

• 经验交流 •

骨髓标本放置时间对流式细胞术白血病免疫分型检测结果的影响

宋建新, 朱红艳, 蒋雅先, 向自金

(云南省第一人民医院、昆明医学院附属昆华医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨白血病免疫分型骨髓标本不同保存时间对流式细胞术检测不同抗原标记的影响。方法 采集白血病患者骨髓标本, EDTA-K₂ 抗凝, 室温保存, 在不同时间标记荧光抗体并对细胞膜、细胞浆内抗原进行定量分析。结果 与 0 h 相比, 骨髓样品保存至 16 h 时, 膜表面抗原 CD3、CD19、CD13、CD33、CD117 荧光强度明显增高 ($P < 0.05$); 保存至 36 h 时阳性细胞数除 CD3 增高 ($P < 0.05$) 外, 其余均下降 ($P < 0.05$); 细胞浆内抗原 cCD3、cCD79a 在保存至 48 h 时平均荧光强度及细胞数变化均无统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 骨髓标本在室温下不同保存时间对白血病免疫表型检测有影响, 应在有效保存时间内完成检测。

关键词:骨髓; 流式细胞术; 标本放置时间; 白血病免疫分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.051

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)03-0391-02

流式细胞术(flow cytometry, FCM)对急性白血病的免疫分型, 是采用单克隆抗体对白血病细胞膜和胞浆内抗原进行定量检测, 从而判断白血病细胞的来源和分化阶段。目前关于外周血标本放置时间对细胞膜表面抗原标记影响的报道较多^[1-2], 而对骨髓标本细胞浆内抗原检测保存时间的研究鲜见报道。故本文对这一影响因素作一分析, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 增生极度活跃的急性非淋巴细胞白血病患者 10 例、急性 B 淋巴细胞白血病患者 10 例、急性 T 淋巴细胞白血病患者 10 例。诊断符合《血液病诊断及疗效标准》^[1]。

1.2 仪器及试剂 Beckman Coulter 公司 EPICS-XL 型流式细胞仪及荧光标准微球 Flow-Check。CD45-PE-Cy5、cCD3-FITC、cCD79a-PE、MPO-FITC、CD13-PE、CD33-FITC、CD117-PE、CD3-FITC、CD19-PE, 同型对照 IgG2a-FITC、IgG1-PE、IgG1-FITC 及透膜剂均为 Cmmunotech 公司产品。

1.3 样品制备 抽取骨髓 1.0 mL 用 EDTA 抗凝, 室温 (20 °C) 保存。标本检测前计算白血病细胞总数, 每批试验前用 PBS 稀释, 使反应体系中白血病细胞总数不超过 5×10^6 个。分别于抽骨髓后 0、2、4、8、16、20、24、30、36、48 h 用不同的单克隆抗体标记并设同型对照。

1.4 FCM 检测 用荧光标准微球 Flow-Check 校准流式细胞仪的光路和流路, 以 CD45-PE-Cy5/SSC 设门, 用同型对照设定阳性域值, 检测白血病细胞各抗原的表达, 每份样本均检测并

分析 10 000 个白血病细胞, 记录各抗原表达的荧光强度及表达的百分率。

1.5 统计学处理 使用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学分析, 各抗原表达的荧光强度及表达的百分率以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 骨髓标本保存不同时间抗原表达荧光强度的变化 见表 1。细胞膜抗原 CD3、CD19、CD13、CD33、CD117 抗原表达的荧光强度随着标本放置时间的延长而逐渐增高, 放置到 16 h 与 0 h 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞浆内抗原 cCD3、cCD79a 在保存至 48 h 荧光强度与 0 h 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 MPO 的荧光强度在保存至 36 h 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 骨髓标本保存不同时间细胞膜及细胞浆抗原表达百分率的变化 见表 2。细胞膜 CD3 表达的阳性细胞数在标本放置到 24 h 后逐渐增高, 放置到 36 h 与 0 h 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CD19、CD13、CD33 及 CD117 则在 24 h 后逐渐降低, 到 36 h 与 0 h 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞浆内抗原 MPO 在标本放置到 24 h 后逐渐降低, 到 36 h, MPO 阳性细胞数明显低于 0 h 检测的阳性细胞数 ($P < 0.05$), 而 cCD3、cCD79a 在保存到 48 h 与 0 h 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 骨髓标本保存不同时间对平均荧光强度的影响

