

流式细胞仪倍体分析的原理及其应用进展

孟芝君 综述, 武文明 审校(山西省人民医院检验科, 太原 030012)

【关键词】 流式细胞术; DNA; 倍体

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 18. 038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2249-03

20 世纪 80 年代以来, 随着流式细胞仪和荧光探针标记技术的不断发展, 流式细胞术在现代科学研究及科学实践中的作用越来越重要。流式细胞分析即流式细胞术, 是应用流式细胞仪进行分析、分选的技术, 可以对处于液流中的各种荧光标记的微粒进行多参数、快速、准确的定性、定量测定。从流式细胞术的发明、发展直到今天在各个领域应用的拓展, 每一步都是诸如电子技术、流体力学、计算机科学、激光技术、生物学、生物技术、高等数学、临床医学、分子生物学、有机化学和生物物理学等学科知识综合运用的结晶。现代流式细胞术更是由于其结合单克隆抗体技术、定量细胞化学技术和定量荧光细胞化学, 使其在生物学、临床医学、药理学、材料学等众多研究领域中的应用有更加突飞猛进的发展。在生物科学研究中, 可以使用流式细胞术测定细胞周期、DNA 含量, 检测细胞凋亡, 进行倍性、染色体核型和流式分子表型分析等^[1-4]。在医学研究及临床实践的应用中, 流式细胞术也发挥了重要的作用, 例如肿瘤诊断和分型、血液病的诊断和治疗以及免疫相关疾病分析等方面的应用^[5-8]。目前国内使用的流式细胞仪主要是美国 Becton Dickinson(简称 BD) 和 Beckman Coulter(简称 BC) 两家公司生产的产品, 二者原理基本一致, 主要由液流系统、光学检测系统和信号处理系统组成。本文根据 BD 公司生产的流式细胞仪 FACS Calibur 介绍 DNA 倍体分析的原理。

1 流式细胞仪倍体分析原理

1.1 基本原理 流式细胞仪的激发光源为 15 mW 氩离子气体激光器, BD 公司的 FACS Calibur 可增配小功率半导体激光器(波长 635 nm), 从而拓宽了其染料的应用范围。经荧光素染色的细胞核, 在一定压力下逐个通过喷嘴, 进入流式照射室。经过激光照射, 细胞核发射出散射光。散射光分前向散射光(forward scatter, FSC) 和侧向散射光(side scatter, SSC)。FSC 反映粒子的大小或体积, SSC 反映粒子的表面粗糙度和内部颗粒度。同时, 细胞核所带的荧光素被激发, 发射出荧光, 根据荧光的发射波长, 选择相应的荧光通道(FL1 525 nm, FL2 575 nm, FL3 620 nm, FL4 660 nm) 进行检测。最后, 光信号再转化成电信号, 经数据处理输入测定装置相连的计算机分析软件可对荧光强度进行分析。通过流式细胞分析仪对大量的处于分裂间期的细胞 DNA 含量进行检测, 然后经与仪器连接的计算机自动统计分析, 最后绘制出 DNA 含量(倍性) 的分布曲线图。

1.2 仪器分析原理^[9-11]

1.2.1 液流系统 将经特异性荧光染料染色的待测细胞制成单细胞悬液, 加入样品管中, 在气体压力推动下进入流动室, 不含细胞的磷酸缓冲液在高压下从鞘液管喷出, 鞘液管入口方向与待测样品流呈一定角度, 这样鞘液就能够包绕着样品高速流动, 组成一个圆形的流束, 待测细胞在鞘液的包被下单行排列, 依次通过检测区域。这种同轴流动的设计, 使得样品流和鞘液

流形成的流束始终保持一种分层鞘流的状态。利用样品流和鞘流的气压差的层流原理, 使细胞依次排列成单行, 每个细胞以均等的时间依次通过测量区, 被荧光染料染色的细胞受到强烈的激光照射后发出荧光, 同时产生散射光。细胞发出的荧光信号和散射光信号同时被光电倍增管接收。

