

• 临床检验研究 •

CyFlow Space 流式细胞仪 CD34⁺ 细胞绝对计数分析

杨玉琮, 程小丽, 陈 葳, 尤元义, 李 旭

(西安交通大学医学院第一附属医院分子医学实验室, 西安 710061)

摘要:目的 比较在 Partec CyFlow Space 流式细胞仪上采用不同设门方法计数 CD34⁺ 造血干细胞结果的差异。方法 采集经骨髓动员的患者外周静脉血标本 30 例, 在分别采用同型对照设门法和国际血液治疗与移植工程协会 (ISHAGE) 推荐设门法设置流式细胞仪后进行标本测定。结果 两种设门法标本计数结果具有相关性 ($r=0.990$), 但 ISHAGE 设门法的计数结果低于同型对照设门法 ($P<0.05$)。回收试验显示, ISHAGE 设门法计数不同细胞浓度标本的预期值与回收值的相关系数为 0.998 9; 对 3 种细胞浓度重复检测的变异系数为 2.2%~3.8%。结论 两种设门法计数 CD34⁺ 细胞的相关性较好, 但 ISHAGE 设门法更能反映造血干细胞的特点, 具有良好的准确度和精密度, 且无需同型对照抗体, 节约试剂, 更适合临床常规使用。

关键词: 流式细胞术; CD34 细胞计数; ISHAGE 方案,

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)13-1471-03

Research on absolute enumeration of CD34⁺ cells detected by CyFlow Space flow cytometry

Yang Yucong, Cheng Xiaoli, Chen Wei, You Yuanyi, Li Xu

(Laboratory of Molecular Medicine, the First Affiliated Hospital, Medical

School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To compare the difference of CD34⁺ cells counts detected by Partec CyFlow Space flow cytometry using two different gating strategies. **Methods** 30 peripheral blood samples were collected from patients after being treated by bone marrow mobilization, and measured by using ISHAGE gating strategy, recommended by the International Society for Hematotherapy and Graft Engineering, and isotype gating strategy. **Results** There was fine correlation between the results detected by the two methods ($r=0.990$), but the detection result of ISHAGE gating was lower than that of isotype gating strategy ($P<0.05$). Recovery test indicated that the correlation coefficient between expected and tested value was 0.9989, with the coefficient of variation was 2.2% to 3.8% when three samples with different cell concentration were detected by using ISHAGE gating strategy. **Conclusion** There could be fine correlation between the results detected by the two gating strategies, but ISHAGE gating strategy is more accurate, with lower cost, and more suitable for clinical laboratory application.

Key words: flow cytometry; CD34 absolute counts; ISHAGE guidelines

外周血 CD34⁺ 造血干细胞移植, 能够快速重建造血, 提供组织再生的干细胞, 已被广泛用于急、慢性白血病、某些实体肿瘤、免疫性疾病和遗传性疾病等的治疗。用流式细胞术进行精确、快速的 CD34⁺ 细胞绝对计数, 已成为临床评估骨髓动员和外周血造血干细胞采集、判断最佳采集时机的重要指标。CyFlow space 流式细胞仪通过定量进样体积, 计数该体积内的细胞数, 实现细胞绝对计数。本研究旨在比较两种不同设门方案, 以探讨 CD34⁺ 细胞计数的影响因素, 提高计数准确性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2009 年 8 月至 2010 年 10 月于本院行外周血造血干细胞移植的动员外周血标本 30 例, 分别于不同时间段采集自 16 例患者 (自体干细胞移植 10 例, 异基因干细胞移植 6 例)。

1.2 仪器与试剂 (1) 仪器: CyFlow space 流式细胞仪 (Partec, 德国)。 (2) 试剂: CD34-PE、CD45-PC5、同型对照 IgG1-PE 抗体 (IMMUNOTECH, 美国), 溶血素 (Beckman, 美国)。

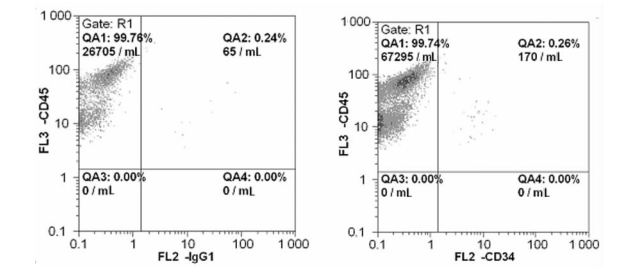
1.3 方法 (1) 仪器校准: 对 1 mL 标准微球进行检测, 确定仪器线性和峰值的变异系数 (CV) 在规定水平。 (2) 标本处理:

