

• 基础实验研究 •

T 淋巴细胞亚群绝对值测定 CD45/SSC 设门法和
CD3/SSC 设门法的比较研究

欧阳红梅, 张 芹, 蒋雅先, 朱红艳, 甸自金, 宋建新

(昆明医学院附属昆华医院/云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 比较流式细胞仪两种设门方法测定外周血中 T 淋巴细胞亚群绝对值的差异。方法 收集 20 例患者的外周全血, 分别采用 CD45/SSC、CD3/SSC 两种设门方法测定 T 淋巴细胞亚群的百分率和绝对值, 将同一标本测得的两个结果进行配对 t 检验, 并对 T 淋巴细胞亚群绝对值做进一步分析, 计算其线性方程。结果 两种方法测得的 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 淋巴的绝对值差异无统计学意义 ($P>0.05$); 但 $CD3^+CD8^+$ 淋巴的绝对值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。两种方法测定 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 淋巴绝对值的相关性良好。结论 两种方法测定 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 淋巴的绝对值结果一致, 均可作为 CD3、CD4 细胞绝对值的测定方法, 并且可以相互补充。

关键词: 流式细胞术; T 淋巴细胞亚群; 绝对计数

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1694-02

Comparision of CD45/SSC and CD3/SSC gating methods on absolute count of T-lymphocyte subsets

Ouyang Hongmei, Zhang Qin, Jiang Yaxian, Zhu Hongyan, Dian Zijin, Song Jianxin

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical College/the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To compare two different gating method on the absolute count of T-lymphocyte subsets in peripheral blood. **Methods** Peripheral blood collected from 20 cases of patients were detected by using flow cytometry (FCM) with CD45/SSC and CD3/SSC gating method respectively for percentage and absolute count of T-lymphocyte subsets. Two results, detected by two gating methods, of the same sample, were statistically analyzed by paired t test. The coefficients of correlation for absolute T cells were calculated. **Results** There were no significant differences between the absolute counts of $CD3^+$ and $CD3^+CD4^+$ cells detected by the two methods ($P>0.05$). But there was difference of the absolute counts of $CD3^+CD8^+$ cells ($P<0.05$). **Conclusion** There was fine coincidence between the two gating methods for the absolute counts of $CD3^+$ and $CD3^+CD4^+$ cells. These two gating methods could both used and complement for each other for the absolute counts of CD3 and CD4 cells.

Key words: flow cytometry; T-Lymphocyte subsets; absolute count

流式细胞术 (FCM) 是综合应用光学、机械学、流体力学、电子计算机、细胞生物学、分子免疫学等学科技术, 以高能量激光照射高速流动状态下被荧光色素染色的单细胞或微粒, 测量其产生的散射光和发射荧光的强度, 从而对细胞或亚细胞进行快速定量测定和分析的方法。FCM 计数血液 T 淋巴细胞亚群已成为临床医学中最常用的检查项目之一, 对于评价机体的免疫功能、诊断与监测免疫性疾病如艾滋病、原发性免疫缺陷病、严重急性呼吸综合征 (SARS)、自身免疫病、恶性肿瘤、器官移植等具有重要意义^[1-4]。然而, 血液淋巴细胞亚群计数的方法较多, 所涉及的多种因素均可直接或间接的影响分析结果的准确度和精密度^[5]。利用多个荧光探针标记淋巴细胞表面的不同表型, 从而实现了淋巴细胞同源亚型分析和绝对计数^[6], 通常采用双平台法和单平台法, 但是单平台法试剂成本较高, 而双平台法所用的仪器现在大多实验室都能满足且试剂成本较低, 故双平台法容易被很多实验室接受。目前常采用 FSC/SSC、CD45/SSC 和 CD3/SSC 3 种设门方法。为研究哪一种双平台法更适合用于外周全血的分析, 笔者采用 CD45/SSC 和 CD3/SSC 两种不同设门方法, 拟对外周全血淋巴细胞亚群行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取云南省第一人民医院 20 例门诊患者的外周静脉血 2 mL (EDTA- K_2 抗凝), 无凝血或溶血现象。

