

流式细胞术在医学检验中的应用研究进展

陈超, 李鑫瞳, 邢莹, 路放, 李雨艳*

(吉林金域医学检验所有限公司, 长春 130000)

摘要: 流式细胞术(flow cytometer, FCM)是一项综合性检验技术。在医学检验中通过流式细胞仪对人体中的单列细胞和生物颗粒进行快速捕捉筛选, 然后对细胞进行定量分析, 测定细胞内多种参数, 在免疫学领域、微生物检测领域、肿瘤疾病诊断领域以及血液疾病诊断等领域运用广泛, 其检测速度快、检测方法灵活、测定参数多、数据分析全面。本文主要对 FCM 在血液疾病、免疫、微生物检测、肿瘤诊断等医学检验方面的研究进展进行综述, 为医学检验方面提供参考

关键词: 流式细胞术; 医学检验; 应用; 研究进展

0 引言

流式细胞术(FCM)是测定单列细胞和生物颗粒在分子水平上的定量检测方法, 由光源与光学系统、液流系统、光信号收集与转换系统、电子与应用控制系统构成。流式细胞仪可检测的细胞数量庞大, 又能从单个细胞中获得不同的参数数据, 通过细胞或颗粒进行荧光标记, 将捕获到的荧光信号转换为电信号后由计算机生产图像^[1]。可用荧光标记的细胞或颗粒, 都可以使用 FCM。具有分选功能的流式可根据一个预定参数值或多个预定检测参数值组合将特定细胞或颗粒亚群分选和收集到特定容器或特定位置。现代 FCM 与单克隆抗体技术和定量荧光细胞化学技术组合, 已运用到多个方面。本文旨在综述 FCM 在医学检验方面的研究进展。

1 FCM 的应用

1.1 FCM 在肿瘤诊断中的应用

临床检测中流式细胞仪最早应用在肿瘤诊断。癌细胞是由机体中正常的 DNA 细胞含量增加或减少以及其形态发生异常改变而产生, 而流式细胞仪主要就是对细胞中的 DNA 微粒进行检测。医学研究者通过 FCM 对癌症患者进行早期诊断, 通过对肿瘤细胞的染色体进行定量分析, 监测其参数变化, 其检测结果准确率高达 90% 以上。主要检测细胞在不同增殖周期中表达产物的数量变化, 通过这种参数的波动可以反映机体肿瘤细胞的染色体是否发生特

异性改变, 由此进行肿瘤的早期诊断。

程小艳等^[2]通过流式细胞仪进行尿脱落细胞检测, 经过研究对比, 发现膀胱癌患者的尿脱落细胞的 DNA 敏感性和特异性相比于正常人显著提高, 由此用流式细胞仪进行膀胱癌患者的诊断在临床中得到证实, 从而被广泛运用。胡泽斌等^[3]通过流式细胞仪对肿瘤细胞 DNA 进行检测, 发现恶性肿瘤患者的 DNA 倍体与正常人体的倍体存在很大的差异, 因此提出在临床医学检验中可以通过对肿瘤细胞 DNA 倍体的检测来判断人体是否患有恶性肿瘤。

1.2 FCM 在免疫学中的应用

在免疫学中, FCM 通常用来检测机体的免疫系统是否正常工作, 在临床检验中机体免疫系统检测是患者患病情况的重要指标^[4]。流式细胞仪可以通过对 T 细胞和 B 细胞的比值分析以及机体自然杀伤细胞的参数测定来分析免疫系统是否处于正常, 这是疾病诊断的一个重要依据^[5]。

免疫细胞具有复杂且多样的生物学特性, 抗原刺激后的免疫细胞通过增殖、分化、效应、老化、自噬、死亡等发挥生理作用维持正常生理功能, 稳定机体内环境。FCM 可以检测到细胞发展的各个阶段, 以此来判断细胞是否处于免疫病理时期, 包括 T 细胞、B 细胞的功能检测、白血病的免疫分型及自身免疫性疾病 HLA 抗原的分型。通过荧光标记的免疫细胞, FCM 还可以检测其标志分子, 来监控患者的免疫状态, 用于疾病的预后判断。

