

· 临床检验研究 ·

流式细胞术干/祖细胞分类计数在自体造血干细胞移植治疗恶性血液系统疾病中的应用

刘媛¹, 吴丽娟¹, 刘毓刚¹, 帖儒修²

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

摘要:目的 建立流式细胞术干/祖细胞分类计数方法, 探讨其在自体造血干细胞移植治疗恶性血液系统疾病中的应用价值。方法 以抗 CD45-PC5/CD34-PE/CD38-FITC 建立三色流式细胞术造血干/祖细胞分类计数方法, 对患者自体干细胞移植动员效果、单采物质量及回输单采细胞进行定量检测。结果 动员后样品检测分析发现, 87.5% 的患者动员效果较好, 单个核细胞含量均在 70.0% 以上; CD34⁺ 细胞总数大于 4×10^6 /kg 体质量者占 90.0%。干细胞冻存样品检测分析发现, CD34⁺ 细胞数量冻存后存在一定衰减, 但衰减量小于 10.0%, 经 *t* 检验证实冻存前后差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 流式细胞术干/祖细胞分类计数在自体造血干细胞移植治疗恶性血液系统疾病中得到有效应用, 单采细胞标本的定量检测为临床判断动员后单采时机、单采细胞质量、单采获得 CD43⁺CD38⁻ 造血干细胞量、实际回输患者的 CD43⁺CD38⁻ 造血干细胞量均提供了直接的科学数据。

关键词:流式细胞术; 造血干细胞; 血液肿瘤; 造血祖细胞; 自体干细胞移植

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2310-03

Application of differential counts of stem cell and progenitor cell by flow cytometry in autologous stem cell transplantation for treatment of malignant nosohemia

Liu Yuan¹, Wu Lijuan¹, Liu Yugang¹, Tie Ruxiu²

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China;

2. Department of Medical Laboratory, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To establish a method of stem/progenitor cells differential count by flow cytometry to investigate the value in autologous hematopoietic stem cell transplantation for treatment of malignant diseases. **Methods** The differential count of hematopoietic stem/progenitor cell was established by a 3-color flow cytometry with Anti-CD45-PC5/CD34-PE/CD38-FITC and was used in autologous stem cell transplantation for treatment of malignant nosohemia. **Results** Mobilization of the sample test analysis found that 87.5% of patients mobilized better, mononuclear cell levels were above 70.0%; patients whose CD34⁺ cell population were in the 4×10^6 /kg body weight or more accounted for 90.0%. Detection of stem cells in frozen samples found that CD34⁺ cells after cryopreservation certain decay, but less than 10.0%, No significant difference was recorded between before and after cryopreservation by *t* test ($P > 0.05$). **Conclusion** Stem/progenitor cells differential count by flow cytometry in autologous stem cell transplantation for the treatment of malignant blood diseases were effectively applied, single-cell samples collection for clinical quantitative analysis were used to provide a direct scientific data for judge the acquisition timing, cell quality, mass of CD43⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in apheresis and actual retransfusion.

Key words: flow cytometry; haemopoietic stem cells; hematologic neoplasms; haemopoietic progenitor cells; autologous stem cell transplantation

白血病是血液病治疗的难点, 自体造血干细胞移植 (AH-SCT) 已成为当今治疗血液系统疾病的主要手段之一。移植的目标在于重建患者造血功能, 希望能得到大量造血干细胞 (HSC) 而不是造血祖细胞 (HPC)^[1-4], 为此, 以抗 CD45-PC5/CD34-PE/CD38-FITC 设计了三色流式细胞术干/祖细胞分类计数方案, 通过对患者外周血、单采样品及冻存样品的 HPC 和 HSC 分类计数检测, 帮助临床判断动员后实施细胞单采的时机、确定骨髓移植时单采细胞中 HSC 的浓度与含量、骨髓移植后外周血中 HSC 的数量, 为临床行干细胞移植提供有力依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 疾病组包括 8 例白血病患者, 均为某综合性三甲医院的住院患者, 临床诊断全部符合世界卫生组织诊断标准, 其中男 6 例, 女 2 例; 年龄 11~56 岁, 50 岁以上 4 例, 具体疾病包括多发性骨髓瘤 1 例, 恶性淋巴瘤 2 例, 非霍奇金淋巴瘤

1 例, 急性非淋巴细胞性白血病 2 例, 粒细胞肉瘤 1 例和急性淋巴细胞性白血病 1 例。该 8 例患者经 AH-SCT 后均获得造血重建, 随访 3 年暂未发现复发情况。健康组 100 例, 其中男 50 例, 女 50 例; 年龄 18~61 岁, 均为同期前往医院进行体检并经证实的健康人员。

