

流式细胞术在临床检验中的应用及前景

卢春丽, 薛雯, 莫秋菊, 荆环云*

中国人民解放军联勤保障部队第九二四医院检验科, 广西 桂林

收稿日期: 2023年4月22日; 录用日期: 2023年5月15日; 发布日期: 2023年5月24日

摘要

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是七十年代发展起来的一项高学科技术, 它不仅可以测量细胞大小、内部颗粒性状, 还可对细胞表面、胞浆抗原、细胞内的核酸、细胞因子等进行定量、快速、客观、多参数相关检测。它是集光学、电子学、流体力学、细胞化学、物理学、生物学、免疫学、以及激光和计算机等多门学科和技术于一体的综合运用产物。流式细胞仪具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大、分析全面、方法灵活等特点, 随着其性能的不断改进和测定方法与技术的快速发展, FCM已成为某些疾病不可或缺的辅助诊断技术。本文就流式细胞术的原理及在各领域的应用、发展趋势进行综述。

关键词

流式细胞术, 临床检验, 应用及前景

Application and Prospect of Flow Cytometry in Clinical Examination

Chunli Lu, Wen Xue, Qiuju Mo, Huanyun Jing*

Department of Clinical Laboratory of Guilin No. 924 Hospital, Guilin Guangxi

Received: Apr. 22nd, 2023; accepted: May 15th, 2023; published: May 24th, 2023

Abstract

Flow cytometry (FCM) is a high-tech technology developed in 1970s, which can not only measure cell size and internal particle properties, but also quantitatively, rapidly, objectively and multi-parameter correlated detection of cell surface, cytoplasmic antigen, intracellular nucleic acid, cytokine, etc. It is a collection of optics, electronics, fluid mechanics, cytochemistry, physics, biology, immunology, as well as laser and computer and other disciplines and technologies in one

*通讯作者。

comprehensive application product. Flow cytometry has the characteristics of fast detection speed, many measurement indicators, large amount of data collection, comprehensive analysis and flexible method. With the continuous improvement of its performance and the rapid development of measurement methods and techniques, FCM has become an indispensable auxiliary diagnostic technology for some diseases. This paper reviews the principle, application and development trend of flow cytometry.

Keywords

Flow Cytometry, Clinical Test, Application and Prospect

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 流式细胞仪的结构及工作原理

流式细胞仪主要由细胞流动室、激光聚焦区、检测系统、数据处理系统这 4 部分组成。将待测标本制备成单细胞悬液，目标细胞经特异性荧光染色后，在气体的压力下进入充满鞘液的流动室。流动室由样品管和鞘液管组成，当两者液流压力差达到一定程度时，在鞘液的约束下，样本管中细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，形成细胞柱，后者在激光检测区与入射的激光束垂直相交，液柱中的荧光细胞被激光激发产生荧光信号。仪器中的检测系统包括了一系列的光学部件：透镜、光阑、滤片和检测器等，用于收集光信号，通过这些波长选择通透性滤光片，我们可将不同波长的散射光和荧光信号区分开来。光信号通过波长选择通透性滤片后，经光电倍增管接收并转为电信号，再通过模/数转换器，将连续的电信号转换为可被计算机识别的数字信号，以图形显示出来，计算机系统将对数据进行收集、储存、显示并分析被检测到的信号，对各种指标做出统计分析[1]。

2. 在临床检验上的应用

2.1. 在血液病诊断和治疗中的应用

通过对外周血或骨髓细胞表面抗原的多参数分析，由此确定目标细胞的起源、分型及其分化程度，对多种血液病的诊断、治疗及预后判断等起着举足轻重的作用。由于外周血、骨髓等标本具备采集方便、样品中各成分呈悬浮分散状态，同时具有易于操作、分选、分析等优点，故血液学是流式细胞的技术首选和重要应用领域。以下是流式细胞仪在血液学中的应用。

