

• 基础实验研究 •

两种不同溶血免洗方法对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响

陈 潇, 吴丽娟[△]

(成都军区总医院检验科 610083)

摘 要:目的 探讨甲酸溶血免洗法和 NH_4Cl 溶血免洗法对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响程度及优劣, 为流式 T 淋巴细胞亚群检测的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, 调查甲酸溶血免洗法和氯化铵溶血免洗法及其溶血处理后上机间隔时间(IT)对检验结果的影响。结果 甲酸溶血免洗法检测结果较稳定, 室温避光放置 2 d 或冰箱冷藏室放置 3 d 检测结果无明显改变; NH_4Cl 溶血免洗法溶血后需尽快测定, 室温避光放置或冰箱冷藏室放置 6 h 检测结果明显降低。结论 甲酸溶血免洗法更适合流式 T 淋巴细胞亚群的检测, 其检测结果较 NH_4Cl 溶血免洗法稳定性好。

关键词:流式细胞术; T 淋巴细胞亚群; 甲酸类; 氯化铵; 标本预处理

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0151-03

Effects of two different haemolyzing/no washing methods on T-lymphocyte subgroups detection by flow cytometry

Chen Xiao, Wu Lijuan[△]

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

Abstract: **Objective** To investigate the effects of methanoic acid haemolyzing/no washing method and ammonium chloride haemolyzing/no washing method on peripheral blood T-lymphocyte subgroups detection 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 in persons accepting health-examination. The samples were detected by flow cytometry using the two haemolyzing/no washing methods, respectively, at different interval time(IT) after haemolyzing and before detecting. **Results** The detection results of samples, treated by methanoic acid haemolyzing/no washing method could be stable for 2 days, when being stored at room temperature and protected from light, and for 3 days, when being stored in cold closet of refrigerator. Samples, treated by ammonium chloride haemolyzing/no washing method must be detected as soon as possible after being haemolyzed and the results decreased in 6 hours, whether samples were stored at room temperature and stored protected from light or stored in cold closet of refrigerator. **Conclusion** The methanoic acid haemolyzing/no washing method could be more suitable for detecting T-lymphocyte subgroups by flow cytometry than the ammonium chloride haemolyzing/no washing method. The results of methanoic acid haemolyzing/no washing method could be more stable.

Key words: flow cytometry; T-lymphocyte subsets; formic acids; ammonium chloride; sample pretreatment

临床流式细胞学检验技术(CFC)是一门技术难度高、方法灵活、影响因素众多的新兴单细胞定量分析技术^[1-2], 流式检验项目程序的标准化是其质量控制的重要措施之一, 是提高 CFC 检验质量的必经之路。在流式临床应用领域, 任何一项涉及全血白细胞检测的流式分析项目, 均离不开标本预处理环节的全血溶血处理步骤。目前临床上常见两种标本预处理的全血溶血方法, 包括甲酸溶血法和 NH_4Cl 溶血法, 本文对上述两种溶血免洗法的方法学比较研究, 旨在明确两种溶血免洗处理的流式检测结果之间是否存在差异, 以及两种溶血免洗方法处理后标本上机测定的间隔时间(IT)对检测结果的影响, 为标准化全血白细胞检测程序提供科学依据, 并供同行交流与借鉴。

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 3 mL, EDTA- K_2 抗凝(紫色采血管), 立即送检验科

检验。

1.2 仪器与试剂 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、甲酸(HCOOH)溶血试剂盒(英文 Immuno Prep lysing Reagent, 即标本预处理溶血试剂, 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。 NH_4Cl 为国产分析纯试剂, 将其配制成使用浓度为 0.9% 的水溶液。使用美国 Beckman-Coulter 公司 XL4-MCL 流式细胞仪。

