则 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的标本总 T 细胞、DN-T 细胞和 DP-T 细胞结果明显高于肝素抗凝的标本( $P<0.05$ )。上述结果提示,EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝较肝素抗凝更适合于流式 T 细胞亚群测定标本。

3 讨 论

流式淋巴细胞亚群测定的标本该用哪一种抗凝剂抗凝目前比较混乱,有的采用肝素锂抗凝,有的采用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝,两种抗凝方式标本的结果有无差异;标本保存一段时间后,两

种抗凝对标本检测结果有无影响;不能及时检测的标本该如何保存;检验完毕后的标本,按照国际惯例需要至少保存 3 d 以上随时备用各种目的复查<sup>[5]</sup>,标本的保质期限等未知因素都是影响流式淋巴细胞亚群检测结果的潜在因素,掌握相关信息是标准化检验流程所必需的。

EDTA-K<sub>2</sub> 和肝素锂是临床最常见的两种血液抗凝剂,EDTA 能与血液中的 Ca<sup>2+</sup> 螯合,从而阻断凝血过程。EDTA 盐有钾、钠、锂盐,国际血液学标准化委员会推荐使用的是 EDTA-K<sub>2</sub>,其溶解度最高,抗凝速度最快,通常是将 EDTA 盐配成 15% 的水溶液,使用比例为 40 μL 的 15% EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝 5 mL 血液。EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝对细胞形态学保护最好,且可抑制血小板聚集,适用于血常规检验、血液流变学检验等全血检验项目。肝素是一种含硫酸基团的黏多糖,不仅(下转第 150 页)

分群和 CD45/SSC 分群各有优劣。FSC/SSC 分群设门适合用于细胞形态完好,粒细胞、单核细胞和淋巴细胞大小区分明确,细胞内部颗粒性成分含量典型的病例。CD45/SSC 分群适合于粒细胞、单核细胞和淋巴细胞大小差别不是很明显,但细胞表面 CD45 表达量差别典型、细胞内部颗粒性成分含量典型的病例。绝大多数新鲜外周血标本,FSC/SSC 分群和 CD45/SSC 分群都能清楚地将白细胞区分成三群,即粒细胞群、单核细胞群和淋巴细胞群,然后将门设在淋巴细胞群即可对淋巴细胞亚群进行测定。由于 FSC/SSC 分群设门无需增加 CD45 荧光标记单抗,因此,试剂成本低,应用广泛。个别患者,其粒细胞体积偏小,与单核细胞和淋巴细胞大小很难区分,或者其单核细胞和淋巴细胞大小无法区分,此时 FSC/SSC 分群不能有效地将粒细胞群、单核细胞群和淋巴细胞群分开,造成流式淋巴细胞亚群设门困难,影响淋巴细胞亚群的检测。再有,标本采集后各种原因造成细胞形态学改变,如抗凝剂使用不当、保存时间过长或保存温度过高等引起细胞形态学退化,造成 FSC/SSC 分群困难。上述 FSC/SSC 分群困难的情况下,CD45/SSC 分群往往能很好地将细胞进行分群,完成检验任务。值得注意的是,骨髓标本细胞大小及内部结构极其复杂,一般均借助 CD45/SSC 分群才能有效群分细胞群。

鉴于淋巴细胞亚群测定在了解机体免疫功能状态中的重要意义以及目前 CFC 中存在两种分群设门的方法,两者检测结果之间有误差,两种方法检测结果的精密度以及分群成功率之间有误差,目前均无文献报道。本文通过实验调查证实,在健康人群中采用 FSC/SSC 分群和 CD45/SSC 分群,流式 T 淋巴细胞亚群检测结果之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),成功分群率均达到 100%;精密度实验也证实两种方法的批内变异系数和批间变异系数之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。945 份临床标本的检测应用显示,FSC/SSC 分群设门的成功分群率 97.78%,而 CD45/SSC 分群的成功分群率 99.83%,两者之间差异无统计学意义,且 FSC/SSC 分群困难的 21 份标本经调查发现均为急性白血病患者的标本,其中急性淋巴细胞白血病

13 份,急性髓系白血病 8 份。因此,在基于减少实验涉及的试剂项有利于降低干扰、确保检验质量的通讯指导下,从经济效益的角度考虑,建议日常工作中外周血标本淋巴细胞亚群分析采用 FSC/SSC 分群,极个别分群困难的病例可用 CD45/SSC 分群的方法复查便是。骨髓标本白血病免疫分群也不一定非要使用 CD45/SSC 分群,两种分群方法均可,只要针对异常细胞群设门分析达到辅助诊断的目标即可。

总之,FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法均可用于外周血淋巴细胞亚群含量的检测,FSC/SSC 分群法成本相对低廉,上机操作简便,适合大规模临床应用开展。CD45/SSC 分群法适合用于骨髓标本分析,作为外周血标本分群困难时的一种补充方案非常切实可行。

参考文献

[1] Okada Y. Flow cytometry——the basis of cell surface analysis and clinical application[J]. Rinsho Byori, 2010, 58(11): 1121-1130.

[2] Avlasevich S, Bryce S, De Boeck M, et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future [J]. Mutagenesis, 2011, 26(1): 147-152.

[3] Siebert JC, Walker EB. Monitoring cytokine profiles during immunotherapy[J]. Immunotherapy, 2010, 2(6): 799-816.

[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: 78-82, 88-94.

[5] Milush JM, Mir KD, Sundaravaradan V, et al. Lack of clinical AIDS in SIV-infected sooty mangabeys with significant CD4<sup>+</sup> T cell loss is associated with double-negative T cells[J]. J Clin Invest, 2011, 121(3): 1102-1110.

[6] Hu Q, Sader A, Parkman JC, et al. Bim-mediated apoptosis is not necessary for thymic negative selection to ubiquitous self-antigens [J]. J Immunol, 2009, 183(12): 7761-7767.

(收稿日期: 2011-08-11)

(上接第 147 页)

可以通过与抗凝血酶Ⅲ结合,引起抗凝血酶Ⅲ构型发生改变,从而加速凝血酶-凝血酶复合体形成产生抗凝作用,还可以借助肝素辅助因子Ⅱ抑制凝血酶的凝血功能,表现出很强的抗凝作用。常用肝素抗凝剂可以是肝素的钠、钾、锂、铵盐,其中钠、钾盐会影响血液中的钠、钾含量,铵盐会增加尿素氮的含量,所以,常用肝素锂抗凝,即使肝素锂价格较贵。肝素锂对血液成分干扰较少,是血液化学成分检测的首选抗凝剂,也可用于做红细胞渗透性实验、血气分析等。值得注意的是,将影响白细胞和血小板的各种相关检查。此外,肝素抗凝的血标本应于短时间内使用,放置过久血液又可凝固。

调查证实,EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的标本较肝素锂抗凝的标本具有检测结果高、保存期长、结果稳定性好的特点,建议各实验室应当以 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝为宜。另外,作者也发现标本保存的温度环境对检验结果的影响也很大,其中以 18 ℃ 的室温保存效果最好,3 d 内检验结果与采集后 1 h 内检验的结果差异无统计学意义( $P>0.05$ )。冬季和夏季需要分别采取升温和降温

措施来保障标本质量,并避免将标本储藏于冰箱冷藏室的习惯。

参考文献

[1] Siftar Z, Paro MM, Sokolic I, et al. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry[J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 207-217.

[2] 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.

[3] 熊彪, 邹尤宝. 大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(10): 892-893.

[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: 79-81.

[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)