2.1.1. 白血病的诊断和治疗

用流式细胞术检测白血病免疫分型具有快速、简便、重复性好等优点，形态学检查的可靠性取决于检查者的经验，而流式细胞术则是根据特异性单抗来客观、快速地确定细胞的来源与性质。故流式细胞术弥补了传统形态学的不足，提高了白血病免疫分型的正确性。流式细胞术检测白血病免疫表型是利用荧光标记的单克隆抗体用分子探针多参数分析白血病细胞的细胞膜和细胞浆或细胞核的免疫表型，可快速、精确分析白血病细胞，且重复性好[2]。其免疫分型的价值体现在：① 能正确区别 AML 和 ALL，并能进一步区别 ALL 中的 T 系、B 系及亚型。T 或 B 细胞的分型不仅可以更好地了解白血病细胞的起源，而且极大地提高了诊断和治疗的准确性，对白血病的诊断、制订治疗策略、判断预后及发病机制的研究

都有重要的参考价值；② 能正确鉴别 AML 中的 M0、M6、M7；③ 能诊断双系或双表型白血病；④ 能发现仅表达个别次要非本系列相关抗原的白血病；⑤ 能诊断少见、疑难的白血病(如毛细胞性白血病)；⑥ 微小残留病变的流式细胞术检测对 AML、ALL 病人具有重要的预后意义，它可指导临床治疗，预测白血病复发，评价自体骨髓移植的净化效果[3]。

2.1.2. 血小板方面的应用

流式细胞术在检测血小板方面的应用十分广泛，包括抗血小板抗体及血小板功能等。在一些自身免疫病、服用某些药物、输血、妊娠等情况下，机体可产生抗血小板自身抗体，引起严重的血小板减少[4]。流式细胞术检测血小板抗体的原理与 Coombs 试验类似，分为直接法和间接法。直接法是将病人血小板与荧光标记的抗人球蛋白反应后进行测量；间接法则是将病人血清与正常人血小板一起孵育后，再与荧光标记的抗人球蛋白结合，最后进入流式细胞仪进行荧光分析。血小板膜内外存在着许多与血小板活化有关的糖蛋白，参与血小板的粘附、聚集和活化功能。活化血小板是血栓形成的主要原因之一，血小板膜糖蛋白(GP)是参与止血、血栓形成的重要分子基础，故心绞痛和心肌梗死、冠状动脉血管成形术、动脉硬化化的病人，体内活化血小板百分率和绝对数显著高于正常人[5]。活化血小板与静止血小板相比，膜上某些糖蛋白常发生显著变化，成为活化血小板的检测标志物，利用针对 GP 的单克隆抗体对血小板进行免疫荧光标记，并用流式细胞仪分析单个血小板或血小板亚群的 GP 是血小板膜糖蛋白检测分析方法的重大发展，其方法简便、快速、标本用量少、灵敏度高、结果准确。对诊断遗传性血小板功能缺陷疾病、血小板无力症、血栓性疾病和血栓前状态等疾病检测有临床辅助意义。

2.1.3. 网织红细胞方面的应用

因网织红细胞内有一定量的 RNA，流式法可通过染色显示网织结构，将其分成高荧光网织红细胞(HFR)、中荧光网织红细胞(MFR)和低荧光网织红细胞(LFR)三群，其分类方式与 RNA 含量、细胞的成熟度有关。分析不同成熟度网织红的比例，有着重要的临床意义：① 作为溶血性贫血、肾性贫血等的初筛指标；② 贫血的疗效观察。可用于溶贫患者对铁剂、红细胞生成素等治疗过程的监测；③ 在白血病等肿瘤疾病放、化疗过程中，了解骨髓内造血状态，指导临床适时调整治疗方案；④ 骨髓移植的早期监测指标，网织红细胞生成指数监测肾移植后红细胞生成活性比网织红细胞计数更敏感[6]。

2.1.4. 阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)的诊断根据

PNH 是一种造血干细胞克隆病，CD55、CD59 低表达为其特点[7]。CD59 可表达于红细胞、淋巴细胞及粒细胞膜上，根据 CD59 的表达可将 PNH 病人分为三型，研究证明不同亚型对补体的敏感程度不同，故特异地分析患者粒、红细胞的 CD55、CD59 表达可以监测疾病的发展过程、预测疾病的走向，对于 PNH 的诊断及病情评估有非常重要的意义[8]。用流式细胞仪检测并计数缺乏这类膜蛋白的异常血细胞，是目前诊断 PNH 最直接、最敏感、特异性最强且可以定量的良好手段[9]。

