

• 基础实验研究 •

FSC/SSC 和 CD45/SSC 分群法流式 T 淋巴细胞亚群分析的实验研究

刘毓刚^{1#}, 刘霞², 吴丽娟^{1△}

(成都军区总医院:1. 检验科;2. 体检中心 610083)

摘要:目的 建立并标准化流式细胞术外周血 T 淋巴细胞亚群含量测定方法,探讨 CD45/SSC 和 FSC/SSC 分群法检测的特点与适用性。**方法** 采用 FSC/SSC 分群的三色流式细胞术和 CD45/SSC 分群的四色流式细胞术,对 194 例健康人外周血 T 淋巴细胞亚群进行测定,并调查两种方法检测结果的精密性及临床应用的成功分群率。**结果** FSC/SSC 分群法健康人外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞、T₄/T₈ 比值、DN-T 细胞、DP-T 细胞的百分含量依次为 (69.98±5.79)%、(35.25±5.16)%、(25.08±4.34)%、(6.17±3.08)%、(0.71±0.36)% 和 (1.45±0.28)%;CD45/SSC 分群法结果依次为 (71.42±6.02)%、(35.82±5.78)%、(24.98±4.45)%、(5.98±3.11)%、(0.67±0.32)% 和 (1.47±0.30)%。两种方法检测结果之间差异无统计学意义 (*F* 检验, *P*>0.05)。精密度实验显示, FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法的变异系数均在 4% 以内,两者之间差异无统计学意义 (*P*>0.05)。临床 945 份标本分析中, FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法成功分群率分别为 97.78% 和 99.83%, 两者之间差异无统计学意义 (*P*>0.05)。**结论** 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 分群法适合用于特殊标本的复查。

关键词:流式细胞术; T 淋巴细胞亚群; 前向散射光; 侧向散射光; CD45

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0148-03

Experimental study on the detection of T-lymphocyte subsets in peripheral blood by flow cytometry with FSC/SSC or CD45/SSC gating

Liu Yugang^{1#}, Liu Xia², Wu Lijuan^{1△}

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

Abstract: Objective To establish and standardize a method of percentage analysis of T-lymphocyte subsets in peripheral blood by flow cytometry and investigate the character and adaptivity of CD45/SSC and FSC/SSC clustering methods. **Methods** T-lymphocyte subsets in peripheral blood were detected by three-color flow cytometry of FSC/SSC clustering and four-color flow cytometry of CD45/SSC clustering respectively in 194 health people, then the precision and the clinic successful clustering ratio of the two methods were investigated. **Results** The percentage of T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, DN-T cell, DP-T cell and CD4⁺ T/CD8⁺ T, detected by FSC/SSC method, were (69.98±5.79)%, (35.25±5.16)%, (25.08±4.34)%, (6.17±3.08)%, (0.71±0.36)% and (1.45±0.28)%, and those, detected by CD45/SSC method were (71.42±6.02)%, (35.82±5.78)%, (24.98±4.45)%, (5.98±3.11)%, (0.67±0.32)% and (1.47±0.30)%. No significant difference between the results of the two methods (*F* test, *P*>0.05) was demonstrated. Coefficient of variability in both of the two methods were within 4%, no significant difference was recorded in the precision test (*P*>0.05). The successful clustering ratio of FSC/SSC and CD45/SSC methods were 97.78% and 99.83% respectively, and there was no statistical difference (*P*>0.05). **Conclusion** Both of FSC/SSC and CD45/SSC clustering methods could be used to detect T-lymphocyte subsets in peripheral blood. FSC/SSC method might have the advantage of low cost and simple operation, so it might be fit for large scale clinical application, and CD45/SSC method could be applied to recheck the special samples.