| 保存时间(h) | CD3 | CD19 | CD13 | D33 | CD117 | MPO | cCD3 | cCD79a |
|---------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| 0 | 12.4 ± 2.14 | 7.68 ± 1.36 | 9.38 ± 2.33 | 6.67 ± 1.86 | 9.64 ± 2.19 | 8.46 ± 1.12 | 12.4 ± 2.48 | 5.58 ± 0.67 |
| 2 | 12.5 ± 2.11 | 7.69 ± 1.35 | 9.41 ± 2.35 | 6.64 ± 1.85 | 9.72 ± 2.21 | 8.51 ± 1.17 | 12.6 ± 2.51 | 5.56 ± 0.69 |
| 4 | 13.6 ± 2.12 | 7.71 ± 1.39 | 9.39 ± 2.30 | 6.69 ± 1.90 | 9.66 ± 2.17 | 8.44 ± 1.14 | 12.4 ± 2.46 | 5.60 ± 0.71 |
| 8 | 14.7 ± 2.18 | 7.67 ± 1.32 | 9.57 ± 2.37 | 6.72 ± 1.89 | 9.68 ± 2.20 | 8.54 ± 1.18 | 12.7 ± 2.50 | 5.61 ± 0.68 |
| 12 | 15.8 ± 3.16 | 8.34 ± 1.44 | 10.30 ± 2.44 | 7.36 ± 1.98 | 10.40 ± 2.75 | 8.33 ± 1.11 | 12.5 ± 2.47 | 5.58 ± 0.66 |
| 16 | 24.7 ± 4.36* | 13.60 ± 2.07* | 19.60 ± 3.18* | 11.50 ± 2.27* | 17.80 ± 3.27* | 8.26 ± 1.13 | 12.3 ± 2.48 | 5.57 ± 0.69 |
| 20 | 27.8 ± 6.19 | 15.50 ± 2.31 | 21.30 ± 3.27 | 13.60 ± 2.33 | 18.30 ± 3.30 | 8.28 ± 1.15 | 12.1 ± 2.44 | 5.62 ± 0.70 |
| 24 | 33.4 ± 8.21 | 15.90 ± 2.38 | 22.40 ± 3.34 | 14.00 ± 2.41 | 19.90 ± 3.54 | 8.02 ± 1.08 | 12.2 ± 2.37 | 5.55 ± 0.64 |
| 30 | 34.1 ± 8.13 | 14.70 ± 2.24 | 20.50 ± 3.07 | 13.10 ± 2.28 | 17.60 ± 3.18 | 7.49 ± 1.02 | 11.7 ± 2.31 | 5.53 ± 0.61 |
| 36 | 36.1 ± 8.45 | 12.30 ± 1.85 | 17.10 ± 2.46 | 10.80 ± 2.11 | 15.60 ± 2.89 | 5.26 ± 0.74* | 11.4 ± 2.29 | 5.54 ± 0.60 |
| 48 | 35.2 ± 8.37 | 9.21 ± 1.58 | 13.60 ± 2.17 | 8.25 ± 2.08 | 11.40 ± 2.51 | 2.17 ± 0.31 | 10.7 ± 2.16 | 5.50 ± 0.56 |

注:与 0 h 相比, * $P < 0.05$ 。

表 2 骨髓标本保存时间对抗原表达的影响 (%)

| 保存时间(h) | CD3 | CD19 | CD13 | D33 | CD117 | MPO | cCD3 | cCD79a |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 0 | 75.5±11.6 | 79.9±12.3 | 68.4±18.2 | 77.1±13.6 | 82.3±12.9 | 78.4±13.2 | 67.4±11.9 | 89.8±9.85 |
| 2 | 74.9±11.9 | 78.7±11.4 | 68.8±17.9 | 77.8±13.9 | 82.6±12.4 | 78.8±13.6 | 68.1±12.3 | 88.6±9.79 |
| 4 | 75.3±12.60 | 79.1±12.6 | 67.9±16.2 | 77.4±14.2 | 82.8±12.6 | 78.1±13.8 | 68.7±12.8 | 89.4±10.1 |
| 8 | 74.5±10.4 | 78.5±13.1 | 68.1±16.7 | 76.8±14.3 | 83.1±12.1 | 77.6±13.1 | 67.7±12.5 | 90.4±9.12 |
| 12 | 73.1±11.8 | 78.4±13.1 | 67.2±16.9 | 77.6±13.8 | 81.4±11.9 | 76.8±13.5 | 68.4±12.1 | 90.3±8.96 |
| 16 | 73.6±9.25 | 76.5±12.8 | 69.6±16.0 | 74.8±14.5 | 82.4±12.4 | 75.9±13.2 | 67.2±13.0 | 89.5±8.76 |
| 20 | 73.1±9.14 | 77.1±12.6 | 68.4±16.2 | 75.9±14.1 | 81.6±11.8 | 76.3±13.8 | 66.9±12.7 | 88.4±8.94 |
| 24 | 74.9±10.4 | 75.9±11.5 | 66.3±15.7 | 74.6±13.7 | 80.5±11.4 | 70.9±12.6 | 67.1±12.9 | 89.2±9.13 |
| 30 | 77.6±11.9 | 73.4±10.2 | 64.9±15.2 | 72.4±13.2 | 77.6±10.5 | 61.4±9.68 | 66.8±12.4 | 87.8±8.76 |
| 36 | 87.6±8.25* | 58.6±8.36* | 49.3±9.71* | 44.9±9.65* | 51.6±9.84* | 48.1±8.17* | 66.4±11.6 | 87.1±8.64 |
| 48 | 91.5±7.38 | 36.4±7.38 | 33.4±7.89 | 31.2±9.17 | 44.5±9.21 | 21.5±6.18 | 66.1±11.4 | 86.5±8.47 |