FCM 结合单克隆抗体技术与普通免疫学相比具有定量准确的优点, 在免疫学临床主要应用于对细胞表面抗原、

第一作者: 陈超, 研究方向为流式细胞术。

* 通信作者: 李雨艳, 高级经济师, 主管检验师, 研究方向为医学检验及实验室管理。E-mail: jlliyuan@kingmed.com.cn

细胞内抗原、细胞膜受体和癌基因蛋白进行定量检测,并且已经取得了长足的发展。FCM结合单克隆抗体技术在人体细胞免疫功能方面的评估具有重要的意义。有报道对外周血淋巴细胞免疫表型的参考值及其种族、性别、年龄等影响因素进行了探讨^[6]。

1.3 FCM在微生物检验中的应用

实验室中的菌体计数的常规方法是平板法和显微技术。显微技术消耗时间、消耗人工且重复性差,容易出现技术上的误差,而平板法只能计数活菌。FCM能够快速检测细菌得到其总值,还可以在一定的细菌浓度中用来进行死菌与活菌的鉴别区分,从而测得活菌所占总菌浓度的比例^[7-8]。现在FCM在微生物检测上不仅应用于机体病原微生物检测,在食品发酵过程的菌群检测、食品细菌监控和饮用水检测等方面也得到广泛应用^[9]。

1.3.1 荧光素偶联抗体检测法

荧光素偶联抗体检测法在细菌学检验中主要用于菌种鉴定,即用直接法或间接法检测特定菌种的标志性抗原。该方法不能取代常规方法,只能用作补充实验,但比血清学方法更加快速、灵敏。基于FCM的细菌分析检测体系,荧光素偶联抗体检测法在实际运用时,不同荧光偶联抗体后的信号采集和分析不会相互干扰,使多荧光通道分析成为可能。实际应用中,单克隆抗体技术相比多克隆抗体的偶联发展更加成熟,且其特异性明显更强,因此在医学检验中最常使用。

1.3.2 抗体结合人工荧光微球检测法

抗体结合人工荧光微球检测法可快速检测人血清中是否含有抗真菌、病毒及某些致病菌的交叉感染的抗体,通过血清抗体判断血清中细菌。目前主要的抗体结合人工荧光微球检测法有两种。一种是荧光可寻址微球检测法,另一种是在荧光素偶联抗体检测法的基础上研究的荧光微球与抗体偶联法。研究人员通过对原始荧光微球的研究,开发出荧光可寻址微球,弥补了以往人工荧光微球检测的不足,通过与抗体结合的方式,在医学检验中通过应用流式细胞仪来探测荧光微球信号,进而获得实验数据的采集和分析。可寻址微球在医学检验中应用广泛,采取流式细胞仪对微球进行检测时通过特异性抗体结合,能够快速分析多重生物反应,检测效率高,检测数据准确,在免疫检测中尤为常见。新型的荧光微球与抗体的偶联法,是基于荧光素与抗体偶联的基础,将荧光素进行活化处理以荧光微球的形式进入人体与抗体结合,并选择特定的缓冲液和混匀方式,保障各反应物的充分接触,能够显著提高荧光微球与抗体的偶联效率以及偶联强度,还能使微球表面与抗体蛋白的结合位点充分结合,有效提高制备复合物的稳定