1.2.2 光学检测系统 流式细胞仪通常以激光作为发光源。经过聚焦整形后的光束, 垂直照射在样品流上, 被荧光染料染色的细胞在激光束的照射下产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和 90° 方向的光电倍增管接收。光散射信号在前向小角度进行检测, 这种信号基本上反映了细胞体积的大小; 荧光信号的接收方向与激光束垂直, 经过一系列双色性反射镜和带通滤光片的分离, 形成多个不同波长的荧光信号。光电倍增管接收的信号被积分放大反转换为电子信号输入电子信息接收器, 传输给与仪器相连的计算机。

1.2.3 信号处理系统 这些荧光信号的强度代表了所测细胞核内 DNA 的含量及倍体, 经光电倍增管接收后可转换为电信号, 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。计算机把所测量到的各种信号进行处理, 将分析结果显示在计算机屏幕上, 也可以打印出来, 还可以数据文件的形式存储在硬盘上, 以备日后查询或分析。

1.3 DNA 倍体分析的原理 用流式细胞仪分析大量细胞的细胞周期和 DNA 倍体已经成为一种日益重要的肿瘤研究方法, 并广泛应用于肿瘤基础和临床研究中, 为肿瘤的诊断、疗效评价和预后预测提供了重要的参考指标。

健康人静止期细胞有 46 条染色体, 相当于每个细胞核 7.10~12.00 pg DNA, 称之为二倍体细胞, 而正常的增殖细胞其 DNA 含量则不同。在细胞周期(G₀、G₁、S、G₂、M) 的各个阶段, DNA 的含量随各阶段呈现出周期性的变化: 在 G₁ 期, 细胞开始 RNA 和蛋白质的合成, 但 DNA 含量仍保持二倍体; 进入 S 期后, DNA 开始合成, 这时细胞核内 DNA 的含量介于 G₁ 和 G₂ 期之间; 当 DNA 复制结束成为四倍体时, 细胞进入 G₂ 期, G₂ 期细胞继续合成 RNA 和蛋白质, 直到进入 M 期。因此, 单纯从 DNA 含量无法区分 G₂ 期和 M 期。一旦有丝分裂发生, 细胞分裂成两个子细胞, 这两个子细胞或者进入下一个细胞周期, 或者进入静止期(G₀ 期), 而 G₀ 期从 DNA 含量上同样无法与 G₁ 期区分。因此, 整个复制周期可以描述为 G₀/G₁、S、G₂/M 期。通过流式细胞仪进行分析, 可以得到细胞周期各个阶段 DNA 的分布状态, 计算出 G₀/G₁%、S%、G₂/M%, 了解细胞的增殖能力。在肿瘤病理学研究中, 通常以 S 期细胞比率作为判断肿瘤增殖状态的指标。正常细胞具有较恒定的 DNA 含量, 而细胞癌变过程中结构和(或)染色体的异常是很常见的, 这种变化在流式分析中以 DNA 指数(DI) 的形式表现出来, 这一指数对于肿瘤的早期诊断, 交界瘤、间叶组织肿瘤的良恶性判断提供了重要的辅助指标。

2 流式细胞术 DNA 倍体分析的应用

2.1 在胸腔积液良恶性判断中的应用 吕程等^[12]的研究表明, DNA 倍体分析对判断良恶性的胸腔积液性质, 其准确率达到 87.50%, 与钟征翔等^[13]的报道相符。表明流式细胞 DNA 倍体分析在良恶性胸腔积液的鉴别中可作为一项重要的参考指标, 联合细胞学检查可提高诊断水平, 同时对判断肿瘤的生物行为有一定意义。

2.2 在宫颈病变诊断中的应用 李建业和朱淑霞^[14]从接受宫颈癌普查的妇女中随机选择 290 例, 用宫颈刷取材, 液基薄层制片, 剩余标本进行流式细胞学检测。受检者液基薄层细胞学检测结果按照 Bethesda 系统 (TBS) 分类标准分为四组: 非典型鳞状上皮增生 (ASCUS)、低度宫颈上皮内瘤变 (LSIL)、高度宫颈上皮内瘤变 (HSIL)、鳞状上皮癌 (SCC)。实验发现本组资料中, LSIL、HSIL、SCC 三组的 DI 均超过了正常范围, 从 ASCUS 组到 SCC 组, 表明随病理分级增高而增高, 细胞的增殖也越来越旺盛。另外有报道, ASCUS 与 LSIL 中出现 DNA 倍体异常细胞, 提示有进一步发展的趋势和高危型 HPV 感染的可能^[15]。在 HSIL 组织中如有 DNA 倍体异常细胞, 最终会发展成浸润性宫颈癌^[16]。