2.1.5. 在造血干细胞移植中的应用

外周血造血干细胞移植(PBSCT)的成功与否，除了与是否合并并发症有关外，还与移植中 CD34+ 细胞的数量和质量有关，对外周血移植而言，目前普遍采用的指标为 2×10^6 个 CD34+ 细胞/千克体重[10]。通过 CD34 标记和细胞计数微球的同时使用，或者使用具有计数功能的流式细胞仪是鉴定和计数造血干细胞的快速、准确、定量的方法。足够数量的造血干细胞是移植成功的关键之一，通过流式细胞仪的荧光染色将其数量确定，对移植工作的开展至关重要。

2.2. 在临床免疫中的应用

淋巴细胞分为 T、B 和 NK 细胞，又根据成熟 T 淋巴细胞特有的标志 TCR 和 CD3 表面抗原，将其分

为辅助性 T 细胞(Th)和细胞毒性 T 细胞(Tc)。采用单克隆荧光标记抗体,用流式细胞术检测,可对淋巴细胞及亚群作出精准分析。淋巴细胞亚群百分数可用于监测病人的免疫状态,正常人 T 淋巴细胞 CD4+CD8+ 比值大约为 2/1,比值升高表明机体免疫机能亢进,见于自身免疫性疾病,如 SLE、类风湿性关节炎、自身免疫性溶血等;比值降低表明机体免疫机能下降,如艾滋病、病毒感染、肿瘤、活动性肝硬化、再障等[11]。CD4+CD8+ 比值检测在器官移植受者免疫功能监测、个体化免疫治疗疗效判断中同样具有重要意义[12]。器官移植受者口服免疫抑制类药物,目的在于抑制机体免疫功能,防止移植排斥发生,确保移植器官的长期存活,但是受者免疫功能抑制过度,极容易发生感染,一样将导致移植失败。因此,受者需要的是一种恰当的免疫抑制,将免疫功能控制在较低的范围。为此,需要经常监测受者的免疫功能,CD4+CD8+ 细胞比值是非常好的监测指标[13]。

2.3. 在肿瘤学方面的应用

人体 DNA 含量直接代表细胞的倍体状态,非整倍体的出现可能是发生早期癌变的一个重要指标。正常的体细胞具有稳定的 DNA 二倍体含量,当人体发生癌变或具有恶变潜能时,机体会伴随细胞 DNA 含量的异常变化,利用流式细胞术可以进行细胞周期、DNA 倍体分析及定量分析检测癌基因蛋白产物、耐药蛋白、细胞凋亡等,流式细胞术可以提供确切的诊断信息,这是组织形态学方法难以做到的。流式细胞术主要是利用可疑部位穿刺物、脱落细胞、灌洗液、体液等少量标本进行 DNA 含量测定,进行包括癌前病变及早期癌变的检出。流式细胞术分析病理细胞具有速度快、信息量大、敏感度高优点,不仅可对恶性肿瘤 DNA 含量进行分析,还可根据化疗过程中肿瘤 DNA 分布直方图的变化去评估疗效,从而为临床辅助诊断和进一步治疗中的药物选择、治疗强度、作用时间等提供较确切、可靠的信息。

2.4. 在器官移植中的应用

实体组织和骨髓的移植已广泛应用于临床医学的疾病治疗中,手术前需要用供者的淋巴细胞与受者血清混合进行交叉配型试验,而流式细胞术在移植前后为同种异体移植的受者提供了一个较传统方法更为灵敏的检测方法。流式细胞术根据细胞荧光强度的不同,区分细胞是否存活,再根据实验组与对照组比较淋巴细胞的死亡数量,该方法大大提升了群体反应性抗体检测的灵敏度和准确性,使得群体反应性抗体的筛选结果可指导临床进行移植手术[14]。

