

流式细胞术在医学检验中的研究进展

陈丽

(广西百色市人民医院,右江民族医学院附属西南医院,广西 百色 533000)

E-mail:2160448771@qq.com)

摘 要: 流式细胞术(flow cytometry,FCM)是在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速的定量分析。它不仅测量速度快、准确度高、灵敏度高,而且还具有客观、直接和测量参数多的优点。目前,该技术已普遍应用于肿瘤学、血液学、免疫学、细胞遗传学、细胞生物学、生物化学等领域。本文就流式细胞术在医学检测中的应用作一综述。

关键词: 流式细胞术;医学检测;免疫学;肿瘤学;血液学

中图分类号: R446.113

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)03-0335-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.033

流式细胞术(flow cytometry,FCM)是一种在细胞分子水平上对单个细胞或其他微粒进行定量分析的检测手段。它既能检测上万个细胞,也可以从一个细胞中得到不同参数。自 20 世纪 70 年代第一台流式细胞仪由 BD 公司研制生产出并流向市场后,流式细胞仪就获得了广泛的应用。它的工作原理:经荧光标记过的分散在液体中的细胞或其他生物微粒逐个通过样品池时,由荧光检测器捕获荧光信号,之后将荧光信号转换为电信号并经计算机处理形成图像。悬浮在液体中的微粒可以是体液、血液、细胞培养液以及新鲜实体瘤的单细胞悬浮液。可以说凡细胞内能够进行荧光标记的组分都可以用流式细胞仪进行检测。随着我国医疗卫生行业的迅猛发展,流式细胞仪已在医学检测中得到了广泛的应用,俨然是医学检测中必不可少的检测工具之一。

1 流式细胞仪在医学检测中的应用

1.1 流式细胞仪在肿瘤学中的应用 肿瘤学是流式细胞仪在临床中最早应用的一个领域。众所周知,癌细胞与正常体细胞最明显的区别就是细胞 DNA 含量发生改变或形态异常。而流式细胞仪的检测对象就是 DNA 等微粒。有学者用流式细胞仪诊断早期癌症,发现准确率可以达到 90%^[1]。目前,流式细胞仪用于肿瘤学中主要是根据肿瘤细胞染色体的变化来检测肿瘤细胞增殖周期、癌基因表达产物、细胞表面标记等,以达到早期诊断、指导化疗以及评估预后的目的^[2-3]。胡旭等^[4]借助流式细胞仪检测尿脱落细胞 DNA 的变化,发现尿脱落细胞 DNA 的变化可用于诊断筛查膀胱癌,且其敏感性为 73.5%,特异性为 86.2%。段瑞等^[5]通过流式细胞仪检测涎腺肿瘤 DNA 倍体变化,发现检出 DNA 异倍体是恶性肿瘤特异性指标之一;而同时测定的 DNA 指数和肿瘤增殖比例则分别代表肿瘤细胞恶性程度及预后指标。此外部分研究学者通