2.3 在耳鼻喉肿瘤诊断中的应用 陈乾美和黄春芬^[17]的研究结果表明, 在确诊的 56 例耳鼻咽喉-头颈部肿瘤患者中, 47 例 DNA 倍体异常, 9 例表现为正常的二倍体, 这基本与病理检查结果相吻合。另外, 有研究发现, 流式细胞术能在出现肉眼可见膀胱肿瘤之前 12~18 个月时测出 DNA 倍体的异常^[18]。因此, 流式细胞术在耳鼻喉肿瘤的早期诊断中有重要意义。

2.4 在判别乳腺癌的恶性程度及预后中的应用 乳腺癌的发生和发展过程首先是细胞核内基因改变、基因小片段丢失或增加, 这时 DNA 染色体的倍数并未发生改变, 仍为二倍体。当肿瘤进一步发展, 细胞核有丝分裂增强, DNA 可出现大片段的变化而引起染色体数量改变, 最终出现异倍体细胞, 故乳腺癌发生发展过程为正常、基因改变、染色体二倍体肿瘤细胞、染色体异倍体肿瘤细胞。因此, 对肿瘤细胞内的 DNA 含量进行测定, 可以判断肿瘤的进展。汪青林和周厚纯^[19]的研究表明, 乳腺癌发生、发展过程中细胞形态的改变与 DNA 倍体异常密切相关。乳腺癌早期, 细胞核为 2 倍体 (DNA 定量为 2C), 核面积略大; 而乳腺癌晚期可出现 5C, 甚至 9C 异倍体细胞, 核面积明显增大。因此 DNA 倍体的改变可反映乳腺癌发展的不同时期。

综上所述, 流式细胞术在临床实验诊断中的应用还比较局限, 需依据更多的临床实验数据并结合患者的病史、临床表现和其他检查来诊治疾病。流式细胞术在 DNA 倍体分析研究中的应用, 与利用染色体计数进行倍体鉴定相比, 其样品处理简单, 测量精确、快速、准确, 重复性好, 准备好的细胞核样品在数分钟内即可完成测定和分析, 所以特别适合于样品较多的倍体检测分析。随着更多深入的研究, 这项技术将会越来越完善, 而找到并使用适宜的内参标准, 将会使检测结果更准确。总之, 流式细胞术在 DNA 倍体分析研究中的应用价值将越来越大。

参考文献

[1] Ferrari L, DE Angelis E, Martelli P. Swine virus-specific cytotoxic cells producing IFN gamma under different conditions of virus antigenic stimulation [J]. Vet Res Com-

mun, 2010, 34 (Suppl): S63-S67.

