

标本保存时间及温度对流式细胞仪检测非健康人外周血淋巴细胞亚群影响研究*

方 芳, 陈柯霖, 刘淑静, 周 金, 张国军[△], 康熙雄(首都医科大学附属北京天坛医院检验科/北京市免疫试剂临床工程技术研究中心 100050)

【摘要】 目的 评价样本保存时间及温度对流式细胞仪检测非健康人外周血淋巴细胞亚群的影响。**方法** 第 1 组, 随机选取患者 27 例, 分别在采血后 6 h 内(A 组)、在 4 °C 保存 72 h(B 组)和 120 h(C 组)后进行检测。第 2 组, 随机选取患者 18 例, 分别在采血后 6 h 内检测(D 组); 在采血后 6 h 内预处理, 4 °C 保存 24 h 后检测(E 组); 在室温 25 °C 保存 36 h 后预处理, 随后检测(F 组)。**结果** 第 1 组, 与 A 组相比, B 组和 C 组的 CD3⁺ 细胞、CD3⁺ CD4⁺ 细胞明显降低, 而 CD19⁺ 细胞及 CD16⁺ CD56⁺ 细胞明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); B 组的 CD3⁺ CD8⁺ 细胞明显升高($P < 0.05$)。第 2 组, D 组、E 组和 F 组之间结果比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在标本采集后 36 h 内对非健康人的样本进行淋巴细胞亚群检测, 结果稳定。

【关键词】 流式细胞术; 淋巴细胞亚群; 储存温度; 储存时间

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1164-03

The influence of storage time and temperature on flow cytometry analysis of patients' peripheral blood lymphocyte subsets* FANG Fang, CHEN Ke-lin, LIU Shu-jing, ZHOU Jin, ZHANG Guo-jun[△], KANG Xi-xiong (Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University/Beijing Engineering Research Center of Immunological Reagents Clinical Research, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of sample storage time and temperature on the analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in non-healthy human by flow cytometry. **Methods** Group one involved 27 patients with multiple diseases. Whole blood was collected for flow cytometry analysis within 6 h (group A), at 72 h (group B) and 120 h (group C). Group two involved 18 patients with multiple diseases. Samples were tested in 3 groups: group D, the samples were processed and tested within 6 hours since it collected; group E, samples were processed within 6 hours, and were stored at 4 °C for 24 hours before test; group F, samples were stored at 25 °C for 36 hours, and then were processed and tested. **Results** Compared with group A in group one, the data showed lower CD3⁺ cells, CD3⁺ CD4⁺ cells ($P < 0.05$) and higher CD19⁺ cells ($P < 0.05$), CD16⁺ CD56⁺ cells ($P < 0.05$) of group B and group C. CD3⁺ CD8⁺ cells were higher in group B than group A ($P < 0.05$). In group two, there was no significant difference between group D, group E and group F ($P > 0.05$). **Conclusion** The results of peripheral blood lymphocyte subsets of patients analyzed by flow cytometry are stable within 36 hours after the sample collection.

【Key words】 flow cytometry; lymphocyte subsets; storage temperature; storage time

