

床消化病杂志,2010,22(1):56-59.

[26] 刘佳,彭颖,吴春福,等. 微生态制剂在老年人肠道菌群失衡中的应用[J]. 现代生物医学进展,2009,9(14):2737-2740.

[27] 杨昭徐,李瑞军. 微生态制剂在消化系统疾病中的临床应用[J]. 临床药物治疗杂志,2004,2(5):27-34.

[28] Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know[J]. World J Gastroenterol,2014,20(36):12956-12980.

[29] Kim W, Kim DJ. Severe alcoholic hepatitis-current concepts, diagnosis and treatment options[J]. World J Hepatol,2014,6(10):688-695.

[30] Wang H, Zhao JX, Hu N, et al. Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins[J]. World J Gastroenterol,2012,18(18):2180-2187.

(收稿日期:2016-09-29 修回日期:2016-12-12)

• 综 述 •

流式细胞术在临床检验中的应用

王 师¹, 张孟源², 童能胜¹综述, 张火兵^{1△} 审校

(1. 北京中同蓝博临床检验所, 北京 100076; 2. 南京大学生命科学院, 南京 210093)

关键词: 流式细胞术; 临床检验; 免疫学; 血液学; 肿瘤学
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 06. 065 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)06-0897-03

流式细胞术(FCM)是一种能对单个细胞或者亚细胞结构进行计数分析的技术,它不仅可以对细胞表面抗原进行检测,也能对细胞内部的生物大分子进行检测,能够在细胞水平上对相关疾病进行诊断和病程监测。由于 FCM 具有快速、灵敏、精确和简便等特点,使其在临床检验中广泛应用。本文将对 FCM 在免疫学、血液学、肿瘤学、精子功能检测等临床检验相关的领域的应用作一综述。

FCM 作为一种由光学、电子学、计算机科学、免疫学和细胞生物学等多领域高度结合发展而来的技术,具有多种特点:(1)它能够实现对细胞的高通量操作,在 1 s 内对数万个细胞进行检测分析;(2)可对特定的细胞亚群进行分析,通过标记不同的细胞表面抗原,能够检测细胞的多种参数,以实现对特定的细胞亚群进行分析;(3)可进行多种细胞功能的检测,可以检测细胞表面标记、细胞的凋亡及增值周期、基因表达产物、细胞内的生物大分子^[1-2]。

流式细胞仪主要由液流系统、光学系统、检测系统和计算机分析系统组成。染色后的单细胞悬液在一定压力下单行排列依次通过检测区域,受到激光照射后的细胞会产生激发荧光和散射光,产生荧光被接收并产生不同波长的荧光信号,这些荧光信号在光电倍增管中转换成了能被计算机软件识别电信号,最后经过计算机处理成为可视的结果^[3]。自从上世纪 70 年代研制出的流液束、照明光轴和检测系统光轴 3 者相互正交的流式细胞计以来,经过半个世纪的发展,流式细胞仪和样品制备方法的日臻完善,FCM 在生命科学领域发挥的作用越来越大,尤其是临床检验工作中得到了广泛的应用^[4]。

1 FCM 在免疫学中的应用

随着单克隆抗体技术的发展,FCM 在免疫学中的作用越来越大。借助 FCM 检测淋巴细胞表面特定的抗原,能够计算各种淋巴细胞的数量和比例,从而了解机体的免疫功能,辅助相关疾病的诊断,指导相关临床疾病的治疗。健康人的外周血中 CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞的比例为 2:1,当患有类风湿关节炎等自身免疫病时,患者血液中 CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞的比例就会升高,因此,利用 FCM 检测

CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞的比例对类风湿关节炎等自身免疫病的早期诊断具有重要的意义^[5]。艾滋病患者的 CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞的比例低于健康人,感染人类免疫缺陷病毒(HIV)未发病的人 CD4⁺T 淋巴细胞超过每微升 200 个,艾滋病患者的 CD4⁺T 淋巴细胞低于每微升 200 个,通过流式细胞仪检测淋巴细胞亚群的计数和比例对艾滋病患者的筛查及 HIV 感染者的发病状况的监测具有重要的作用^[6]。