过流式细胞仪发现正常人体内的 CD35 表型与恶性肿瘤患者体内的有明显特异性区别,这说明精确定量测定 CD35 可以用于明确诊断肿瘤,观察疗效^[6-7]。

1.2 流式细胞仪在免疫学中的应用 流式细胞仪在免疫学中的广泛应用与推广,主要是通过采用不同荧光探针和单克隆抗体,利用免疫反应进行细胞及其亚群分析、细胞免疫分型从而达到诊断疾病的目的^[8]。具体用于免疫学的不同特征参数有细胞大小、细胞抗原的表达、细胞内核酸数量、DNA 倍体等参数^[9]。且与普通免疫学方法相比它的定量更为准确。童骁等^[10]通过流式细胞术采用两种不同荧光探针结合的方式建立了一种进行马传染性贫血症病毒(Equine infectious anemia virus,EIAV)抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes,CTL)反应检测的新方法;之后将之用于检测 CTL 反应成熟过程,达到了预期的实验目的且可用于研究 EIAV 减毒疫苗的免疫学机制研究中。与常用的 Cr⁵¹ 染料相比,不仅降低了本底释放,避免检测人员受到放射线威胁,且灵敏度更高。该方法不仅是一种新型研究 EIAV 减毒疫苗免疫机制的技术手段,也为其他病毒的免疫学研究提供了参考。王珊等^[11]采用多种不同荧光探针进行标记,利用流式细胞仪检测分别经 SEB、COA 活化的 C57BL/J 小鼠脾细胞中的 T 细胞亚群和 NKT 细胞亚群,通过对比不同的荧光信号,结果发现 SEB 活化主要是 NKT 细胞,而 COA 活化则多是 T 淋巴细胞。证实了 NKT 细胞由不同亚群或亚型组成的观点。同时也为深入研究 NKT 细胞结构和功能提供了一种新的检测手段。

1.3 流式细胞仪在血液学中的应用 流式细胞仪在各种血液病的诊断、治疗和预后判断等方面起到非常重要的作用,主要方法是通过检测分析外周血、表面抗原及 DNA 来实现的,所以说流式细胞仪在血液学中

用途非常广泛,如用于血小板计(记)数、血小板活化分析、血小板自身抗体测定、血小板膜表面糖蛋白分析^[12]。还可以用于红细胞血型抗原分析、网织红细胞分析等^[13]。周英等^[14]运用临床中常用的已建立的间接标记法,利用流式细胞仪追踪检测 O 型孕妇血液中胎儿微量 A(B)红细胞,结果表明较早进行产前诊断能有效帮助预防和诊断新生儿溶血病。Dziegiel 等^[15]利用流式细胞仪检测胎母出血(fetomaternal hemorrhage, FMH),发现准确率达到万分之一。韩悦等^[16]利用流式细胞仪测定特发性血小板减少性紫癜(ITP)患者血小板膜表面及血浆中的抗血小板抗体,结果发现 20 例数据中流式细胞仪测得 14 例(70%)ITP 患者血小板膜自身抗体(PAIGG)阳性,9 例(45%)血浆抗血小板抗体阳性,而传统 ELISA 法则是 12 例(60%)ITP 患者 PAIGG 阳性,7 例(35%)血浆抗血小板抗体阳性。两种方法的实验结果吻合率高,且流式细胞仪方法阳性率更高、敏感性更强。另外,流式细胞仪还可以通过检测骨髓细胞来实现血液学的研究,如由于流式细胞仪具有快速、准确、精确度高的优点,用其进行白血病免疫分型成为临床诊断白血病的重要手段之一^[17-18]。同样采用多种荧光探针,吴韶清等^[19]利用流式细胞仪检测儿童急性白血病免疫分型,结果证实流式细胞术免疫分型和 FAB 分型的符合率达到 89.19%。Maynadie 等^[20]则利用流式细胞仪证实了骨髓增生异常综合征免疫表型,对骨髓细胞形态学分型检查有重要参考价值。

1.4 流式细胞仪在临床微生物检测中的应用 随着流式细胞术的不断深入研究,其在医学微生物检测中也得到了广泛应用,主要用途体现在细菌药敏性检测,真菌检测及衣原体、支原体中的检测,病毒检测等方面^[21]。众所周知,抗生素是治疗感染性疾病的常用药物,可以说是 20 世纪医学史上最伟大的发明,它使人类的平均寿命至少延长了十年。但抗生素的广泛应用甚至滥用造福人类的同时也造成了 21 世纪耐药性微生物不断增多。因此迫切需要一种快速高效的检测细菌耐药性的医学检测手段。郑国强等^[22]通过流式细胞仪对高低两组不同耐药倍数的阿霉素耐药细胞系(S-180R 和 BGC-823/DOX)进行耐药特性检测,结果显示流式细胞仪在高倍数耐药细胞系 S-180R 中,与亲代细胞耐药性有明显差异性,这表明可以进行逆转耐药实验;在低倍数耐药细胞系 BGC-823/DOX 中则定量分辨出耐药细胞群体与亲代细胞耐药性的细微差异,这说明该方法可用于临床肿瘤耐药分析。van der Waaij 等^[23]通过加入荧光标记的抗人 IgA 抗体以结合 IgA 包被的细菌,利用流式细胞仪检测粪便中的厌氧菌,对检测细菌的准确性有明显提高。