流式细胞术(FCM)计数血液 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK)亚群已成为临床医学中最常用的检查项目之一,对于评价机体的免疫功能、诊断与监测免疫性疾病,判断预后具有重要意义^[1-5]。FCM 一般使用新鲜样品进行检测以保证检测结果的准确性,但是,对于检测量小的医院,这会增加仪器维护(如消耗耗机液、清洗液等)成本,提高试剂(如鞘液、质控品)消耗,且耗费人力。因此,如何在满足临床随时采样、及时回报检测结果要求的同时,又能减少人力消耗、降低试剂和仪器维护成本,成为一个亟待解决的问题。以往研究多专注于健康人或艾滋病患者样本的保存时间及温度对流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群的影响^[6-7],而对其他非健康人群样本、B 淋巴细胞亚群研究较少,对 NK 亚群的研究未见报道。因此,本研究针对非健康人的标本进行了样本保存时间及温度对流式细胞仪检测淋巴细胞亚群影响的研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 第 1 组, 随机选取 2014 年 6 月至 2015 年 2 月门诊和住院患者样本 27 例, 包括男 10 例, 女 17 例; 年龄 2~84 岁, 平均(44.96±23.29)岁; 所患疾病包括传染性单核细胞增多症 1 例, 慢性白血病 2 例, 非霍奇金淋巴瘤 1 例, 淋巴细胞增生性疾病 1 例, 白细胞减少 1 例, 慢性硬膜下血肿 1 例, 人脑胶质瘤 3 例, 病毒性脑膜炎 2 例, 脱髓鞘性疾病 4 例, 乳房肿物 1 例, 重症肌无力 2 例, 发热 2 例, 寻常性银屑病 1 例, 皮炎 2 例, 白癜风 1 例, 肺部感染 2 例。第 2 组, 随机收取 2015 年 2 月某日门诊和住院患者样本 18 例, 包括男 9 例, 女 9 例; 年龄 25~93 岁, 平均(40.06±20.02)岁; 所患疾病包括人脑胶质瘤 2 例, 脱髓鞘性疾病 2 例, 糖尿病周围神经病变 1 例, 脑卒中 4 例, 脂肪瘤 1 例, 继发性癫痫 1 例, 听神经瘤 1 例, 脑膜瘤 1 例, 妊娠 2 例, 瘢痕子宫 1 例, 肺癌 1 例, 营养不良 1 例。

* 基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2013-3-052)。

作者简介:方芳,女,主治医师,硕士,主要从事临床免疫检验和临床分子生物学检验研究。△ 通讯作者,E-mail:tiantanzgj@163.com。

1.2 仪器与试剂 采血管为奥地利 Vacuette 采血管,内含 EDTA-K₂。淋巴细胞亚群:采用美国 BD 公司的 4 色淋巴细胞亚群检测试剂“BD Multitest™ IMK Kit”以及鞘液进行检测,抗体标记的荧光素分别为:CD45-PerCP、CD3-FITC、CD8-PE、CD4-APC、CD16-PE、CD56-PE 以及 CD19-APC;溶血素为试剂盒内配套试剂;仪器为 BD FACSCanto II 流式细胞仪;使用 BD FACSCanto 临床软件进行分析。血常规:采用日本 Sysmex 的 XE-2100D 血细胞计数仪及其配套试剂进行检测。

1.3 方法

1.3.1 采集方法 采集患者清晨空腹抗凝全血 3 mL,立即送至实验室,2 h 内进行血常规检测。流式细胞仪检测样本的预处理:根据《淋巴细胞亚群检测试剂盒使用说明》进行。第 1 组 27 例样本,进行 3 组试验:A 组,在采集 6 h 内进行淋巴细胞亚群检测;B 组,27 例样本于 4 °C 保存 72 h 后处理检测;C 组,27 例样本中有 21 例于 4 °C 保存 120 h 后处理检测。第 2 组 18 例样本,每例样本被平均分为 3 份,分别参与以下试验:D 组,在采集样本后 6 h 内进行检测;E 组,在采集后 6 h 内进行样本预处理,于 4 °C 保存 24 h 后检测;F 组,样本在室温条件下(25 °C)保存 36 h 后进行预处理,随后检测。

1.3.2 流式细胞仪检测 每日用 BD 公司的配套 CS&T 微球进行仪器性能状态自动监控;用 BD FACS 7-Color 微球调整仪器的电压、荧光补偿等参数;用 Beckman Coulter 的全血质控样品 IMMUNO-Trol Cells 进行日常检测全过程的质量监控。检测结果由 2 名经过 FCM 培训且检测经验 2 年以上的工作人员共同确认。血常规检测:使用日本 Sysmex 公司的 e-Check 全血质控品进行监控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.00 软件进行统计学处理和分折,用 One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test 进行正态性检验。对正态性数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;计量资料多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用配对 *t* 检验;以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。对非正态性数据以中位数(四分位间距)表示。