人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)是人类白细胞抗原,属于 MHC I 类分子,在所有的有核细胞表面均有表达,特别是在淋巴细胞表面表达水平较高。强直性脊柱炎是一种慢性的自身免疫性疾病,在医学上也称为迁延性疾病,主要表现为胸、颈、腰段的脊柱韧带和关节以及骶髋关节的骨化和炎症,作为一种较常见的疾病,起病隐袭,病程长,容易造成脊柱的受损使身体残疾,故早期的诊断尤为重要。研究发现,强直性脊柱炎的发病与 HLA-B27 的表达有着密切的关系。健康人群中 HLA-B27 的阳性率仅为 5%~11%,强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的阳性率高达 90%,在临床诊断中,由于强直性脊柱炎与其他相关疾病有着较多类似的特征致使其难以确诊,因此 HLA-B27 的检测在强直性脊柱炎疾病的诊断中具有重要的临床意义^[7]。在临床检验中,利用 FCM 的检测时间短、方法简便、灵敏度高、特异度强等特点,较快捷的检测 HLA-B27 的表达,进而通过检测外周血 CD3⁺T 淋巴细胞中 HLA-B27 阳性的阳性率来诊断强直性脊柱炎。因此利用 FCM 检测 HLA-B27 的表达对于强直性脊柱炎的诊断、预防和预后判断都具有重要意义。

2 FCM 在血液学中的应用

在血液学的研究中,人们对白血病的研究尤为关注。白血病是一类因造血干细胞的分化受阻、增殖失控、凋亡受到抑制等机制引起的造血干细胞恶性增殖疾病。对白细胞表面抗原的研究为白血病的分型、诊断和治疗提供了重要的基础。如 B 淋巴细胞的 CD22、CD20、CD19 等抗原,T 淋巴细胞 CD3、CD5、CD8 等抗原,巨核系的 CD61、CD42、CD41 抗原,髓系细

△ 通信作者,E-mail:zhanghuobing2010@163.com。

胞的 CD15、CD13、CD33、CD14、髓过氧化物酶等抗原。利用 FCM 检测通过单克隆抗体标记淋巴细胞来对白血病进行分型是鉴别急性白血病和慢性白血病的重要依据^[8-10]。FCM 检测白血病的分型具有准确、快速和方法简便等优点,其在检测外周血细胞时能够圈定需要检测的细胞团,从而排除血小板、红细胞、细胞碎片的干扰,相比荧光显微镜和免疫组化的方法更为准确。目前治疗白血病最为有效的方法是造血干细胞移植,在移植配体的选择方面,FCM 通过测定供体白细胞表面抗原配型来选择出最为合适的供体,从而快速地完成干细胞移植。目前研究已证实 FCM 在检测 CD33、CD34、人白细胞 DR 抗原等白细胞表面抗原已成为造血干细胞移植过程中最重要地监测手段^[11]。

FCM 在阵发性睡眠性血红蛋白尿诊断和治疗监测中也发挥着重要的作用。阵发性睡眠性血红蛋白尿是一种造血干细胞过度增殖的疾病,这种疾病的一个特点为白细胞 CD59、CD55 抗原表达降低。FCM 通过标记由荧光的抗 CD59 的单克隆抗体对外周血细胞 CD59 的表达做定量分析,来协助临床诊断阵发性睡眠性血红蛋白尿及判断疾病的发展进程。此外,FCM 还能通过噻唑橙、吖啶橙等荧光染料结合红细胞中的 RNA 来检测网织红细胞占成熟红细胞的百分比值以及红细胞的成熟度为贫血的治疗监测提供了重要的依据^[12]。此外,通过 FCM 检测血小板表面相关抗原来辅助诊断血小板相关的疾病,如非免疫性血小板活化、急性心肌梗死、动脉粥样硬化、血小板输血或药物不良反应引起的血小板止血功能障碍。

3 FCM 在肿瘤学中的应用

随着科技的进步与发展,FCM 日臻完善,FCM 既可以对肿瘤细胞表面、细胞质和细胞核中的各种分子标志进行检测,也可以对肿瘤患者的各种体液所携带的大分子肿瘤标志物进行检测。据文献报道,p53V、cerbB-2、CD44V5、CD44V6 等肿瘤相关基因编码的蛋白在肿瘤细胞中表达上调,这些肿瘤标志物的表达不仅与肿瘤的发生具有密切的关系,而且也是肿瘤转移的相关刺激因子。因此,FCM 已成为肿瘤学研究和肿瘤诊断及监测的重要技术^[13-14]。

利用 FCM 还可以测定肿瘤细胞的增殖活性、分化程度和凋亡水平,这些细胞参数与肿瘤的恶性程度密切相关,并为肿瘤临床治疗方案的选择提供可靠的理论基础。通过 FCM 检测肿瘤细胞凋亡细胞数、凋亡指数及肿瘤细胞的增殖率,来判断肿瘤的生存状态,以便实施最佳的临床治疗方案。FCM 通过检测肿瘤细胞的增殖活性、分化程度和凋亡水平,可以快速、准确、简便、灵敏地了解肿瘤发展及转移的情况,从而及时发现肿瘤细胞的早期微转移,这对肿瘤的早期诊断、临床治疗方案的选择和患者的预后评估具有重要的意义^[15]。