性,避免凝集现象的发生。

1.4 FCM在血液疾病诊断中的应用

FCM在血液学中的临床应用主要包括白血病的检测、淋巴瘤的检测、混合性白血病、部分髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、微小残留病灶白血病、血小板相关疾病等方面^[10]。其原理是对血液中的悬浮红细胞的细胞参数进行定量检测,通过在实际检测时采用不同染料对红细胞表面的单克隆抗体进行筛选,然后分析得出其特征参数,以此来判断人体是否患有血液系统疾病。在临床检验中通常被用于白血病的检查,通过FCM对机体白血病进行检查时的准确率超过90%^[11]。在白血病检测时的主要诊断依据是细胞周期和抗原表达的变化。流式细胞器能够对白血病患者细胞的细胞进行特异性检测,判断其不同细胞周期的抗原表达程度,通过对细胞倍体的数据分析,来判断患者体内血细胞的情况,为患者的临床诊断和治疗提供基础,进而增强白血病患者的临床治疗效果^[12]。FCM在实际临床检测时,往往是要采集患者外周静脉血,然后对其中的悬浮红细胞进行分析筛查,根据细胞中单克隆抗体的差异性来诊断出不同参数,提高白血病分类诊断的准确率^[13-14]。

干细胞在表达时具有异常光散射的特点,因此能够通过FCM、单克隆抗体来检测细胞表面不同抗原的荧光信号进行识别。单纯以某一种抗原是否表达进行判断结果并不可靠,只有结合多种单抗综合分析才能够得到更准确的分型结果^[15]。FCM在各种血液病的诊断、治疗和预后判断方面也起到了十分重要的作用,主要是通过分析外周血细胞或骨髓细胞表面抗原和DNA的检测来实现的。

1.5 FCM在其他方面的应用

1.5.1 FCM在精液检测中的应用

FCM在精液质量分析中的应用越来越广泛,流式细胞仪在应用时可以对精子的染色质结构和水平进行分析,但是在实际临床检测时,精液样本的保存和放置时间有所差异会导致染色质敏感度出现不同程度的变化。精子染色质测量的重要指标是其构象结构的一致性检测。在实际检测中,通常经过FCM对精子的染色质结构进行分析,快速地检测出精子细胞对DNA变性的敏感程度,从而得出一个完整的分析报告^[16]。通过FCM判断出精子质膜完整性和精子活动率呈正相关;精子染色质的结构会影响男性生育能力;线粒体活性同样与精子的运动能力密切相关。因此通过FCM对精液进行检测,在临床中可以更快速准确地判断人精子的运动和生育能力^[17]。FCM在精液检测中的应用主要是通过对不同时期的细胞数据和精子的各种指标进行分析,为临床诊断精子发生障碍的性质、原因和程度提供客观的数据支持,对无、少及弱精子等的判断、

治疗及治疗效果进行评估^[18]。FCM在精液检查中占据相当重要的地位,在临床中要加大普及和合理运用,便于患者的治疗诊断。

1.5.2 FCM分析自身免疫性疾病

强直性脊柱炎一种自身免疫性疾病,患者脊椎及其附属组织发生免疫性异常缺少而导致,发病原因与人类白细胞抗原HLA-B27存在密切的联系。因此在医学检验中对HLA-B27的检测可以作为强直性脊柱炎临床检测的重要指征。目前检测HLA-B27的主要方法有微量淋巴细胞毒试验、PCR-ASP基因定型技术和FCM,FCM相比于前两种方法更加简单,操作便捷。与传统方法相比,FCM测定HLA-B27的表达,特异性好、敏感性高可达100%且方便快捷、重复性高,但样本标记好后应及时检测。时间会影响荧光强度的检测,时间越长,荧光强度越弱,干扰结果造成假阴性,因此对于FCM在强直性脊柱炎检测中的应用还需更加完善,以避免其由于检测间隔时间过长造成的结果差异化问题^[19]。对于强直性脊柱炎在检测中的特异标志物,通过FCM的针对检查可以快速地检测。