1.2 仪器与试剂 采用美国 Beckman Coulter 公司生产的

EPICS-XL 流式细胞仪, 日本 Sysmex 公司的 SE-9000 全自动血细胞计数仪; 所用荧光标记抗体包括 CD3-FITC、CD4-PE、CD8-PE、CD45-PE-Cy5 和溶血剂均为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 外周血淋巴细胞亚群测定 全自动血细胞计数仪测定患者外周血, 记录白细胞绝对值及淋巴细胞绝对值, 然后加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 调整白细胞浓度至 $(1\sim6)\times 10^9/L$ 。加入 CD45-PE-Cy5 和 CD3-FITC 单克隆抗体 10 μL , 再分别加入 CD4-PE、CD8-PE 单克隆抗体 10 μL , 在每管中加入细胞混悬液 50 μL 。摇匀后室温下避光孵育 20 min, 溶血后上机分析。

1.3.2 CD45/SSC 设门法 以 CD45 为横轴, 侧向角 (SSC) 为纵轴, 从流式细胞仪上可显示外周血中性粒细胞群、单核细胞群、淋巴细胞群, 设白细胞群为 E 门, 淋巴细胞群为 A 门。从 A 门可获取 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 细胞的百分率。

1.3.3 CD3/SSC 设门法 以 CD3 为横轴, SSC 为纵轴, 设白细胞群为 E 门, CD3 淋巴细胞群为 F 门。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件, 数据变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间数据比较采用 t 检验, 相关分析采用相关性检验, 以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 两种方法测得的 20 例患者的结果比较 两种设门方法所测得的 CD3 和 CD4 细胞绝对值差异无统计学意义 ($P>$

0.05),而采用 CD45/SSC 设门法测得的 CD8 细胞绝对值高于 CD3/SSC 设门法,差异有统计学意义($P=0.011$),见表 1。

表 1 CD45/SSC 与 CD3/SSC 设门法检测淋巴细胞亚群结果比较

指标	CD45/SSC	CD3/SSC	<i>P</i>
CD3 ⁺ 细胞(%)	64.4±8.75	—	—
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞(%)	34.2±8.65	—	—
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞(%)	25.4±7.29	—	—
CD3 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	907.6±593.9	926.5±589.1	0.650
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	475.5±277.7	501.4±285.7	0.078
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	388.0±293.3	364.7±284.4	0.011

—:无数据。

2.2 两种设门方法测定结果的线性方程及相关系数 对相关系数(r)进行相关性分析,结果 P 均小于 0.05,表明采用两种设门方法所测得的绝对值结果性关系良好。见表 2。

表 2 CD45/SSC 与 CD3/SSC 设门检测淋巴细胞亚群绝对值的相关性分析

指标	线性方程	相关系数(r)
CD3 ⁺ 细胞绝对值	$Y=0.944\ 5X+69.241$	0.962
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞绝对值	$Y=1.003\ 9X+23.973$	0.999
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞绝对值	$Y=0.964\ 9X-9.698$	0.995

3 讨 论

利用 FCM 分析血液标本中 T 淋巴细胞亚群的方法很多,常用的有 FSC/SSC、CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法等。FSC/SSC 设门法是利用细胞的前向散射角和侧向散射角即光散射物理特性来设门识别淋巴细胞。这种设门方法由于没有考虑细胞的生物学特性,容易受到多种因素如有核红细胞、单核细胞、小的粒细胞、嗜碱性粒细胞等的干扰,无法将具有相同光散射特性的淋巴细胞和干扰杂质准确区别开来,使淋巴细胞百分率计算不准确而常导致分析结果产生误差。