3. 临床流式细胞术的发展趋势

3.1. 从相对细胞计数到绝对细胞计数

淋巴细胞亚群可依其表面标志物分为 T、B、NK 细胞或其亚群,这些细胞过去多以相对百分数表示结果,由于百分比只能代表某种细胞在混合细胞群体中所占的比例,并不能体现其在单位体积血液中的绝对数量,故有一定局限性。随着计数微球的引进,实验中有了可比性参照,使得细胞绝对计数得以实现。流式细胞绝对计数可用于淋巴细胞亚群、外周血或骨髓中造血干细胞、网织红细胞、血小板等,因引入了特异性抗体,此种计数方式优于显微镜法[15]。在血液中可能出现的其他一些稀少细胞,如内皮细胞、转移的肿瘤细胞等,也将被流式细胞仪监测到并进行绝对计数。流式细胞绝对计数的开展对临床疾病的诊断、治疗等有重要意义。

3.2. 从相对定量到绝对定量分析

抗原或受体的表达,在以前多以平均荧光强度(MFI)或相对荧光强度(RFI)表示,因实验室流式细胞仪型号及仪器状态的不同,使得荧光值缺乏可比性,虽然流式细胞仪有极高的荧光灵敏度,但却无法精准

应用此类信息。随着定量流式细胞术的发展,其定量分析原理大致可分为两种:定量抗体微球法和定量荧光素分子微球法。单细胞的抗原或受体定量是流式细胞分析的重要进展,为细胞生物学、分子生物学、生物化学及免疫学等研究提供了更精确的方法。

3.3. 从细胞膜成分到细胞内成分分析

随着近年来细胞内成分检测技术的不断完善,细胞内成分检测已成为流式细胞分析的又一个热点[16]。细胞内成分分析能反映某些细胞的系列特征和功能变化。例如,急性髓系白血病性原始细胞胞浆中检测到髓过氧化物酶(MPO)是最为准确的系列标志[17]。急性B淋巴细胞白血病性原始细胞胞浆中检测到CD79a是最为特异的系列标志[18]。CD69、HLA-DR在结直肠癌患者中低表达,检测二者表达有助于病情判断,其术后逐渐升高可进一步指导医生判断病情、调整用药[19]。

3.4. 从单色到多色荧光分析

随着新型荧光色素分子的出现、荧光标记技术的进步和多激光激发等技术的进展,多色荧光分析得到迅速发展,流式细胞分析仪已从最初的单色迅速发展三色、四色甚至五色或六色。现十色及其以上的流式细胞仪已被临床实验室广泛应用,多色使得对细胞的识别和分选、细胞功能评价等更为精准。应用多色流式细胞仪可同时检测多个标记分子,减少试剂的重复使用、所需样本量以及分析时间,从而降低检测成本。多色荧光分析是流式细胞技术发展的必然趋势。

3.5. 从颗粒到液体中可溶成分的分析

从传统意义上讲,流式细胞技术主要用于分析细胞等颗粒成分,液体中的可溶性成分则不能分析。逐渐发展起来的流式微球分析(Cytometric Bead Assay, CBA)技术,其原理是将包被某种抗原或抗体不同大小的微球与液体中的待测成分反应形成抗原抗体复合物,再加入荧光标记的二抗,用流式细胞仪进行检测,微球上结合的待测抗原或抗体分子数量与其荧光强度呈线性关系,由此可对待测液体中与微球上包被抗原或抗体分子相对应的成分进行定性或定量分析。CBA具有流式细胞术的宽范围荧光检测特点,对样本需求量少,检测更快速、准确,可检测微量样本如血液、眼泪、血清、唾液等体液中的细胞因子及炎症因子的水平,检测细胞中信号传导通道蛋白、细胞凋亡相关蛋白,监控各种类型的抗体,进行肿瘤研究,检测药物对病人的治疗效果,进行SLE和新生儿脓血症等疾病的监控检测,进行药物研发,进行疫苗研究及总体免疫功能等分析[20][21][22]。

3.6. 流式分子表型分析

流式分子表型分析(Molecular Phenotyping)是指用流式细胞术检测细胞中特异性核酸序列或特异性基因异常。流式分子表型分析与免疫表型分析技术相结合,对于检测所选择细胞亚群的特异性核酸序列如癌基因病毒核酸等提供了一种有用的工具,具有广阔的应用前景[23]。

4. 小结

综上所述,流式细胞技术具有操作简便、分析快速、客观、精确等优点,近年来在技术上也取得了一定的进展,并在临床和科学研究中得到了广泛的应用。相信随着单抗技术及其他相关技术的不断发展,流式细胞术的应用领域将会越来越宽广。

参考文献

- [1] 方清,曾晓军,徐鹰.流式细胞仪的原理和临床中的应用[J].中国医疗前沿,2008,3(20):84-85.