2 结果

2.1 外周血常规 第 1 组 24 例患者(3 例未测):白细胞计数 $(11.03 \pm 6.66) \times 10^9/L$;淋巴细胞计数 $[2.12(1.30, 3.59)] \times 10^9/L$,其中分别有 4%(2/24) 低于、17%(4/24) 高于参考范围。第 2 组 18 例患者:白细胞计数 $(7.52 \pm 3.55) \times 10^9/L$;淋巴细胞计数 $(1.61 \pm 0.89) \times 10^9/L$,其中 33%(6/18) 低于参考范围。

表 1 患者淋巴细胞亚群情况

类型	项目	第 1 组(n=27)	第 2 组(n=18)
CD3 ⁺ 细胞	均值(% , $\bar{x} \pm s$)	70.59 ± 17.87	75.88 ± 9.60
	降低[% (n/n)]	7(2/27)	0(0/18)
	升高[% (n/n)]	19(5/27)	22(4/18)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞	均值(% , $\bar{x} \pm s$)	37.15 ± 14.34	42.85 ± 9.69
	降低[% (n/n)]	22(6/27)	11(2/18)
	升高[% (n/n)]	0(0/27)	6(1/18)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	均值(% , $\bar{x} \pm s$)	30.41 ± 13.96	30.44 ± 7.85
	降低[% (n/n)]	7(2/27)	0(0/18)
	升高[% (n/n)]	15(4/27)	11(2/18)
CD19 ⁺ 细胞	均值(% , $\bar{x} \pm s$)	14.89 ± 19.23	10.17 ± 5.60
	降低[% (n/n)]	22(6/27)	17(3/18)
	升高[% (n/n)]	11(3/27)	0(0/18)
CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞	均值(% , $\bar{x} \pm s$)	13.42 ± 8.81	12.09 ± 9.21
	降低[% (n/n)]	19(5/27)	28(5/18)
	升高[% (n/n)]	7(2/27)	11(2/18)

表 2 A 组和 B 组外周血淋巴细胞亚群结果(n=27, %, $\bar{x} \pm s$)

类型	A 组	B 组
CD3 ⁺ 细胞	71.11 ± 17.73	69.32 ± 18.18 [#]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞	37.56 ± 14.44	34.98 ± 13.76 [#]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	30.42 ± 14.01	31.96 ± 14.98 [#]
CD19 ⁺ 细胞	14.53 ± 18.97	15.73 ± 19.59 [#]
CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞	13.30 ± 8.82	14.02 ± 8.88 [*]

注:与 A 组比较, * [#] *P* < 0.05。

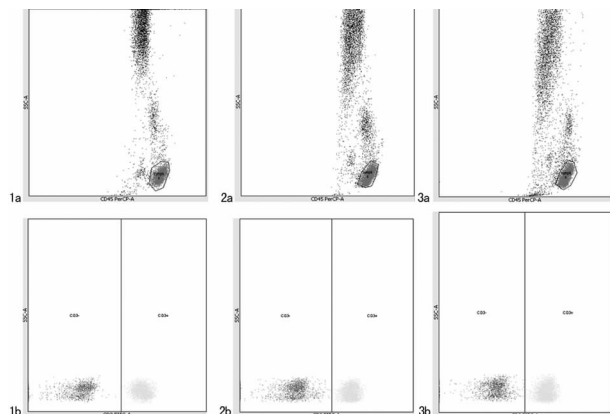
表 3 A 组和 C 组外周血淋巴细胞亚群结果(n=21, %, $\bar{x} \pm s$)

类型	A 组	C 组
CD3 ⁺ 细胞	70.40 ± 19.11	67.71 ± 19.53 [#]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞	36.87 ± 13.45	34.32 ± 12.80 [#]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	30.58 ± 13.22	31.29 ± 13.64 [#]
CD19 ⁺ 细胞	16.69 ± 20.60	18.32 ± 21.69 [#]
CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞	11.90 ± 6.21	12.89 ± 6.76 [*]

注:与 A 组比较, * [#] *P* < 0.05。

表 4 D 组、E 组和 F 组外周血淋巴细胞亚群结果(n=18, %, $\bar{x} \pm s$)