FCM 分析肿瘤细胞 DNA 水平用来辅助肿瘤的早期诊断已在临床检验中实施。正常细胞均是 DNA 二倍体,当细胞癌基因表达或者由良性的肿瘤细胞转变成恶性肿瘤细胞时,这些细胞中 DNA 水平会发生改变,这些细胞的 DNA 倍体变化或者染色体结构异常在 FCM 检测过程中会以 DNA 倍体数量的改变表现出来。尤其是对体液和组织液中脱落的肿瘤细胞的分析更为精确,可通过检测脱落的肿瘤细胞 DNA 水平及 S 期的细胞比例来判断肿瘤发展的情况。FCM 对 DNA 倍体分析对早期淋巴瘤的诊断具有重要意义,因为 FCM 的分析可达到细胞水平,可在病理切片不能分析之前提供更为准确的诊断信息。FCM 对 DNA 异倍体精确的分析是肿瘤诊断、间叶组织良恶性肿瘤判断的重要依据。值得注意的是,DNA 倍体正常并

不能排除肿瘤细胞的存在,此外还要考虑到正常细胞在增殖、衰老和凋亡过程中带来的 DNA 水平的变化。因此,在肿瘤的在其诊断过程中,还要依靠多种检测方法得出的结果进行综合分析来做出最为准确的诊断。

4 FCM 在精子功能检测中的应用

随着科技的不断发展,研究发现吸烟、酗酒、辐射和化学物质均能在不同程度上影响精子核完整性,从而造成受精成功率低或者习惯性流产。受损精子核中的染色质经酸(三羟甲基甲基甲烷盐酸、乙二醇四乙酸)处理后成单链 DNA,单链 DNA 能与吖啶橙结合发红色或者黄色荧光;正常精子核中的染色质经酸处理能够保持完整的双 DNA 结构,与染料吖啶橙结合发绿色荧光,若红光比例增高,就说明精子核完整性受损程度增加。FCM 通过检测经酸处理染色后的精子计算红色荧光与绿色荧光的比值来评估精子核的完整性^[16]。

FCM 还能对精子线粒体功能进行检测。线粒体是提供精子运动所需能量的供应站,线粒体的功能好坏直接影响精子的活力,因此,线粒体的功能也是衡量精子质量的关键指标。在进行精子线粒体功能的 FCM 检测时,通常将精子用碘化丙啶(PD)和罗丹明 123(Rh123)对精子进行双染,在流式细胞仪检测,可分为死精子(PI 阳性,Rh123 阴性)、线粒体功能丧失的活精子(PI 阴性,Rh123 阴性)和线粒体功能良好的精子(PI 阴性,Rh123 阳性),通过测算 3 种精子所占的比例来评价精子质量。利用 FCM 检测精子的质量更加快速准确,在男性不育的诊断、优生优育及精子内部结构研究具有重要意义^[17-19]。

FCM 作为现代医学和检验学中一种重要的细胞分析检测技术,在免疫学、血液学、肿瘤学和精子质量检测中发挥着重要的作用,为相关疾病的诊断、病程监测提供了重要的指标。随着单克隆抗体、荧光染料、标记技术、计算机技术、物理学等相关技术的不断进步,FCM 在临床检验学中的应用范围逐步增大,将会更进一步推动临床检验学的发展。

参考文献

- [1] Hedley BD, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis[J]. Int J Lab Hematol, 2013, 35 (3): 344-350.
- [2] Goodale D, Phay C, Brown W, et al. Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2009, 76 (2): 107-117.
- [3] Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research[J]. Cancer Res, 1983, 43 (1): 3982-3997.
- [4] Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms[J]. Blood, 2008, 111 (2): 3941-3967.
- [5] Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007, 109 (1): 19-39.
- [6] Hoffmann M, Pantazis N, Martin GE, et al. Exhaustion of activated CD8 T cells predicts disease progression in primary HIV-1 infection[J]. PLoS Pathog, 2016, 12 (7): 12-15.
- [7] D'ambrosio EM, Cava M, Tortorella P, (下转第 902 页)

患者带来严重的创伤^[11]。HIV 感染对患者的心理、情感、社会功能、生活方式和家庭关系等方面造成了巨大的冲击。真诚与患者交流,建立互信的护患关系,为患者介绍艾滋病的治疗成果,让患者认识到艾滋病已不再是一种致死性疾病。待精神症状控制后,鼓励患者多参加娱乐活动,给予音乐疗法^[12],舒缓、轻柔、悠扬的音乐能提高患者的舒适度,改善患者的焦虑、消沉、低落的情绪,增强机体免疫力,增加患者接受治疗的信心。

4 小 结

合并 HIV 感染的精神障碍患者不仅是一个医学问题,也是一个严重的社会问题。精神障碍并发 HIV 感染具有双重疾病,以精神症状为主要表现,同时精神障碍是一种长期的疾病,需要长期乃至终身药物支持,加大了护理难度。在护理过程中要以安全为主,通过安全有效的管理和护理,降低职业暴露的发生,同时增强患者治疗信心,积极调动社会支持系统,给予患者全方位的支持,促进患者康复,维护社会稳定。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心. 2016 年 5 月全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展[J]. 中国艾滋病性病, 2016, 21(7): 487-490.