1.5.3 FCM在器官移植中的作用

在器官移植中,FCM可被用来判断供者与受者配型是否合适,并鉴别和定型同种异体反应抗体。FCM还可通过监测移植后免疫表型的变化来预测移植后的免疫排斥反应、细胞免疫治疗效果以及移植的存活情况等,可以更敏感地预测排斥反应的发生,从而为临床治疗提供有效依据^[20]。FCM以检测速度快、检测方法灵活的优势来帮助器官移植患者治疗。

2 结语与展望

FCM作为临床上不可缺少的高新检测技术,为肿瘤、感染、免疫、生殖医学、血液等疾病的诊断和治疗以及基础研究提供了重要的信息和指标。流式细胞仪通过光学检测来了解机体细胞的生物学参数,在临床中被广泛应用于免疫检测、微生物检测、肿瘤检测、血液疾病检测以及其他生物检测,相信随着当今各种科学技术的快速发展,流式细胞仪将在医学检测领域得到更广阔的应用前景。我国在FCM应用在临床有一定的技术进展,但其发展水平及应用范围仍有待提高。

参考文献

- [1] 杭海英,刘春春,任丹丹.流式细胞术的发展、应用及前景[J].中国生物工程杂志,2019,39(9):68-83.
[2] 程小艳,武会娟.流式细胞术最新进展及临床应用[J].中

国免疫学杂志,2019,35(10):1271-1276.

- [3] 胡泽斌,李博,曲守方,等.流式细胞术检测试剂质量控制要点分析[J].中国药事,2021,35(10):1142-1148.
[4] 王卉,王爱先,甄军毅,等.流式细胞术在成熟淋巴细胞肿瘤诊断中的应用[J].中华临床实验室管理电子杂志,2017,5(2):81-88.
[5] 井楠,刘海峰,刘伟.流式细胞术检测初治活动性肺结核患者血清T淋巴细胞亚群计数分析[J].临床和实验医学杂志,2018,17(7):774-777.
[6] 朱立华,王建中.中国人血液淋巴细胞免疫表型参考值调查[J].中华检验医学杂志,1998,21(4):210-213
[7] BAILEY J E, FAZEL-MAKILESSI J, MCQUITTY DN, *et al.* Characterization of bacterial growth by means of flow microfluorometry [J]. Science, 1977, 198(4322): 1175-1176.
[8] 王兰平.流式细胞仪在医学检验中的应用[J].幸福家庭,2020,(9):124.
[9] 黄玉杰.流式细胞术应用于医学检验的研究进展[J].中国医疗器械信息,2019,(16):14-15.
[10] 王建中,王淑娟.当前临床流式细胞仪细胞分析的发展趋势[J].中华检验医学杂志,2002,25(1):5.
[11] 汪梅花,赵康.流式细胞术在急性白血病免疫分型中的临床应用[J].中国医刊,2018,(11):1233-1235.
[12] 汪洪涛,唐洁,姚春艳,等.《流式细胞术》课程分层次教学探索与实践[J].蚌埠医学院学报,2018,43(7):970-972.
[13] 黄国虹,李智伟,刘小双,等.流式细胞术在检验医学实践教学中的应用[J].中国卫生检验杂志,2018,(17):2174,2176.
[14] 郑美娟.流式细胞术在医学检验专业实习教学中的应用[J].安徽卫生职业技术学院学报,2018,(2):104-105+154.
[15] 王建红.流式细胞技术在医学检验中的应用研究进展[J].临床检验杂志(电子版),2017,(1):149-150.
[16] 米叶赛尔·阿不都拉,何川疆.流式细胞仪在医学检验中的应用分析[J].健康之路,2017,16(03):256.
[17] 崔晓鸣.流式细胞术应用于医学检验的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2016,37(18):2336-2337.
[18] 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.
[19] 孙蒂.再谈流式细胞术的广泛应用[J].中华医学检验杂志,2002,25(1):61-62.
[20] FUENTES-MASCORRO G, SERRANO H, ROSADO A. Sperm chromatin[J]. Arch Androl, 2000, 45(3): 215-225.