- [2] 王文平, 杨进波. 流式细胞仪在白血病临床研究中的应用[J]. 临床检验, 2006, 3(26): 152-153.
- [3] 沈二霞. 流式细胞仪的原理和临床应用[J]. 现代医学仪器与应用, 2002, 20(1): 49-51.
- [4] 聂锋, 练正秋, 李玲. 血小板抗体检测分析与探讨[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(12): 2052-2054.
- [5] 王志荣, 张超群, 程仁力, 等. 心房颤动患者血小板活化与左心房血栓形成关系的研究[J]. 中国循环杂志, 2008, 23(4): 253-255.
- [6] 丛玉隆. 当代血液分析技术与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 184-194.
- [7] 徐永新, 张鹏, 张睿, 等. 流式细胞仪检测 CD55 和 CD59 表型对贫血性疾病诊断的意义[J]. 航空航天医学杂志, 2018, 29(8): 943-944.
- [8] 吴琼, 王小中. CD55 和 CD59 检测在阵发性睡眠性血红蛋白尿诊断中的意义[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(2): 146-148.
- [9] 吴翔, 王述文, 李闻文. CD55 和 CD59 检测在 PNH 诊断中的意义[J]. 实用预防医学, 2010, 17(7): 1436-1437.
- [10] 刘艳荣, 陈珊珊, 于弘. 流式细胞术计数 CD34 阳性细胞的标准化与质量控制[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(4): 302-306.
- [11] 王建中. 流式细胞术分析血淋巴细胞免疫表型方法学研究[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(4): 203-206.
- [12] 刘伟, 李代红, 王凯, 刘纯. 肝移植术后患者外周血 CD4+T 细胞内 ATP 与 T 细胞亚群联合检测对免疫功能的监测作用[J]. 山东医药, 2015, 55(18): 24-26.
- [13] 李海滨, 孙煦勇, 等. 肺移植术后 T 淋巴细胞亚群动态变化及意义[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(3): 391-394.
- [14] 丁韬, 李宁, 王璐, 等. 流式淋巴毒技术在预致敏肾移植中的应用初探[J]. 中华器官移植杂志, 2019, 40(12): 712-716.
- [15] 邢莹, 王建中, 普程伟, 等. 五色流式细胞术分类计数外周血白细胞的临床评价[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(30): 2392-2396.
- [16] 丁天凌, 朱萍, 吴蓓倩, 等. 流式细胞仪检测白细胞胞浆内抗原髓过氧化物酶的实验研究及其应用[J]. 医学检验, 2007, 22(6): 651-655.
- [17] 董晓燕, 李玉龙, 姜丽, 等. 髓过氧化物酶表达与急性髓系白血病基因突变和预后的相关性研究[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(1): 40-45.
- [18] 张敬宇, 杨琳, 潘峻, 等. 细胞分化抗原胞浆 CD79a 在急性白血病细胞上的表达[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(21): 1721-1723.
- [19] 王祥安, 吴琼, 虞黎明, 等. 结直肠癌围手术期患者外周血 T 淋巴细胞 CD69、HLA-DR 表达变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(13): 7-9.
- [20] Pak, C., Christopher, W.K., Lam, C.W.K., et al. (2004) Inflammatory Cytokine Profile in Children with SARS. *Pediatrics*, **113**, 7-14. <https://doi.org/10.1542/peds.113.1.e7>
- [21] Wong, C.K., Lam, C.W.K., Wu, A.K.L., et al. (2004) Plasma Inflammatory Cytokines and Chemokines in SARS. *Clinical & Experimental Immunology*, **136**, 95-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>
- [22] Jury, E.C., Isenberg, D.A., Mauri, C., et al. (2006) Atorvastatin Restores Lck Expression and Lipid Raft-Associated Signaling in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, **177**, 7416-7422. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7416>
- [23] 王晓蕾, 张乐玲, 等. 流式分子表型分析技术及其应用[J]. 国际儿科学杂志, 2009, 36(2): 165-167.