

• 专家述评 •

临床流式细胞学检验的现状与未来

吴丽娟

(中国人民解放军成都军区总医院检验科, 成都 630083)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1659-02



吴丽娟

流式细胞计量术(flow cytometry, FCM), 是英文 flow(流动)、cyto(细胞)和 metry(测定, 测量)的组合名词, 也可以翻译为“流式细胞测定技术”或“流式细胞测量技术”, 简称“流式细胞术”。FCM 的称谓将该技术检测的对象是细胞, 细胞被检测时处于一种流动状态以及检测的性质是定量检测都形象地进行了概括。

FCM 诞生于上世纪四、五十年代, 至七、八十年代已经在细胞生物学研究领域作为单个细胞功能的一种定量测定技术备受生物医学研究者的青睐。八十年代后, FCM 开始进入临床应用领域, 目前已经被广泛应用于临床血液学、临床免疫学、肿瘤学、遗传学等疾病的诊断与鉴别、病情监测、疗效评估和预后判断等, 悄然成为临床检验医学领域继基因诊断(gene diagnosis)后又一门新兴技术——临床流式细胞计量技术(clinical flow cytometry, CFC)。与 FCM 一样, CFC 也可以称为“临床流式细胞测量技术”或“临床流式细胞测定技术”。考虑到国内检验医学领域对其分支亚学科的称谓习惯, 笔者建议将 CFC 翻译成“临床流式细胞学检验技术”, 简称“流式检验”。进入 21 世纪以来, CFC 迎来了前所未有的大好发展时机, 国内医院检验科纷纷购置流式细胞仪和开展相应临床检验项目, 其应用迅速得到推广。

目前国内外主要开展的 CFC 检验项目包括:(1)白血病免疫分型。世界卫生组织(WHO)白血病实验室诊断标准明确要求除进行骨髓细胞形态学(morphology)检查外, 还需要对肿瘤细胞进行免疫分型(immunophenotyping)和细胞遗传学(cytogenetics)检查, 简称 MIC。免疫分型中一般需要使用 20~25 种抗体对可疑肿瘤细胞的细胞表面和胞内蛋白标志进行定性、定量测定, 回答骨髓细胞标本中是否含有肿瘤细胞、肿瘤细胞属于哪种细胞类型、处于分化发育的哪个阶段, 以及肿瘤细胞

是单克隆来源还是多克隆来源等疑问。迄今为止, 白血病免疫分型是 CFC 开展最为成熟、标本最多的检验项目之一。(2)淋巴瘤分型与诊断, 包括血液及组织淋巴瘤的分型与诊断。目前国内开展情况不及白血病免疫分型, 主要是在医科大学附属医院以及北京、上海、广州等地的三甲医院开展。(3)淋巴细胞亚群测定。如外周血淋巴细胞亚群测定, 最常见的项目包括 T 细胞、B 细胞和自然杀伤(NK)细胞亚群的测定, 其中 T 细胞亚群又进一步包括总成熟 T 细胞($CD3^{+}$)、T4 细胞($CD3^{+}CD4^{+}$)和 T8 细胞($CD3^{+}CD8^{+}$)亚群的测定, 并通过获得的 T4 细胞和 T8 细胞百分含量计算 T4/T8 比值($CD4^{+}/CD8^{+}$)。淋巴细胞亚群测定可以从总体上反映患者的免疫功能状态, 不仅需要测定总成熟 T 细胞、T4 细胞、T8 细胞、B 细胞和 NK 细胞在淋巴细胞中的百分含量, 还需要通过标准荧光微球(单平台法)或白细胞总数(涉及全自动血细胞计数仪测定白细胞总数, 称双平台法)获得上述各种淋巴细胞亚群的绝对含量。理论上, 上述淋巴细胞亚群百分含量的总和应该等于或接近 100%, 但实际应用特别是面对临床疑难病例时, 时常与理论推导不一致, 如急性感染引起形态学成熟但表面分化抗原(CD)表达尚未成熟的亚成熟淋巴细胞如双阳性 T 细胞($CD3^{+}CD4^{+}CD8^{+}$)和双阴性 T 细胞($CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$)释放入外周血或淋巴细胞 $CD3$ 、 $CD4$ 、 $CD8$ 表达严重减少甚至缺失等情况。淋巴细胞亚群测定是 CFC 开展最为成熟、标本最多的第二大检验项目。(4)淋巴细胞人类白细胞抗原(HLA)-B27 表达测定。该项目用于临床对强直性脊柱炎(AS)的鉴别诊断和高危人群筛查。(5) $CD34^{+}$ 干细胞测定。该项目主要用于临床干细胞移植治疗中对分离获得的治疗用干细胞进行质量监测, 包括总 $CD34^{+}$ 细胞、 $CD34^{+}CD38^{-}$ 细胞(造血干细胞)和 $CD34^{+}CD38^{+}$ 细胞(造血祖细胞)百分含量和绝对含量的测定。(6)血细胞 $CD55$ 和 $CD59$ 表达测定。该项目用于临床对阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)的诊断。(7)血小板活化测定。该项目用于临床心脑血管疾病及其手术或药物治疗中血小板活化的监测。(8)血小板膜糖蛋白测定。该项目用于血小板膜糖蛋白表达异常相应遗传性疾病的诊断。(9)血小板相关免疫球蛋白测定。该项目主要用于血小板减少性紫癜的鉴别诊断。(10)细胞周期与 DNA 倍体测定。该项目主要用于临床血液恶性