注:与 0 h 相比, * P<0.05。

3 讨 论

以 FCM 进行白血病的免疫表型分析已是现代血液学诊断恶性血液病、淋巴瘤不可缺少的重要标准之一^[4]。但由于受医院设备条件和地理等因素的限制,采样送检与上机检测时间往往不能紧密衔接,样品保存时间过长会影响结果。

本组测定结果显示,EDTA-K₂ 抗凝的骨髓标本,细胞膜 CD3、CD19、CD13、CD33、CD117 抗原表达在 16 h 内检测结果是可靠的;细胞浆内抗原 cCD3、cCD79a 在样品保存至 48 h 荧光强度与 0 h 相比变化差异均无统计学意义(P>0.05),而 MPO 的荧光强度在保存至 36 h 有显著降低(P>0.05)。故建议,对骨髓标本细胞膜荧光强度的检测,应在 16 h 内完成,而细胞浆内抗原除 MPO 应在 36 h 内完成外,cCD79a、cCD3 可在 48 h 内完成检测。

细胞膜 CD3 表达的阳性细胞数在标本放置到 24 h 后逐渐增高,放置到 36 h 与 0 h 相比差异有统计学意义(P<0.05),这是否与放置时间过长使 CD3 细胞膜通透性增加,胞浆内抗原暴露有关还有待于进一步研究。CD19、CD13、CD33 及 CD117 在样品放置 24 h 后逐渐降低,到 36 h 与 0 h 相比差异有统计学意义(P<0.05);细胞浆内抗原 MPO 在标本放置到

24 h 后逐渐降低,到 36 h MPO 阳性细胞数明显低于 0 h 的阳性细胞数(P<0.05),而 cCD3、cCD79a 在保存到 48 h 与 0 h 相比差异无统计学意义(P>0.05)。故建议,对骨髓标本阳性细胞数检测应在 36 h 内完成;而 cCD3、cCD79a 可在 48 h 内检测。

参考文献

- [1] 曹鲁宁,张玲珍,仲人前,等. 流式细胞仪检测人白细胞抗原-B27 的影响因素[J]. 检验医学,2007,22(3):233-234.
- [2] 张爱梅,翟志敏,徐修才,等. 标本放置时间及年龄对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的影响[J]. 免疫学杂志,2007,22(1):62-65.
- [3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:172-173.
- [4] 许艳丽,杜庆华,毛平. 50 例急性早幼粒细胞白血病流式免疫表型结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(12):1194-1195.

(收稿日期:2010-05-10)

• 经验交流 •

80 例冠心病患者血清中脂蛋白 a 及载脂蛋白 A1 和 B 的检测分析

饶 荣,刘志军

(湖北省房县人民医院检验科,湖北十堰 442100)

摘要:目的 探讨血清中脂蛋白 a [LP(a)]、载脂蛋白 A1(ApoA1)、载脂蛋白 B(ApoB)和 ApoA1/ApoB 在冠心病患者中的变化情况。方法 以 80 例冠心病为研究对象,110 例健康体检者作为对照组。空腹采血,测定血清中 LP(a)、ApoA1、ApoB 的浓度。结果 冠心病患者血清 LP(a)、ApoA1、ApoB 浓度及 ApoA1/ApoB 比值与对照组比较差异有统计学意义(P<0.01)。结论 血清 LP(a)、ApoA1、ApoB、ApoA1/ApoB 可用于综合评定冠心病患者的病情变化。

关键词:冠心病; 脂蛋白类; 载脂蛋白 A-1; 载脂蛋白 B 类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.052

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)03-0392-02

冠心病是(coronary heart disease,CHD)是世界范围内危害最大的心脏病,也是我国成人心脏病死亡的第 1 位原因。其形成和发展受许多因素的影响,包括血脂、炎症、遗传因素等。脂蛋白 a [LP(a)]、载脂蛋白 A1(ApoA1)、载脂蛋白 B(ApoB)则是其中的重要指标^[1]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组 110 例,男 65 例,女 45 例,平均年龄

(46.23±5.78)岁,为健康体检人群。CHD 患者 80 例,男 50 例,女 30 例,平均年龄(51.87±8.13)岁;其中稳定型心绞痛(SAP)25 例,男 14 例,女 11 例;不稳定型心绞痛(UAP)36 例,男 24 例,女 12 例;心肌梗死(AMI)19 例,男 12 例,女 7 例。

1.2 方法 冠脉造影采用 Judkins 法,按狭窄程度大于或等于 50% 为冠心病诊断标准。所有受试者清晨空腹,抽取静脉全血 5 mL 用肝素锂抗凝,LP(a)、ApoA1 和 ApoB 检测采用上