1.5 流式细胞仪在细胞凋亡多药耐药基因中的应用

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,它在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用。研究证明细胞凋亡是多基因严格控制的过程。而凋亡过程若发生紊乱则可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系。如肿瘤、自身免疫性疾病等。一些与膜通透性改变及凋亡有关的蛋白在细胞膜表面有特定性表达,而流式细胞术可以通过单克隆抗体检测表达这些蛋白的细胞,从而确定细胞的凋亡情况,进而更深入地了解凋亡的调节机制。于亚平^[24]报道中谈到流式细胞仪对细胞凋亡检测中体现出能区别凋亡与坏死。

1.6 流式细胞仪在其他领域中的应用 流式细胞仪在器官移植中也占有重要地位,可被用来判断供者与受者之间是否合适,用来鉴别和定型同种异体反应抗体,检测移植后血液或移植内免疫成分的化疗,以预防移植后免疫排斥反应。还可以用于分析脑脊液中 T 淋巴细胞及其亚群进行神经系统疾病的诊断与治疗。此外也可以用于检测冠心病^[25]、精液等。

2 展望

随着当今各种科学技术的快速发展,流式细胞仪的应用前景更为广阔。目前的研究重点主要有:定量流式细胞分析,是指对每一个细胞或微粒上的抗原或受体进行准确定量;细胞微球分析,是指以编码微球为基础的流式细胞术,它最大的不同就是承担数据采集和分析的受体不再是细胞而是微球上所携带的信号。此外还有流式多色荧光分析,与液相芯片技术的结合等。相信随着激光光学、现代物理、计算机等技术领域的发展,流式细胞仪将在医学检测领域得到更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Karnes RJ, Fernandez CA, Shuber AP. A noninvasive multianalyte urine-based diagnostic assay for urothelial cancer of the bladder in the evaluation of hematuria [J]. Mayo Clinic Proceedings, 2012, 87(9): 835-842.
- [2] 朱可建. DNA 流式细胞仪在肿瘤学中的应用[J]. 实用肿瘤杂志, 1994, 9(3): 187-189.
- [3] Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data[J]. Urologic Oncology, 2013, 31(8): 1744-1750.
- [4] 胡旭, 刘红霞. 流式细胞术分析尿脱落细胞 DNA 对膀胱肿瘤的诊断价值研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(21): 2798-2799.
- [5] 段瑞, 李永生, 赵斌. 流式细胞术在涎腺肿瘤诊断及预后中的应用[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(7): 41-43.

[6] Albers AE, Schaefer C, Visus C, et al. Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer[J]. *Head Neck*, 2009, 31(6): 773-781.

[7] 张洁, 张小艳, 王岐山. 流式细胞术检测 CD35 表型对恶性肿瘤诊断的意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(5): 506-507.

[8] 高维和. 对于流式细胞术在临床检验中的应用研究[J]. *中国卫生产业*, 2014, 11(28): 162-163.

[9] Tárnok A, Hambach J, Chen R, et al. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(6 Pt1): 1000-1002.

[10] 童骁, 沈毅, 梁华, 等. 利用流式细胞术测定 CTL 活性方法在 EIAV 免疫学中的应用[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(6): 642-646.

[11] 王珊, 廖洁, 于力方, 等. 流式细胞术快速检测 T 细胞亚群和 NKT 细胞亚群的免疫荧光变化[J]. *现代科学仪器*, 2010, 6(3): 95-97.

[12] 陈雪, 吕文彬, 李健, 等. 流式细胞仪在输血医学中的应用[J]. *重庆医学*, 2007, 36(21): 2162-2164.