吴丽娟:1989 年毕业于重庆医科大学首届医学检验专业五年制本科班, 1999 年在第三军医大学全军免疫学研究所获硕士学位, 2004 年在重庆医科大学检验系及第三军医大学野战外科研究所的联合培养下获博士学位。1996~1997 年在北京军事医学科学院分子免疫学研究室进修, 2004 年在香港城市大学生物医药研发中心任高级研究主任。1989~2009 年先后在第三军医大学西南医院、大坪医院检验科任医师/助教、主治医师/讲师、副主任医师/副教授/研究生导师、全军检验医学专委会委员、中国临床微生物学专委会委员。2010 年至今任成都军区总医院检验科主任医师/教授/科副主任、第三军医大学兼职研究生导师。吴教授长期致力于检验医学临床、教学、科研工作, 在感染免疫、基因诊断及血液学检验领域造诣较深, 近年来集中精力于临床流式细胞学检验的理论与技术研究, 以及流式检验项目的临床应用与推广、方法学标准化与规范化、流式检验数据挖掘等研究。

肿瘤的疗效监测和浆膜腔积液脱落细胞肿瘤性质的鉴别等。自动化组织标本单细胞悬液自备技术攻克后,该项目必将成为实体肿瘤诊断的主要工具,弥补肿瘤病理学诊断时间长、客观性差等不足。(11)炎症细胞因子测定。该项目利用荧光微球捕获溶解在水溶液中的蛋白质或多肽分子对其定量测定,目前能够检查肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、IL-6 等常见细胞因子。

大规模临床推广也暴露出 CFC 存在的一些问题,最主要的问题是方法学不统一、检验流程不规范、报告内容及报告格式不统一、参考范围多来自国外文献报道等。上述问题不能及时解决,已经造成不同实验室的流式检验结果之间离散度大、缺乏可比性的现实问题。

美国临床实验室质量管理 CLIA'88(临床实验室质量保证计划)法案中明确指出,FCM 属于高复杂性实验测试类别,对人员、设备和技术均提出了很高的要求。一流的设备自有流式细胞仪厂商解决;一流的技术人员需要建立严格的管理制度来培养,应有最低的入门学历要求,以及系统、规范的理论与技术培训和考核制度,施行专门的上岗证考试制度等;技术上,应将 CFC 及时纳入卫生部颁布的《临床检验操作规程》中,向实验室推荐流式检验项目及其标准化检验流程;卫生部临床检验中心应组织开展 CFC 的实验室定期参加覆盖其全部流式检验项目的室间质量考评活动(目前仅是对淋巴细胞亚群中的某些项目实行 1 年 1 次的质控考评),对于参加质量考评活动不能达标的实验室坚决予以关闭直至达到要求为止。因此,需要尽快在中华医学会检验医学专委会中建立临床流式细胞学检验学会,在卫生部临床检验中心成立独立的流式专业组,以制定针对中国临床流式细胞学检验的管理办法和流式检验项目的操作规范及报告规范,组织各级学术活动,迅速提升国内流式检验质量参差不齐、具体检验项目方法学多种多样的局面。