取 2 支试管标记为测定管和对照管, 测定管加入 CD45-PC5 和 CD34-PE 抗体, 对照管加入 CD45-PC5 和同型对照 IgG1-PE 荧光抗体, 每管加入抗体各 20 μ L, 检测标本 50 μ L, 充分混匀, 室温避光孵育 20 min 后加入溶血素 410 μ L 充分混匀, 室温避光孵育 10 min 后进行流式细胞仪分析。细胞浓度大于 1×10^6 /mL 的标本稀释后进行检测。按公式 (CD34⁺ 细胞浓度 = 仪器测定值 $\times 10 \times$ 稀释倍数) 计算结果。 (3) 准确度与精密度分析: 将 CD34⁺ 质控细胞 (白血病患者骨髓 CD34⁺ 细胞) 定量加入 Cyto-Trol 质控细胞 (健康人外周血质控物) 中, 范围为 0~48 000 /mL, 进行检测, 评价绝对计数的准确度。在 CD34⁺ 细胞 3 个浓度点, 即 8 000、16 000 和 24 000 /mL, 分别测定 8 次, 获得绝对计数的精密度^[1]。 (4) 设门方案: 同型对照设门法见图 1; International Society for Hematotherapy and Graft Engineering ISHAGE 设门法, 即采用多参数, 包括前向角散射 (forward scatter, FSC)、侧向角散射 (side scatter, SSC)、CD45 和 CD34, 分析靶细胞群, 获得目标细胞群的计数^[2-3], 见图 2。

1.4 统计学处理 采用 EXCEL2007 软件, 以配对秩和检验 (Wilcoxon) 对采用两种设门法获得的绝对计数结果进行比较, $P<0.05$ 时比较差异有统计学意义, 并对结果进行相关分析^[4]。

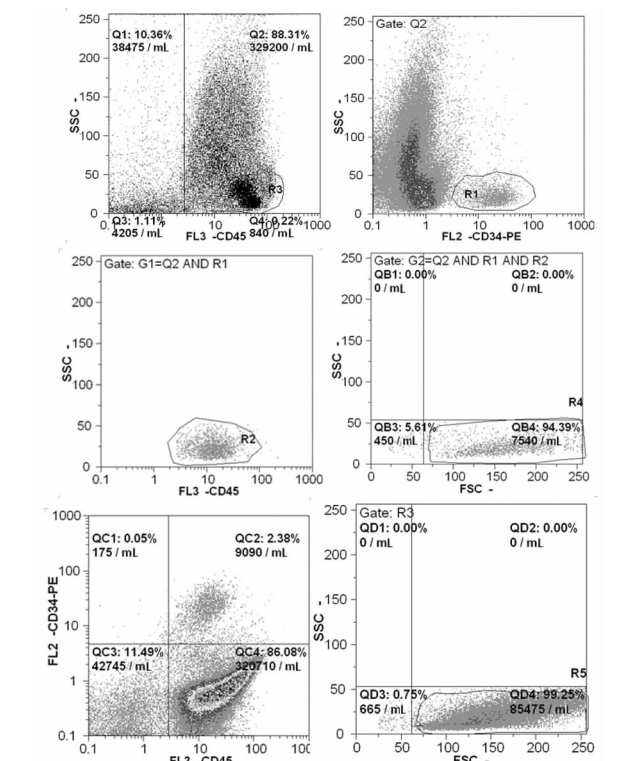
2 结 果

2.1 检测结果比较 以两种方法分别检测 30 例标本,绝对计数结果的相关系数为 0.99 ($P<0.05$),方程为 $Y=0.908X-1.989$ 。配对秩和检验 (Wilcoxon) 显示,两种方法检测结果的差异具有统计学意义 ($P<0.05$),ISHAGE 设门法计数结果低于同型对照设门法。



注:左图为同型对照,右图为 CD34 标记,以同型对照为参照,设定十字门,确定阳性区域 Q2,得到测定标本的 CD34⁺ 细胞数,CD34⁺ 细胞数=CD34 标记阳性细胞数-同型对照细胞数。