1.3 方法 实验设甲酸溶血免洗组和 NH_4Cl 溶血免洗组两个实验组, 每组设溶血后室温($18\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$)放置管、冰箱冷藏室($4\sim 6\text{ }^\circ\text{C}$)放置管两个测定管, 同时设相应同型对照管。按照文献[3]的方法进行 T 淋巴细胞亚群测定, 在标本预处理的溶血环节, 两组测定管及其同型对照管分别用甲酸溶血试剂盒和 NH_4Cl 溶液溶血, 并将室温放置管和冰箱冷藏室放置管分别置于 $18\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$ 室温暗盒和 $4\sim 6\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏室中, 按照溶血后 15 min、1 h、6 h、12 h、24 h 和 72 h 上机测定。流式检测时, 以

[△] 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com。

SSC/FSC 分群对淋巴细胞群设门,记录总 T 细胞(CD3⁺)、T₄ 细胞(CD3⁺CD4⁺)、T₈ 细胞(CD3⁺CD8⁺)、DN-T 细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁻)和 DP-T 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁺)的百分含量。当检测结果统计学处理后发现,与溶血后 15 min 的检测结果显示相比已经出现明显不同,自动放弃之后的实验观察。

1.4 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 室温放置两种不同溶血免洗法的 T 淋巴细胞检测结果见表 1。与组内溶血 15 min 测定结果比较,甲酸溶血免洗法随着室温放置 IT 增加,检测结果不同程度降低,直到放置 72 h 总 T 细胞百分含量的降低差异有统计学意义($P < 0.05$),其余

各项指标的降低差异无统计学意义($P > 0.05$);NH₄Cl 溶血免洗法室温放置 6 h,T₄ 细胞、T₈ 细胞、DN-T 细胞和 DP-T 细胞即开始降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),放置 12 h 时各项指标均明显降低($P < 0.01$)。将 NH₄Cl 溶血免洗法与甲酸溶血免洗法进行测定点对点结果的比较,室温放置 6 h 时,NH₄Cl 溶血免洗法除总 T 细胞百分含量降低差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余各项指标均较甲酸溶血免洗法的低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);室温放置 6 h 时,NH₄Cl 溶血免洗法各项指标均较甲酸溶血免洗法的低($P < 0.01$)。上述结果提示,甲酸溶血免洗法检测结果较稳定,室温避光放置 2 d 检测结果无明显变化。氯化铵溶血免洗法需在溶血后尽快测定,6 h 后检测结果将偏低。

表 1 室温放置两种不同溶血免洗法 T 淋巴细胞亚群检测结果(%, $\bar{x} \pm s$)

方法	IT	总 T 细胞	T ₄ 细胞	T ₈ 细胞	DN-T 细胞	DP-T 细胞
甲酸溶血免洗法	15 min	72.02±6.00	37.33±4.58	25.94±5.12	6.53±3.87	0.66±0.40
	1 h	72.01±4.39	37.78±4.96	25.94±6.03	6.49±2.75	0.65±0.43
	6 h	71.56±5.26	37.18±4.60	26.01±5.42	6.42±3.34	0.61±0.39
	12 h	71.13±5.02	37.12±5.45	25.46±5.11	5.50±3.47	0.60±0.44
	24 h	70.89±6.35	37.20±4.04	24.41±5.02	5.39±5.12	0.60±0.51
	72 h	61.75±4.07 ^a	32.45±4.47	22.06±3.98	4.05±4.70	0.43±0.43
NH ₄ Cl 溶血免洗法	15 min	72.56±6.18	36.40±5.22	25.73±4.05	6.14±4.44	0.63±0.37
	1 h	70.33±6.24	36.15±6.02	24.98±4.47	5.87±4.15	0.49±0.40
	6 h	62.75±6.54	30.21±3.35 ^{ac}	20.08±3.46 ^{ac}	2.92±3.09 ^{ad}	0.26±0.50 ^{bd}
	12 h	46.18±4.30 ^{bd}	21.45±2.15 ^{bd}	16.69±4.46 ^{bd}	0.87±1.10 ^{bd}	0.05±0.09 ^{bd}

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,各组溶血法不同 IT 测定点与组内溶血后 15 min 结果比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$,NH₄Cl 溶血法与甲酸溶血法对应 IT 测定点比较。