[13] 张学艳, 王军. 流式细胞仪在血液学检测中的应用[J]. *中国医学装备*, 2008, 5(5): 8-11.

[14] 周英, 吕文彬, 李健, 等. 流式细胞术检测 O 型孕妇血液中胎儿微量 A(B)红细胞与新生儿溶血病发病率的相关性研究[J]. *四川医学*, 2012, 33(1): 12-14.

[15] Dziegiel MH, Nielsen LK, Berkowicz A. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry [J]. *Current Opinion in Hematology*, 2006, 13(6): 490-495.

[16] 韩悦, 王兆钺, 李健, 等. 血小板自身抗体的流式细胞仪检测与意义[J]. *临床血液学杂志*, 2000, 13(5): 222-223.

[17] 孔令环, 韩梅, 鲍彦娜, 等. 流式细胞术对急性白血病免疫分型的临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(10): 1570-1573.

[18] De Smet D, Trullemans F, Jochmans K, et al. Diagnostic potential of CD34⁺ cell antigen expression in myelodysplastic syndromes[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2012, 138(5): 732-743.

[19] 吴韶清, 吴洁莹, 廖灿, 等. 185 例儿童急性白血病流式细胞术免疫分型研究[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(16): 3087-3091.

[20] Maynadie M, Picard F, Husson B, et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2002, 100(7): 2349-2356.

[21] 张艳. 流式细胞术在微生物检测中的应用[J]. *医疗装备*, 2011, 34(5): 33-35.

[22] 郑国强, 刘叙仪, 韩复生, 等. 阿霉素耐药性研究与流式细胞分析[J]. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(1): 28-30.

[23] van der Waaij LA, Mesander G, Limburg PC, et al. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces [J]. *Blood*, 1994, 16(3): 270-279.

[24] 于亚平. 流式细胞仪免疫分型在 B 细胞淋巴瘤诊断中的应用[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(3): 579-583.

[25] 令狐颖, 黄山, 郑金鼎, 等. 用流式细胞术检测冠心病患者血清 P 选择素的方法与应用评价[J]. *临床检测杂志*, 2011, 29(1): 43-44.

收稿日期: 2016-01-29; 修回日期: 2016-03-07

(上接第 331 页)

[7] Ananworanich J, Prasitsuebsai W, Kerr SJ, et al. Cervical cytological abnormalities and HPV infection in perinatally HIV-infected adolescents[J]. *J Virus Erad*, 2015, 1(1): 30-37.

[8] 李灿宇, 张自森, 刘继红. 宫颈癌中 p53 基因多态性的检测及其临床意义[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(36): 9-11.

[9] 陈俊, 董海艳, 朱珊丽, 等. 温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析[J]. *温州医学院学报*, 2009, 39(6): 538-540, 545.

[10] 曾莉, 俞守义, 胡朝晖, 等. 广东地区宫颈病变 HPV18 型 L1 基因多态性分析[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 28(12): 2210-2212.

[11] Pyne MT, Hamula CL, Tardif K, et al. High-risk HPV detection and genotyping by APTIMA HPV using cervical samples[J]. *J Virol Methods*, 2015, 221: 95-99.

[12] William W, Salama AS, Ayman AH. Inhibition of growth of cervical cancer cells using a dominant negative estrogen receptor gene[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 276-280.

[13] Coglian V, Bann R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papilloma viruses[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 6(4): 204.

[14] 王雪卿, 孙丽芳, 梁向华, 等. 高危型人乳头状瘤病毒的感染状态及分型与宫颈病变发生的相关性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(8): 633-638.

[15] Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(1): e1.

[16] Apter D, Wheeler CM, Paavonen J, et al. Efficacy of human papillomavirus 16 and 18 (HPV-16/18) AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and pre-cancer in young women: final event-driven analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(4): 361-373.

收稿日期: 2016-04-30; 修回日期: 2016-05-23