- [2] Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis [J]. Parasitology research, 2009, 104(3): 611-622.
- [3] Kizildag S, Ates H, Kizildag S. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21 [J]. Ann Hematol, 2010, 89(1): 1-7.
- [4] Silva F, Plourenco O, Pina-Vaz C, et al. The use of DRAQ5 to monitor intracellular DNA in escherichia coli by flow cytometry [J]. J Fluoresc, 2010, 20(4): 907-914.
- [5] Wang JW, Liu Y, Tian HM, et al. Effect of survivin-sirna on drug sensitivity of osteosarcoma cell line MG-63 [J]. Chinese J Cancer Res, 2010, 22(1): 68-72.
- [6] Fan YY, Huang ZT, Li L, et al. Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection [J]. Arch Virol, 2009, 154(7): 1093-1099.
- [7] Thomas D, Perpoint T, Dauwalder O, et al. In vivo and in vitro detection of a superantigenic toxin Vbeta signature in two forms of streptococcal toxic shock syndrome [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(6): 671-676.
- [8] Verkaik NJ, Boelens HA, De Vogel CP, et al. Heterogeneity of the humoral immune response following Staphylococcus aureus bacteremia [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(5): 509-518.
- [9] 何克健. 流式细胞技术与流式细胞仪 [J]. 医疗装备, 2000, 13(5): 6-8.
- [10] Michael B, Carl W. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology [J]. Clin Chem, 2000, 46: (8B): 1221-1229.
- [11] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用 [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [12] 吕程, 丁艳玲, 刘宇, 等. 胸腔积液 DNA 倍体分析的临床应用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2009, 30(1): 33-34.
- [13] 钟征翔, 丁韧烨, 孙建良. 胆胰液脱落细胞 DNA 倍体分析在诊断胆道和胰腺良恶性疾病中的价值 [J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(8): 511-513.
- [14] 李建业, 朱淑霞. DNA 倍体分析在宫颈病变诊断中的价值 [J]. 山东医药, 2007, 47(24): 10-11.
- [15] 孙小蓉, 李玉兰, 车东媛, 等. 用细胞 DNA 定量分析方法进行宫颈痛普查的临床研究 [J]. 诊断病理学杂志, 2005, 12(1): 12-16.
- [16] Hanselaar AG, Bocking A, Gundlach H, et al. Summary statements on quantitative cytochemistry (DNA and molecular biology) [J]. Task Force Anal Cell Pathol, 2001, 45(4): 499-501.
- [17] 陈乾美, 黄春芬. 流式细胞术 DNA 倍体分析在耳鼻咽喉肿瘤快速诊断中的意义. 贵阳医学院学报, 2005, 30(5): 401-402.
- [18] 左连富. 流式细胞术与生物医学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术

出版社,1996:207.

(4):542-544.

[19] 汪青林,周厚纶. DNA 倍体分析系统在乳腺包块针吸细胞学诊断中的应用[J]. 华中科技大学学报:医学版,2006,35

(收稿日期:2011-06-20)

幽门螺杆菌感染与临床相关疾病的研究进展

李 颖 综述,顾国龙 审校(广西中医学院附属瑞康医院检验科,南宁 530011)

【关键词】 螺杆菌,幽门; 螺杆菌感染; 胃炎; 消化性溃疡; 胃肿瘤; 淋巴瘤,B 细胞,边缘区; 贫血,缺铁性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)18-2251-02

幽门螺杆菌(HP)是世界上感染率最高的细菌之一,由澳大利亚学者 Warren 和他的同事 Marshall 于 1982 年从慢性胃炎和消化性溃疡患者胃黏膜活体组织中培养出来,两人因此获得 2005 年诺贝尔生理学和医学奖。HP 感染呈全球分布,几乎感染了世界范围内一半以上的人口。中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组于 2001~2004 年在全国进行了一项涉及全国 19 个省、10 个城市、39 个中心的大规模的 HP 流行病学调查显示,其在我国的感染率为 40%~90%,平均为 59%;现症感染率为 42%~64%,平均为 55%。HP 的传播途径有粪-口途径、口-口途径、密切生活接触及动物源性等。HP 的致病因素主要有尿素酶、鞭毛、黏附素、超氧化物歧化酶、活性氧、细胞因子和细胞毒素等。HP 与多种临床疾病密切相关,本文就目前 HP 感染与临床相关疾病的研究进展作一综述。

1 HP 感染与慢性胃炎

目前研究认为 HP 感染是慢性胃炎最常见和重要的病因^[1],慢性胃炎患者 HP 检出率可达 70%以上,活动性慢性胃炎患者 HP 的检出率更高,一般在 90%以上。HP 相关性胃炎的病理特征包括:(1)胃黏膜上皮损伤,HP 感染可致胃黏液耗损,上皮细胞变性、渗出及细胞脱落。少数细菌可穿入细胞内,致细胞的黏液颗粒减少,空泡变性,细胞表面的微绒毛变短、减少等病理改变^[2]。(2)炎症细胞浸润,炎症细胞浸润包括多形核细胞、淋巴细胞、浆细胞和一些嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润。胃黏膜上皮及固有层有中性粒细胞浸润,于胃小凹处形成“腺窝脓肿”,淋巴细胞、浆细胞以及一些嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润是慢性胃炎的特征^[3]。(3)腺体萎缩,HP 感染可致胃黏膜损害,反复的腺体损伤可使腺体消失,引起黏膜萎缩,导致黏膜层变薄;随着 HP 感染时间的延长,腺体萎缩的发生率及严重程度均增加。(4)肠化生,肠化生是胃黏膜对持续性感染的一种适应性现象,HP 感染者肠化生的发生率较无 HP 感染者高。