CFC 目前还不能做到全自动分析,流式细胞仪仅仅是检验流程中最终用于荧光测定的设备,即便排除试剂不同的影响,上机前单细胞悬液的制备、细胞的免疫荧光染色、溶血处理等均均为手工操作,而单细胞悬液制备的具体方法步骤、细胞免疫荧光染色的时间和温度、溶血后上机测定的时间间隔等都可能对检验结果造成影响。上机测定时,由于存在仪器液压、气压和荧光补偿的调节,使技术人员掌控仪器的难度增大,由于仪器性能未调节到针对某具体细胞标本的具体测定项目的最佳性能状态,其检测结果的准确性遭到质疑。另外,上机测定时所使用的检测方案灵活多变,即使是采用同样的试剂,方案不同,其检测结果也可能存在差别。总之,有效控制上机前检验流程和上机检验流程对检验结果的影响,必须走研发全自动单细胞悬液制备仪、全自动流式细胞分析仪的道路,只有流式检验的全程实现了自动化,做到方法学的统一、检验流程的标准化和可重复,才能确保检验结果的准确性以及不同实验室检测结果之间的可比性。

CFC 具体检验项目的标准化与规范化已经迫在眉睫,眼下急需开展关于流式检验通用程序如标本采集及运送程序、单细胞悬液制备程序、免疫荧光染色方法及程序、溶血/免洗方法及程序、常用分群方法(如 FSC/SSC 分群法、CD45/SSC 分群法、CD45/FSC 分群法)等当中可能存在的因素对流式检验结果的影响,为制定适合中国国情的流式检验操作规程提供科学

依据。同时,还需要对以往临床应用资料进行大量回顾性调查,反馈各种流式检验项目的方法学评价指标并总结其临床意义,为最大化挖掘流式检测数据的有用医学信息,调整和规范检验报告提供第一手资料。

CFC 分析的对象是单个悬浮存在的细胞。目前开展的流式检验项目主要是针对全血细胞进行检测的项目,关于脱落细胞、实体组织细胞的分析还很缺乏,因此 CFC 下一个发展方向应该是在脱落细胞和实体组织细胞检验项目中得到广泛应用,如取代脑脊液常规检验、胸腹腔积液常规检验的流式脑脊液细胞学分析、胸腹腔积液细胞学分析,补充病理学检查的流式实体组织细胞 DNA 分析,以及流式关节腔积液细胞学分析、前列腺液细胞学分析和阴道分泌物细胞学分析等,充分体现流式单细胞定量分析快速、准确和客观的特点。另外,流式单个悬浮细胞分析也可以将“单个细胞”向“单个颗粒”扩展,如将 CFC 用于临床病原微生物感染的快速诊断,开创肠道微生态、阴道微生态、呼吸道微生态失衡分析等新项目,以及进一步扩大基于荧光微球捕获技术建立的流式蛋白质、多肽定量测定等。

CFC 虽然已经在临床得到多方面的应用,但是其试剂的开发远远落后于临床应用的推广。目前实验室可得的流式试剂,许多的标签仍然是“for research”(科研专用),而不是“for diagnosis”(临床诊断专用),国产试剂更无踪影。流式检验市场对试剂的渴求将催生流式相关试剂的研发,国产试剂的诞生被寄予厚望。尽早实现流式试剂的国产化可以打破目前美国 BD 公司和 Beckman Coulter 公司对中国流式检验试剂的独占局面,降低流式检验的高昂试剂成本,有利于 CFC 的健康发展。

另外,关于流式检验收费仍然是目前普遍存在的问题。一方面各地卫生局制定的物价收费目录没有及时纳入各种流式检验项目,许多地方的收费目录只有粗糙的“流式法血细胞分析”项,不能体现不同检验项目试剂费用和检验程序难易程度的差别;另一方面,同样的检验项目在不同的地区或不同的单位收费标准相差较大,或者同样的检验项目用不同的名称登记生成的收费标准相差较大等。合理收费、规范收费是 CFC 急需解决问题之一。

最后需要指出的是,CFC 临床宣传还不够理想。一个崭新检验技术的兴起离不开临床对其应用的需求和肯定,CFC 的宣传不应该只停留在医学检验人员中,需要走出检验科,走向临床,向更多的医生们宣讲,以便更好地服务于广大患者。

回首历史,FCM 的诞生早于 PCR 几十年,但是 FCM 走进临床却几乎与 PCR 同时期,在临床得以推广甚至晚于 PCR。抛开试剂、仪器开发的原因,FCM 技术难度高、检测流程灵活、影响因素多是困扰其临床应用推广的主要原因。面对诸多摆在 CFC 面前的难题,研究者并没有退却,更多的技术专家与管理者们迎难而上,相信不久的将来这些问题终将一一解决,CFC 将如同今日的血液学检验、生化检验、免疫学检验一样,为更多的医务人员和患者接受,成为检验医学技术平台的主力军之一。