Key words: flow cytometry; T-lymphocyte subsets; forward scattering; side scattering; CD45

临床流式细胞学检验技术(CFC)是检验医学领域继基因诊断技术平台之后诞生的又一个新型检验技术平台,通过对来自临床的血液、组织、脱落细胞等标本中细胞表面及其内部的核酸、蛋白质、多肽成分的定性/定量分析,广泛用于临床疾病的诊断与鉴别、病情监测、疗效评估和预后判断等^[1-3]。外周血淋巴细胞亚群含量分析是 CFC 临床应用的主要项目之一,目前常见 FSC/SSC 分群和 CD45/FSC 分群两种设门方法,本研究旨在建立和标准化上述两种淋巴细胞亚群百分含量的测定方法,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 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。成功分群率为随机选取某三甲医院 2008 年 4~6 月送检的门诊及住院患者标本,共计 945 份。

1.2 仪器与试剂 FSC/SSC 分群三色流式检测用同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5、测定抗体 CD4⁺ FITC/CD8⁺ PE/CD3⁺ PC5, CD45/SSC 分群四色流式检测用同型对照抗体 CD45⁺ FITC/IgG1-RD1/IgG1-ECD/IgG1-PC5, 测定抗体 CD45⁺ FITC/CD4⁺ RD1/CD8⁺ ECD/CD3⁺ PC5, 以及其他试剂,如标本预处理试剂(包括溶液 A、溶液 B 和溶液 C)、鞘液等均均为美国 Beckman-Coulter 公司产品。使用美国 Beckman-

#:第三军医大学 2010 级硕士研究生。 △ 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com。

Coulter 公司 XL4-MCL 流式细胞仪进行测定。

1.3 健康人群外周血 T 淋巴细胞亚群测定 FSC/SSC 分群法、CD45/SSC 分群法详细流式检验方法参见文献[4]执行。

1.4 精密度调查实验

1.4.1 批内变异系数测定 取健康捐献者静脉血分别用 FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群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 T 淋巴细胞亚群含量,共测定 20 次。

1.4.2 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 1.3 的方法处理后上机测定各 T 淋巴细胞亚群的含量,共测定 20 次(第 3 天取消晚上 20:00 测定)。

1.5 临床应用成功分群率调查 945 份临床血液标本同时按照 1.3 的方法,用 FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法进行 T 淋巴细胞亚群测定。流式检测时,以 FSC/SSC 图或 CD45/SSC 图中出现界限清晰的粒细胞群、单核细胞群和淋巴细胞群为分群良好,针对淋巴细胞设门,成功获得各 T 细胞亚群含量值为成功分群;反之,以 FSC/SSC 图或 CD45/SSC 图中不能出

现界限清晰的粒细胞群、单核细胞群和淋巴细胞群,不能对淋巴细胞群进行设门,不能获得各 T 细胞亚群含量值为分群失败。分别统计 FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法成功分群例数,记录分群失败本来源患者的临床诊断结论。成功分群率=(成功分群例数÷总例数)×100%。

1.6 统计学处理 应用 Microsoft Office 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,分群率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 健康人外周血两种不同设门法流式淋巴细胞亚群测定,结果见表 1。方差分析显示,FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法获得的健康人外周血 T 淋巴细胞亚群的各项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%。

2.2 两种不同分群法流式 T 淋巴细胞亚群测定的精密度检测,结果见表 2。统计学处理证实,两种方法获得的各项检验结果,其批内变异系数和批间变异系数之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 健康人外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果

内容	总 T 细胞(%)	T ₄ 细胞(%)	T ₈ 细胞(%)	T ₄ /T ₈ 比值	DN-T 细胞(%)	DP-T 细胞(%)
CD 标志	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺
FSC/SSC 分群法	69.98±5.79	35.25±5.16	25.08±4.34	1.45±0.28	6.17±3.08	0.71±0.36
CD45/SSC 分群法	71.42±6.02	35.82±5.78	24.98±4.45	1.47±0.30	5.98±3.11	0.67±0.32

表 2 两种不同分群法 T 淋巴细胞亚群检测的变异系数结果(%)

方法	CV	n	总 T 细胞	T ₄ 细胞	T ₈ 细胞	T ₄ /T ₈	DN-T 细胞	DP-T 细胞
FSC/SSC 分群法	批内	20	2.16	2.54	2.01	1.05	2.37	2.60
	批间	20	3.57	3.42	2.95	2.31	3.64	2.54
CD45/SSC 分群法	批内	20	2.08	1.95	2.67	1.06	2.00	1.98
	批间	20	3.34	2.86	3.02	2.04	3.55	3.04