图 1 同型对照设门法



上左图:CD45/SSC 双参数图,确定 CD45⁺ 的细胞 Q2,排除 CD45⁻ 细胞和颗粒(红细胞、血小板和碎片);上右图:CD34/SSC 双参数图,以 Q2 细胞群设门,将所有 CD34⁺ 或弱阳性以及 SSC 信号弱及中等的细胞设为 R1 区域;中左图:CD45/SSC 双参数图,以满足 Q2 和 R1 设门,SSC 低到中等、CD45 低到中等荧光强度的细胞群为 R2;中右图:将 R2 区域的细胞显示在 FSC/SSC 双参数图中分析,并建立 R4 区以准确包含 FSC 较大的细胞为造血祖细胞,得到 CD34⁺ 细胞计数;下左图:CD34/CD45 双坐标图,用于确保第 1 张图的设门 Q2 包含 CD45 弱阳性造血祖细胞;下右图:FSC/SSC 双参数图,用于确定 FSC 阈值的设定没有丢失淋巴细胞(R3),但可将血小板等排除在外。

图 2 ISHAGE 设门法

2.2 准确度分析 在 100 μ L Cyto-Trol 质控细胞中,分别加

入 8 000、16 000、24 000、32 000、40 000 和 48 000 个 CD34⁺ 质控细胞,经 CD34-PE/CD45-PC5 抗体标记后以 ISHAGE 设门方法进行计数,测得回收值分别为 8 600、16 485、24 770、32 075、41 635、47 910,分别以期望值与回收值为 X、Y 轴作图,得到回归曲线,回收值与期望值的相关系数为 0.998 9,方程为 $Y=0.979X+1.315$ 。

2.3 精密度分析 取 CD34⁺ 细胞浓度分别为 8 000、16 000、24 000 /mL 的标本分别检测 8 次,计算结果均值和 CV(表 1)。

表 1 精密度分析

期望值 (/mL)	实测值				
	最小值 (/mL)	最大值 (/mL)	均值 (/mL)	标准差 (/mL)	CV (%)
8 000	7 325	8 350	7 859.4	298.7	3.8
16 000	16 330	17 540	17 071.9	376.2	2.2
24 000	23 445	26 030	24 544.4	810.0	3.3

3 讨 论

流式细胞仪通常采用双平台技术或单平台标准微球技术进行绝对细胞计数^[5]。双平台技术需要同时应用流式细胞仪检测标本中阳性细胞百分比和血球计数仪检测标本的绝对细胞数,通过计算检测结果的乘积得到样本中阳性细胞的绝对细胞数。单平台标准微球技术只需要流式细胞仪进行标本检测,但标本中需加入外源性的参照标准微球作为检测的内对照,因此在操作中必须使用含定量标准微球的特殊测试管^[6]。两种技术都需要在流式细胞仪之外,附加其他的检测条件才能进行绝对计数,操作复杂且成本较高。CyFlow space 流式细胞仪采用定量进样体积的新技术,使流式细胞仪同时具有血细胞计数仪的功能,可以进行绝对计数^[7-8]。该项技术已在艾滋病的检测中得到广泛应用,通过对艾滋病患者外周血中 CD4⁺ 细胞绝对计数的动态观察,可以协助判断疾病进程、观测疗效和判断预后^[9-10]。

外周血 CD34⁺ 造血干细胞移植,能够快速重建造血,为组织再生提供干细胞^[11]。本研究显示,CyFlow space 流式细胞仪计数 CD34⁺ 细胞的准确度与精密度均较好,可为临床提供准确的 CD34⁺ 细胞计数结果,有助于为临床骨髓动员和外周血造血干细胞移植提供重要的参考依据,协助临床评估造血干细胞的采集效果和判断最佳采集时机。

本研究对传统的同型对照设门法和 ISHAGE 设门法检测结果进行了比较,证实两种方法检测结果虽然具有一致性,但前者的检测结果高于后者,可能与部分 CD45 强阳性的干扰细胞进入 CD34⁺ 区域有关。这些干扰细胞主要是聚集的细胞团,其 FSC 和 SSC 较高,由于其体积大、背景高,形成 CD45 强阳性和 CD34⁺ 干扰;而造血祖细胞为不成熟细胞,其 CD45 表达为弱到中等强度,其 FSC 和 SSC 均不会超过淋巴细胞和粒细胞。ISHAGE 设门法通过 CD34/SSC 双参数图,以 CD34⁺ 及 SSC 为弱及中等强度的细胞为目标细胞进行设门,排除了聚集的细胞团由于背景高而造成的假阳性,因此获得的结果更为准确。

ISHAGE 设门法通过 4 个参数(FSC、SSC、CD34、CD45)、6 张双坐标直方图、三层叠加设门的方法,将 CD34⁺ 造血细胞

从细胞群体中分离出来。笔者发现以 ISHAGE 设门法检测同型对照管的 CD34 计数结果为 0/mL(结果未示),证实可以不设同型对照测试管。因此 ISHAGE 设门法可节省试剂成本,减少检测耗时,具有较高的工作效率,适合在临床推广^[12]。

综上所述,CyFlow space 流式细胞仪应用 ISHAGE 设门法可作为检测外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数的可靠方法。

参考文献

[1] Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines[J]. Cytometry, 1998, 34(2): 61-70.