[2] 王君. 艾滋病合并精神障碍护理工作中职业暴露风险和防范对策[J]. 中外医疗, 2011, 30(18): 178.

[3] 陈金钰. 纠正不良的护理工作习惯和行为减少针刺伤

[J]. 现代护理, 2005, 11(24): 2092-2093.

[4] 李银花. 我科艾滋病护理与管理中存在的问题与对策[J]. 口岸卫生控制, 2015, 5(5): 47-49.

[5] 覃钟敏. 心理护理干预提高艾滋病患者治疗依从性的效果观察[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(8): 1106-1107.

[6] 瞿洋, 刘英杰. 艾滋病感染者心理干预初探[J]. 中国性科学, 2015, 24(1): 108-110.

[7] 刘红霞, 葛艳亮. 护理人员艾滋病知识及职业暴露防护水平调查研究[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(10): 36-37.

[8] 蓝爱春, 郑小琴, 胡显玲. 护理人员艾滋病护理意愿及影响因素研究[J]. 中国实用护理杂志, 2010, 26(14): 65-66.

[9] 宋萍伟. 住院艾滋病患者的护理需求及相关因素研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2009: 1-55.

[10] 王玮, 任桂秋, 肇恒伟, 等. 苯丙胺类兴奋剂滥用者心理健康状况及其影响因素研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2013, 22(2): 131-134.

[11] 秦虹春. 艾滋病手术患者的心理护理[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(4): 269-270.

[12] 谢春梨, 石柳春, 梁桂月, 等. 音乐疗法对艾滋病抗逆转录病毒治疗患者胃肠道反应的影响[J]. 护理学杂志, 2012, 27(9): 29-30.

(收稿日期: 2016-10-05 修回日期: 2016-12-07)

(上接第 898 页)

et al. Clinical features and complications of the HLA-B27-associated acute anterior uveitis: a metanalysis[J]. Semin Ophthalmol, 2016, 6(12): 1-13.

[8] Dong HY, Kung JX, Bhardwaj V, et al. Flow cytometry rapidly identifies all acute promyelocytic leukemias with high specificity independent of underlying cytogenetic abnormalities[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 135(1): 76-84.

[9] Trewhitt KG. Bone marrow aspiration and biopsy: Collection and interpretation [J]. Oncology Nursing Forum, 2001, 28(5): 1409-1415.

[10] Madan V, Shyamsunder P, Han L, et al. Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic[J]. leukemia, 2016, 25(10): 1038-1045.

[11] Revenfeld AL, Steffensen R, Pugholm LH, et al. Presence of HLA-DR molecules and HLA-DRB1 mRNA in circulating CD4⁺ T cells[J]. Scand J Immunol, 2016, 84(4): 211-217.

[12] Leaderer D, Cashman SM, Kumar-Singh R. Adeno-associated virus mediated delivery of an engineered protein that combines the complement inhibitory properties of CD46, CD55 and CD59[J]. J Gene Med, 2015, 17(6/7): 101-115.

[13] Wang H, Rana S, Giese N, et al. CD44v6 and alpha6 beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells[J]. Int J Cancer, 2013, 133(2): 416-426.

[14] Kharaziha P, Ceder S, Li Q, et al. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 126(1): 103-111.

[15] Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, et al. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges[J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(7): 415-425.

[16] Kekalainen J, Larma I, Linden M, et al. Lectin staining and flow cytometry reveals female-induced sperm acrosome reaction and surface carbohydrate reorganization [J]. Sci Rep, 2015, 5(6): 15321-16329.

[17] Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(21): 3446-3457.

[18] Taitzoglou IA, Kokoli AN, Gj K, et al. Modifications of surface carbohydrates on bovine spermatozoa mediated byoviductal fluid: a flow cytometric study using lectins [J]. Int J Androl, 2007, 30(4): 108-114.

[19] Favret KP, Lynn JW. Flow-Cytometric analyses of viability biomarkers in Pesticide-Exposed sperm of three aquatic invertebrates[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2010, 58(4): 973-984.

(收稿日期: 2016-09-11 修回日期: 2016-12-09)