表 2 冰箱冷藏室两种不同溶血免洗法 T 淋巴细胞亚群检测结果(%, $\bar{x} \pm s$)

方法	IT	总 T 细胞	T ₄ 细胞	T ₈ 细胞	DN-T 细胞	DP-T 细胞
甲酸溶血免洗法	15 min	72.27±5.32	37.09±4.47	26.16±4.85	6.43±4.05	0.65±0.40
	1 h	71.98±5.09	38.30±5.04	25.42±3.48	7.00±2.67	0.63±0.34
	6 h	72.61±6.23	37.81±5.11	26.21±4.70	6.81±4.03	0.69±0.29
	12 h	72.31±4.56	37.05±4.78	25.73±4.82	6.62±3.94	0.67±0.40
	24 h	71.56±6.03	37.45±3.96	26.00±4.98	6.46±4.12	0.70±0.35
	72 h	70.95±5.47	36.46±5.02	24.89±5.11	6.03±3.37	0.57±0.41
NH ₄ Cl 溶血免洗法	15 min	72.70±6.00	36.78±4.98	26.01±5.04	6.21±3.90	0.63±0.35
	1 h	71.05±4.32	36.03±5.11	25.11±5.00	5.69±4.32	0.50±0.41
	6 h	61.32±4.51 ^{ac}	29.46±5.40 ^{ad}	21.06±4.22 ^{bd}	3.04±0.86 ^{ad}	0.29±0.11 ^{ad}
	12 h	45.12±4.35 ^{bd}	21.07±3.04 ^{bd}	15.84±2.68 ^{bd}	1.27±0.58 ^{bd}	0.12±0.12 ^{bd}

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,各组溶血法不同 IT 测定点与组内溶血后 15 min 结果比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$,氯化铵溶血法与甲酸溶血法对应 IT 测定点比较。

2.2 冰箱冷藏两种不同溶血免洗法的 T 淋巴细胞检测结果见表 2。与组内溶血 15 min 测定结果比较,甲酸溶血免洗法溶血后冰箱冷藏室保存 72 h 内检测结果无明显改变($P > 0.05$),NH₄Cl 溶血免洗法溶血后冰箱冷藏室保存 1 h 内检测

结果无明显改变($P > 0.05$)。将 NH₄Cl 溶血免洗法与甲酸溶血免洗法进行测定点对点结果的比较,冰箱冷藏室放置 1 h 内各项检测结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$),放置 6 h NH₄Cl 溶血免洗法检测结果均较甲酸溶血免洗法降低($P <$

0.05 或 $P < 0.01$), 放置 12 h NH_4Cl 溶血免洗法各项检测结果严重降低 ($P < 0.01$)。上述结果提示, 冰箱冷藏室保存 IT 时间可适当延长, 甲酸溶血免洗法冰箱冷藏室保存 3 d 各项指标均无改变, NH_4Cl 溶血免洗法冰箱冷藏室保存不能超过 6 h。

3 讨 论

流式细胞术 (FCM) 诞生于二十世纪七八十年代, 是生物医学领域定量分析单个细胞功能状态不可缺少的关键技术, 深受生物医学科研人员的青睐。九十年代后, FCM 快速进入临床应用领域, 进而发展成为 CFC, 不仅是因为单克隆抗体技术的迅猛发展解决了 FCM 需要的针对各种各样临床感兴趣蛋白分子的单抗, 也因为人们研发了标本细胞免疫荧光染色后溶血/免洗制备技术^[4], 极大解决了流式细胞仪测定前的标本制备程序, 使 CFC 大批量处理临床标本成为可能。