类型	D 组	E 组	F 组
CD3 ⁺ 细胞	75.88 ± 9.60	75.57 ± 9.38	76.55 ± 9.40
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞	42.85 ± 9.69	42.76 ± 9.26	43.10 ± 9.33
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	30.44 ± 7.85	30.34 ± 7.08	31.38 ± 8.05
CD19 ⁺ 细胞	10.17 ± 5.60	10.62 ± 5.12	10.48 ± 5.34
CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞	12.09 ± 9.21	12.92 ± 9.49	12.14 ± 8.98



注:1a, 2a, 3a 分别为采血 6 h 内及 72、120 h 总淋巴细胞检测结果;1b, 2b, 3b 分别为采血 6 h 内及 72、120 h CD3⁺和 CD3⁻淋巴细胞亚群检测结果。

图 1 细胞亚群结果

2.2 淋巴细胞亚群 第 1 组和第 2 组的淋巴细胞亚群结果,见表 1。A~F 组的 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺CD56⁺细胞数据均呈正态分布。第 1 组样本采血后 6 h 内及 72、120 h 总淋巴细胞,CD3⁺和 CD3⁻细胞亚群结果,见图 1。B 组、C 组与 A 组比较,CD3⁺细胞、CD3⁺CD4⁺细胞明显降低(*P* < 0.05),而 CD19⁺细胞、CD16⁺CD56⁺细胞明显升高(*P* < 0.05);B 组 CD3⁺CD8⁺细胞较 A 组明显升高(*P* < 0.05)。

0.05), 而 C 组无显著变化, 见表 2、3。第 2 组中 D 组、E 组和 F 组间比较, CD3⁺ 细胞、CD3⁺ CD4⁺ 细胞、CD3⁺ CD8⁺ 细胞、CD19⁺ 细胞、CD16⁺ CD56⁺ 细胞结果差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

3 讨 论

陈潇等^[6]研究表明, 保存 3 d(4 ℃) 的样本, CD3⁺ CD4⁺ 和 CD3⁺ CD8⁺ 淋巴细胞亚群检测结果与采集后 1 h 内检测结果无显著差异。因此, 本研究首先选取 27 例患者为第 1 组, 在样本采集后 6 h 内、72 h(4 ℃) 及 120 h(4 ℃) 后进行检测, 发现 72 h(4 ℃)、120 h(4 ℃) 的检测结果显示与样本采集后 6 h 内检测结果有显著差异。《淋巴细胞亚群检测试剂盒使用说明》推荐进行淋巴细胞亚群检测应于采集标本后 48 h 内染色, 而根据本院的工作流程, 临床常于清晨 5:00~6:00 时采集患者空腹静脉血, 于 8:00 以后送至实验室, 因此, 本研究又收集 18 例样本作为第 2 组, 对采集后 6 h 内样本与不同保存条件下 36 h 内样本进行了淋巴细胞亚群结果的比较。在 2 组患者中均有一定比例的患者, 其外周血白细胞计数及淋巴细胞计数、淋巴细胞各亚群比例表现异常。

流式细胞仪检测外周血淋巴细胞亚群, 通过白细胞上的特异性抗原与荧光素标记的特异性抗体结合后, 同时检测细胞的物理参数(细胞大小、颗粒度等)和化学参数(细胞表面抗原)来进行。长时间存储样本可能会影响细胞的大小和形态, 也可能影响细胞表面抗原的活性。而患者与健康人相比, 在机体状态异常的情况下, 长时间存储样本对其细胞物理参数和化学参数的影响可能更为明显^[7]。图 1a、2a、3a 中可见, 在 CD45⁺ 区域, 随着保存时间的延长, 淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞之间的距离在侧向散射角(SSC)方向上逐渐缩小, 提示随着样本保存时间的延长, 3 种细胞亚群的细胞颗粒度差别逐渐减小; 图 1b、2b、3b 中可见, 随着保存时间的延长, CD3⁻ 淋巴细胞亚群和 CD3⁺ 淋巴细胞亚群之间的间距在逐渐缩小, 提示随着样本保存时间的延长, T 淋巴细胞表面 CD3 抗原的抗原性在逐渐下降, 间接反映了淋巴细胞表面抗原的抗原性可能随储存时间的延长而下降, 导致检测图形和定量结果的变化。