引入 CD45、CD3 单克隆抗体测定 T 淋巴细胞亚群绝对值是基于细胞的生物学特性,使用多参数 FCM 分析。许多学者证实,CD45 是一种表达于白细胞的分化抗原,造血系统细胞 CD45 的荧光强度(FI)与细胞分化程度有关,即分化程度高的成熟白细胞,其 CD45 的 FI 也高,分化程度低的细胞其 FI 也低,而红系细胞的 FI 最低。在成熟白细胞中,各类细胞 CD45 的 FI 亦不相同,其中淋巴细胞和单核细胞的 FI 高于中性粒细胞。因此,根据各类细胞 CD45 的 FI 和颗粒密度不同,采用 CD45/SSC 设门法可以将原始细胞(低 FI、低或高 SSC)、淋巴细胞(高 FI、低 SSC)、单核细胞(高 FI、中等 SSC)、中性粒细胞(低 FI、高 SSC)、红系细胞(最低 FI、低或高 SSC)和细胞碎片(最低 FI、最低 SSC)清楚地区分开。CD45/SSC 设门法是以 CD45 在细胞膜表达强度及颗粒的多少来区分细胞群,设定的细胞群为 CD45 高表达、低 SSC 的淋巴细胞,排除了非淋巴细胞的影响,从而保证了所分析的全是淋巴细胞。CD3 是一种表达于 T 淋巴细胞的分化抗原,具有更高的特异性,采用

CD3/SSC 设门法可以将 CD3⁺细胞和 CD3⁻细胞清楚地区分开,因此该设门法具有更高的准确性。目前大多实验室都采用 CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法对淋巴细胞亚群绝对值进行分析,但对两种方法的结果比较尚未见报道。本实验结果显示,CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法测定 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞绝对值差异无统计学意义($P>0.05$),其结果相关性良好^[7]。

笔者发现,CD3/SSC 设门法得到的数据比较有限,较 CD45/SSC 设门法可提供的信息少。比如 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞占淋巴细胞的比例在 CD3/SSC 设门中无法得知(见表 1),因此,笔者建议在一般情况下采用 CD45/SSC 设门法。但 CD45/SSC 设门法也有缺陷性^[8-10]:当淋巴细胞群与其他细胞群分离不佳时,很难将所有淋巴细胞都区分出来,这时只有采用 CD3/SSC 设门法才能将 CD3⁺细胞和 CD3⁻细胞分离开来。目前,实验室常常结合使用 CD45/SSC 和 CD3/SSC 两种设门方法进行分析。在本实验中也发现,用 CD3/SSC 设门法时,有些细胞会出现 CD3 弱表达,在散点图中 CD3⁺、CD3⁻细胞群会连在一起,很难将 CD3⁺细胞准确地区分出来,但这种情况出现的概率远低于 CD45/SSC 设门法。可见,CD45/SSC、CD3/SSC 设门方法各有优缺点,在实际工作中可相互结合、互为补充。

参考文献

[1] Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression[J]. Cytometry, 1998, 34(5): 207-215.

[2] 王建中. 流式细胞分析在严重急性呼吸综合征临床研究中的应用[J]. 中国医疗器械杂志, 2003, 9(3): 19-21.

[3] 李太生, 邱志峰, 韩杨, 等. 严重急性呼吸综合征急性期 T 淋巴细胞亚群异常改变[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(5): 297-299.

[4] 王建中, 王淑娟. 当前临床式细胞分析的发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-7.

[5] NCCLS. H42-T Clinical applications of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes [S]. Wayne PA: NCCLS, 1992.

[6] Béné MC, Kolopp Sarda MN, El Kaissouni J, et al. Automated cell count in flow cytometry: a valuable tool to assess CD4 absolute levels in peripheral blood[J]. Am J Clin Pathol, 1998, 110(3): 321-326.

[7] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 23-25.

[8] 赵广玲, 许洪志, 黄敏, 等. 骨髓增生异常综合征和再生障碍性贫血患者骨髓原始细胞免疫表型分析[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(2): 53-57.

[9] 姚志娟, 廖丽, 党永辉, 等. 180 例急性白血病流式细胞术免疫分型的特点分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(1): 83-85.

[10] 陈珊珊. 流式细胞术用于临床检验中得一些问题[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(4): 197-198.

(收稿日期: 2011-06-10)

(上接第 1693 页)

吸道感染常见病毒[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(7): 665-667.

[7] 黄彩芝, 莫丽亚, 李先斌, 等. 不同细菌感染所致脓毒症患儿血清降钙素原水平的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1110-1111.

[8] 黄忠强, 吴华伟, 王伟利. T 细胞、细胞因子在抗病毒免疫中的作用机制[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2006(4): 2-4.

[9] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010.

(收稿日期: 2011-06-10)