2 HP 感染与消化性溃疡

有研究表明,十二指肠溃疡患者 90%左右 HP 阳性^[4]。HP 凭借毒力因子的作用,在胃黏膜定植,诱发局部炎症和免疫反应,损害局部黏膜的防御/修复机制;另一方面 HP 感染可增加胃泌素和胃酸的分泌,增强侵袭因素,这两方面的作用造成胃十二指肠黏膜损害和溃疡形成^[5]。

3 HP 感染与胃癌

流行病学研究表明,胃癌的发生与 HP 的感染相关^[6]。(1)HP 感染率与胃癌发病率呈明显正相关,HP 感染者其胃癌风险值增加。(2)单纯 HP 感染可以在蒙古沙土鼠中诱发出胃癌。(3)HP 感染与胃癌的发生、人群的经济状况、社会地位及卫生条件有关。(4)从胃癌发生的部位来看,HP 主要定居于胃窦,与胃癌的好发部位是一致的。(5)HP 感染与胃癌的发

生随着年龄的增长而增加。

世界卫生组织已将 HP 感染列入 I 类致癌因子。HP 感染与胃癌发生的可能机制是,其分泌的毒素导致胃黏膜病变,自活动性浅表性炎症发展为萎缩性、肠化生与不典型增生,在这种基础上易发生癌变;HP 还是一种硝酸盐还原剂,具有催化亚硝胺而起致癌作用^[7]。

4 HP 感染与胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤

HP 感染之后,胃黏膜组织中有淋巴滤泡形成,进而 MALT 在胃内聚积。组织病理学特点为:在围绕反应性非肿瘤淋巴滤泡的边缘带中存在淋巴瘤样组织浸润,并侵入胃腺,形成特征性的淋巴上皮损伤。证据表明 HP 与 MALT 淋巴瘤存在明显的相关性,HP 感染为胃 MALT 淋巴瘤的重要病因,流行病学资料表明,胃 MALT 淋巴瘤患者中 HP 感染率高达 90%以上^[8]。

5 HP 感染与功能性消化不良(FD)

HP 感染在 FD 的病因及发病机制中的作用仍有待病理生理、流行病学以及循证医学方面的进一步研究加以证实。但近年来大量关于 FD 与 HP 感染的研究发现,HP 是 FD 发病的相关因素之一。有研究显示 FD 患者中 20%~60% HP 阳性^[9]。有活动性 HP 感染的 FD 患者胃黏膜组织学检查几乎均有不同程度的慢性活动性胃炎,根除 HP 治疗可使绝大多数 FD 患者的胃黏膜炎症消退,并降低胃癌前期病变发展成胃癌的危险性。《第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题——庐山共识》中将 HP 阳性的慢性胃炎伴消化不良症状者列为支持根除 HP 治疗。

6 HP 感染与不明原因的缺铁性贫血(IDA)

HP 导致的 IDA 发病机制仍不明确,一般认为与以下原因有关:(1)HP 感染引起的慢性胃炎,能降低胃液中抗坏血酸的浓度,减少肠道铁吸收,最终导致缺铁性贫血的发生;(2)HP 感染使胃和十二指肠黏膜上皮细胞渗透性增高,引起铁和含铁蛋白从胃和十二指肠黏膜中流失。(3)一氧化氮合酶活性增强,抑制血红蛋白的合成。(4)HP 的生长繁殖消耗铁,使机体对铁的需求增加^[10]。

7 HP 感染与特发性血小板减少性紫癜(ITP)

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是儿童最常见出血性疾病,发病前常有病毒感染史。近年来国内外均有文献报道 HP 感染与 ITP 有关^[11]。研究表明,根除 HP 后部分 ITP 患者的血小板计数明显增多,抗血小板自身抗体明显减少或消失。提示 HP 是部分 ITP 的致病因子之一。

8 HP 感染与心脑血管疾病

近年来,已有研究提出 HP 与冠心病的发生与发展有关,可能是导致动脉粥样硬化和冠心病的独立危险因素。1994 年,Mendall 等首次提出 HP 感染与冠心病的发病可能密切相