本研究第 1 组中评价了采血后在 4 ℃ 保存, 采血后 72 h(B 组)与采血 6 h 内(A 组)相比, 淋巴细胞亚群各项都有显著性差异, 与 Ekong 等^[7] 的检测结果显示相似。而采血 120 h(C 组)检测结果与 A 组相比, 除了 CD3⁺ CD8⁺ 细胞无明显变化外, 各项均有显著性差异。陈潇等^[6] 将健康人全血样本在 4 ℃ 保存, 第 3 天 CD3⁺ 淋巴细胞显著减低, 与本研究结果相符; 而 CD3⁺ CD4⁺ 细胞和 CD3⁺ CD8⁺ 细胞无明显变化, 与本研究结果不符; 第 5 天, CD3⁺ 淋巴细胞、CD3⁺ CD4⁺ 细胞均较第 1 天明显降低, 与本研究相符, 而 CD3⁺ CD8⁺ 细胞也明显降低, 与本研究结果不符。肖瑶等^[8] 研究结果显示, 全血样本在 4 ℃ 保存 72 h, CD3⁺ CD4⁺ 淋巴细胞绝对计数无明显变化, 与本研究不符。考虑出现差异的原因: (1) 在陈潇等^[6] 的研究中, 使用样本数量(7 例)较少, 肖瑶等^[8] 使用样本较多(34 例)且计数方法是绝对计数, 而本研究使用的是相对计数。(2) 陈潇等^[6] 将样本分装保存在不同温度后进行多组检测, 采用统计学方法为方差分析, 而本研究在第 1 组中, 由于 C 组和 B 组的样本例数不

同, 使用的是配对样本 t 检验。(3) 陈潇等^[6] 使用健康人的全血样本, 肖瑶等^[8] 使用艾滋病感染者样本, 而本研究随机选取来自临床的患者, 其疾病所涉及的范围广泛, 部分患者淋巴细胞计数异常, 并且这些疾病中大部分如: 病毒性感染性疾病(如传染性单核细胞增多症、病毒性脑炎)、血液病(淋巴瘤、慢性白血病)、良性神经系统肿瘤(脑膜瘤、听神经瘤)、恶性神经系统肿瘤(胶质瘤)、免疫功能异常相关的神经系统疾病(脱髓鞘病、重症肌无力)、自身免疫性疾病(银屑病、白癜风)、妊娠、蛛网膜下腔出血均会伴有淋巴细胞亚群的异常改变, 这些改变既涉及淋巴细胞总数及各个亚群数量的改变, 又涉及淋巴细胞功能的变化。

在第 2 组中, 对进行过预处理后保存 24 h(4 ℃) 的样本及保存 36 h(25 ℃) 后处理检测的样本结果与采集后 6 h 内的检测结果进行了评价, 与 Jalla 等^[9] 结果相似。

在样本采集后 36 h 内进行淋巴细胞亚群的检测结果稳定。因此, 对于检测量少的实验室, 隔天开机检测在可保证检测质量的基础上, 节约人力、物力成本。

参考文献

- [1] 王建中. 实验诊断学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 371-375.
- [2] 王建中, 王淑娟. 当前临床流式细胞分析的发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-7.
- [3] Okada Y. Flow cytometry—the basis of cell surface analysis and clinical application[J]. Rinsho Byori, 2010, 58(11): 1121-1130.
- [4] Avlasevich S, Bryce S, De BM, et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future[J]. Mutagenesis, 2011, 26(1): 147-152.
- [5] Siebert JC, Walker EB. Monitoring cytokine profiles during immunotherapy[J]. Immunotherapy, 2010, 2(6): 799-816.
- [6] 陈潇, 吴丽娟. 抗凝剂、标本保存温度和保存时间对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 146-147.
- [7] Ekong T, Kupek E, Hill A, et al. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry: the effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets[J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 164(2): 263-273.
- [8] 肖瑶, 张桂云, 裴丽健, 等. 存放温度及时间对于 HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ 细胞测定结果的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(2): 129-131.
- [9] Jalla S, Sazawal S. Enumeration of lymphocyte subsets using flow cytometry: effect of storage before and after staining in a developing country setting[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2004, 19(2): 95-99.