2.3 两种不同设门法流式淋巴细胞亚群测定的分群成功率,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%,CD45/SSC 分群的成功分群率 99.83%。经卡方检验,两者之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

淋巴细胞是机体最主要的免疫细胞,按照淋巴细胞表面含有的重要 CD 分子标志进行分类,可将淋巴细胞 T 分为 T 细胞(即 CD3⁺)、B 细胞(即 CD3⁻CD19⁺)和 NK 细胞(即 CD3⁻CD16/56⁺)。其中 T 细胞占绝大多数,又可进一步分成 T₄ 细胞(即 CD3⁺CD4⁺CD8⁻,简略地记录为 CD3⁺CD4⁺)、T₈ 细胞(即 CD3⁺CD4⁻CD8⁺,CD3⁺CD8⁺)、双阴性 T 细胞(DN-T 细胞,即 CD3⁺CD4⁻CD8⁻)和双阳性 T 细胞(DP-T 细胞,即 CD3⁺CD4⁺CD8⁺)等亚群^[5-6]。正常情况下,T₄ 细胞和 T₈ 细胞在体内保持着一种动态平衡状态,习惯用 T₄/T₈ 比值(即 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺,简略地记录为 CD4⁺/CD8⁺)来描述。T₄ 细胞按照功能来分类,主要包括促进免疫应答的辅助性 T 细胞(Th 细胞)和诱导免疫应答的诱导性 T 细胞(Ti 细胞);T₈ 细胞按照功能来分类,主要包括细胞毒性 T 细胞(Tc 细胞)和抑制性 T 细胞(Ts 细胞),其中 Tc 细胞的作用在于杀伤带靶抗原的细胞,引起后者的凋亡,达到清除被感染的细胞或异常细胞的目的,维持内环境稳定;Ts 细胞的功能主要在于抑制体内的免疫应答。上述淋巴细胞亚群的功能是通过其表面的重要 CD 分子来实现的,如 CD3、CD4 和 CD8 参与了 T

细胞活化信号的跨膜传递过程和 HLA 限制性。机体面临各种异常情况时,上述免疫细胞的比例和绝对数量均会出现一定的消长,或者免疫细胞的上述重要 CD 分子表达异常(主要指表达降低),均提示机体免疫功能紊乱的存在。临床疾病无不与免疫功能相关,如感染性疾病、肿瘤、血液系统疾病、代谢性疾病、心脑血管意外等,从外周血淋巴细胞亚群含量的变化,可以推测体内实际的免疫功能状态,辅助疾病的诊断、疗效监测、预后判断,甚至指导临床选择治疗药物类型以及使用剂量等。因此,外周血淋巴细胞亚群测定具有重要的临床应用意义,是临床流式细胞学检验技术(CFC)中被应用最为广泛的项目之一。

流式淋巴细胞亚群检测最常见的方案有两种,即 FSC/SSC 分群法和 CD45/SSC 分群法。FSC 即前向散射光,反映流式检测时细胞的体积(大小);SSC 即侧向散射光,反映流式检测时细胞的均质性,如细胞内的颗粒性物质的多少、核质比等。因此,FSC/SSC 分群即根据细胞的大小和细胞内颗粒物质以及核质比例的信息作为依据,对流经流式细胞仪流动室小孔的细胞进行分群的一种方法。CD45 是有核细胞表面均具有的一种 CD 分子,但在各种白细胞中 CD45 的表达量存在差别,其中以粒细胞表达量较低,淋巴细胞和单核细胞表达量较高。因此,CD45/SSC 分群就是利用白细胞表面 CD45 表达量和细胞内颗粒物质以及核质比例的信息作为依据,对流经流式细胞仪流动室小孔的细胞进行分群的一种方法。理论上,FSC/SSC

分群和 CD45/SSC 分群各有优劣。FSC/SSC 分群设门适合于细胞形态完好, 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、确保检验质量的共识指导下, 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, Sundaravaran V, et al. Lack of clinical AIDS in SIV-infected sooty mangabeys with significant CD4⁺ 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-K₂ 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-K₂ 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)