[2] Sutherland DR, Keating A, Nayar R, et al. Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry[J]. Exp Hematol, 1994, 22(10): 1003-1010.

[3] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry[J]. J Hematother, 1996, 5(3): 213-226.

[4] 李山, 黄鹏, 易珍, 等. 同一厂家不同型号血液分析仪检测结果的可比性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 833-834.

[5] 刘艳荣, 陈珊珊, 于弘. 流式细胞术计数 CD34 阳性细胞的标准化和质量控制[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(4): 302-306.

[6] Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ Cells in Cord Blood: a variation on a single platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy[J]. Cytometry, 2001, 46(4): 254-261.

[7] Cassens U, Göhde W, Kuling G, et al. Simplified volumetric flow

cytometry allows feasible and accurate determination of CD4⁺ T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide[J]. Antivir Ther, 2004, 9(3): 395-405.

[8] Pattanapanyasat K, Lerdwana S, Noulisri E, et al. Evaluation of a new single-parameter volumetric flow cytometer (CyFlow green) for enumeration of absolute CD4⁺ T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected thai patients[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(12): 1416-1424.

[9] Fryland M, Chaillet P, Zachariah R, et al. The partec CyFlow counter could provide an option for CD4⁺ T-cell monitoring in the context of scaling-up antiretroviral treatment at the district level in Malawi[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006, 100(10): 980-985.

[10] Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, et al. Evaluation of the Partec Flow Cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(3): 293-298.

[11] 凌艳英, 邓家德, 陈江玲, 等. 血小板相关参数在造血干细胞移植后巨核系重建中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 427-429

[12] Keeney M, Gratama J, Chin-Yee I, et al. Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34⁺ stem/progenitor cells by flow cytometry -time to lets go[J]. Cytometry, 1998, 34(6): 280-283.

(收稿日期: 2011-01-04)

(上接第 1470 页)

以 TP_sAb 检测作为初筛试验, 尤其是对于需要对大量标本进行检测的综合医院、疾控中心等医疗卫生机构。对于 TP_sAb 阳性患者再行非螺旋体特异抗体试验检测, 依据血清滴度作为诊断依据并用于指导治疗和评价疗效, 有利于进一步避免漏诊和误诊、提高疗效和监测病情。对于存有疑问的标本, 建议同时采用两种不同的方法进行平行测定, 并结合患者的临床表现、社会关系、生活情况等综合考虑。

综上所述, 全自动化学发光免疫分析仪是自动化程度高、数据保存方便、有利于实现质量控制的检测系统, 具有重复性好、高灵敏度、高特异性、抗干扰能力强等优点, 值得在临床推广应用。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心公共卫生监测和信息服务中心. 2007 年 12 月中国甲乙丙类传染病疫情动态简介[J]. 疾病监测, 2008, 23(1): 4.

[2] 中华人民共和国卫生部. 中国预防与控制梅毒规划(2010~2020 年)[R]. 北京: 卫生部, 2010.

[3] 张学军, 刘维达, 何春淦. 现代皮肤病学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 991-994.

[4] England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, et al. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for dif-

ferential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications[J]. Clin Lab Hematol, 1994, 16(2): 157-174.

[5] 杨昌国, 张抗. 线性评价和干扰试验中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(3): 184-186.

[6] Kadioglu P, Aöbay O, Demir G, et al. The effect of prolactin and bromocriptine on human peripheral immune status[J]. J Endocrinol Invest, 2001, 24(3): 147-151.

[7] 王长海, 吕长坤. 梅毒螺旋体感染筛选方法的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 609-610.

[8] 尹建奇, 李晓娥, 刘平等. 2 592 份血清中梅毒血清学生物学假阳性结果的临床分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2001, 15(5): 317-318.

[9] 中华人民共和国卫生部. WS 273-2007 梅毒诊断标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

[10] Juárez-Figueroa L, Uribe-Salas F, García-Cisneros S, et al. Evaluation of a rapid strip and a particle agglutination tests for syphilis diagnosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59(2): 123-126.

[11] 沈云松, 董云华, 金敏, 等. 化学发光法定量检测乙型肝炎病毒标志物临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 437-438.

[12] 王露楠, 邓巍, 李金明. 梅毒螺旋体感染不同血清学诊断方法的临床评价[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(6): 353-355.

(收稿日期: 2011-01-10)