FCM 检测包括“标本细胞的免疫荧光染色、溶血处理、细胞洗涤、上机测定和数据分析”五大基本操作步骤, 流程上可以是“免疫荧光染色→溶血处理→细胞洗涤→上机测定→数据分析”, 也可以是“溶血处理→细胞洗涤→免疫荧光染色→上机测定→数据分析”。上述流程中的细胞洗涤步骤, 一般是采用“800~1 000 r/min 离心 5 min 弃去上清液”收集细胞, 再向收集的细胞沉淀中“加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 或生理盐水 10 mL 重悬细胞, 800~1 000 r/min 离心 5 min 去上清”来清洗细胞的, 并且需要清洗 3~4 次才能达要求。因此, 单份标本完成细胞洗涤步骤需时 18~25 min, 需要试管 4~5 支。临床检验处理的是成批量的标本, 无论在时间、耗材和占用人力上都是难以接受的。因此, 溶血/免洗制备技术的诞生将 FCM 标本预处理步骤简化成为四步, 不仅简便, 更主要的是节约了时间和人力, 降低了检验成本。

本文介绍的 NH_4Cl 溶血免洗法和甲酸溶血免洗法是当今主流的两大溶血/免洗制备技术^[4]。 NH_4Cl 溶血免洗法操作简便, 只需一次加样, 但是溶血后不能及时上机测定将有部分细胞丢失, 使检测结果降低^[5]; 甲酸溶血免洗法是一种复合技术, 将“溶血-溶血终止-细胞固定”结合起来, 方法首先采用稀甲酸破坏红细胞 (A 液), 然后加入中和液终止甲酸的细胞裂解反应 (B 液), 最后加入多聚甲醛固定红细胞破坏后剩余的白细胞 (C 液), 试剂自配方法见文献^[3]。甲酸溶血效果较 NH_4Cl 强, 加入 A 液后漩涡器上震荡混匀只需 10~60 s, 样品中的红细胞即全部裂解。多聚甲醛英文名 Paraformaldehyde 或

Polyoxymethylene, 多聚甲醛稳定性好, 不易挥发, 固定细胞只需极低的浓度, 且被固定的细胞抗原丢失少, 细胞结构稳定, 抗体与细胞上的靶抗原结合牢固, 因此成为分子生物学和细胞生物学中最常采用的一种细胞固定剂。本研究结果表明, NH_4Cl 溶血免洗法流式检测结果的稳定性远不及甲酸溶血免洗法, 溶血后需在 1 h 内尽快测定, 室温或冷藏放置均可造成检测结果降低, 不适合于 CFC 大批临床标本的检测。甲酸溶血免洗法操作相对繁琐, 但是样品极为稳定, 室温避光保存 2 d 或冷藏保存 3 d, 流式检测结果均无明显改变, 对于大批标本测定十分有利。另外, 每日测定完成后可将样品冷藏存放 3 d, 随时备用复查上机之需。美国 Beckman-Coulter 公司研发了甲酸溶血/免洗制备技术, 并向市场推出了配套标本预处理溶血感应加样小型仪器, 解决了甲酸溶血免洗法操作繁琐的问题。

总之, 流式全血白细胞分析的标本预处理溶血步骤对于检验结果十分重要, 采取合适的溶血方法更能确保检验结果的准确性。建议尽量采取甲酸溶血免洗法, 并严格按照 50 μL 血液标本需“加入 A 液 625 μL 漩涡器混匀 10 s, 加入 B 液 265 μL 漩涡器混匀 10 s, 加入 C 液 100 μL 漩涡器混匀 10 s”的标准化程序执行。

参考文献

- [1] Siftar Z, Paro MM, Sokoli I, et al. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important[J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 207-217.
- [2] 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.
- [3] 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, 308-309.
- [4] Siftar Z, Paro MM, Sokoli I, et al. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important[J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 207-217.
- [5] Ambach A, Bonnekoh B, Gollnick H. Routine flow cytometric immuno-staining of T-cell perforin is preserved using diethylene glycol for erythrocyte-lysis but lost by the use of ammonium chloride [J]. Exp Dermatol, 2003, 12(6): 825-831.

(收稿日期: 2011-08-11)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体 (集合) 称为总体, 包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本, 样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平, 随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测, 则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值, 样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值, 样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则, 即需要采用随机的抽样方法, 保证总体中每个个体被选取的机会相同。