1.2 仪器与试剂 美国 Beckman-Coulter 公司 EPICS-XL4 MCL 流式细胞仪, 中国迈瑞公司 5380 五分类血细胞分析仪等。同型对照抗体 IgG1-FITC 和 IgG1-PE, 测定抗体 CD45-PC5、CD34-PE 和 CD38-FITC, 标本预处理试剂 (即全血细胞裂解液, 包括溶液 A、溶液 B 和溶液 C), 清洁液, 仪器开机光路校正试剂, 以上均购自 Beckman-Coulter 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品 血标本于清晨空腹抽取肘正中静脉 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝 (紫色头抗凝管)。单采细胞标本的采集方法是从采集袋放出少量采集物进入到连接的标本袋中, 消毒标本袋,

以真空穿刺抽吸 1~2 mL,再揭开试管盖沿试管壁将采集物缓缓推入试管,加盖备用。

1.3.2 荧光免疫染色 向同型对照管中加入 IgG-PE、IgG1-FITC 和 CD45-PC5 各 10 μ L,血液标本 50 μ L。向测定管中加入 CD45-PC5、CD34-PE 和 CD38-FITC 各 10 μ L,血液标本 50 μ L。轻轻摇匀,室温(16~22 $^{\circ}$ C)避光放置 20~30 min。最后依次向各试管加入 A 液 625 μ L、B 液 265 μ L 和 C 液 100 μ L,在涡旋振荡器上混匀 5~10 s。

1.3.3 上机测定 打开造血干/祖细胞流式检测方案 CD45-PC5/CD34-PE/CD38-FITC(图 1)。先将同型对照管插入流式细胞仪主机上的样品台,打开仪器快速补偿通道,通过电压调节使 IgG-PE 和 IgG-PC5 对应的门阳性率为零,保存对照检测结果,取下同型对照管再将测定管插入样品台,仪器自动进行

测定,记录检验结果并保存图像信息。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 系统作平均数和标准差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康人静脉血造血干/祖细胞分类计数结果 外周血标本中,单个核细胞百分数(30.1 \pm 6.22)% ,总 CD34⁺细胞百分数(0.89 \pm 0.73)% ,造血干细胞百分数(0.64 \pm 0.31)% ,造血祖细胞百分数(0.42 \pm 0.2)% ,单个核细胞绝对数(1.91 \pm 0.5) $\times 10^9$ /L,总 CD34⁺细胞绝对含量(0.06 \pm 0.02) $\times 10^9$ /L,造血干细胞绝对含量(0.05 \pm 0.03) $\times 10^9$ /L,造血祖细胞绝对含量(0.03 \pm 0.02) $\times 10^9$ /L。

表 1 动员后单采样品质量鉴定结果

病例	性别	年龄(岁)	单个核细胞 (%)	CD34 ⁺ 细胞 (%)	HSC(%)	HPC(%)	单个核细胞 ($\times 10^9$ /L)	CD34 ⁺ 细胞 ($\times 10^9$ /L)	HSC ($\times 10^9$ /L)	HPC ($\times 10^9$ /L)
病例 1	男	64	91.55	4.65	1.94	2.79	159.23	7.94	3.29	4.79
病例 2	男	11	63.55	4.45	2.55	1.90	100.14	7.54	3.94	3.60
病例 3	男	52	99.10	0.29	0.27	0.02	86.37	0.45	0.43	0.02
病例 4	男	39	92.75	6.35	4.45	3.15	101.85	6.62	4.59	3.38
病例 5	女	56	94.05	0.30	0.05	0.25	144.18	0.54	0.08	0.45
病例 6	男	16	84.40	4.17	3.51	0.22	49.39	3.30	2.77	0.54
病例 7	男	44	87.80	2.44	2.42	0.02	58.69	2.46	2.44	0.02
病例 8	女	59	85.10	1.50	0.50	1.00	124.23	3.33	1.11	2.22

表 2 回输前复苏冻存单采样品质量鉴定结果

病例	性别	年龄(岁)	单个核细胞 (%)	CD34 ⁺ 细胞 (%)	HSC(%)	HPC(%)	单个核细胞 ($\times 10^9$ /L)	CD34 ⁺ 细胞 ($\times 10^9$ /L)	HSC ($\times 10^9$ /L)	HPC ($\times 10^9$ /L)
病例 1	男	64	86.65	1.55	1.45	0.05	55.57	0.87	0.81	0.03
病例 2	男	11	60.35	9.10	1.75	4.85	46.80	6.69	1.29	3.56
病例 3	男	52	99.87	0.30	0.25	0.00	70.25	0.24	0.20	0.00
病例 4	男	39	71.85	4.50	4.40	0.05	43.99	1.96	1.92	0.02
病例 5	女	56	77.65	1.55	1.00	0.60	53.72	0.80	0.52	0.31
病例 6	男	16	72.35	4.50	4.20	0.25	19.18	1.12	1.04	0.07
病例 7	男	44	70.60	1.55	1.55	14.70	12.70	0.49	0.18	0.02
病例 8	女	59	55.90	0.75	0.60	0.15	83.30	0.58	0.46	0.12

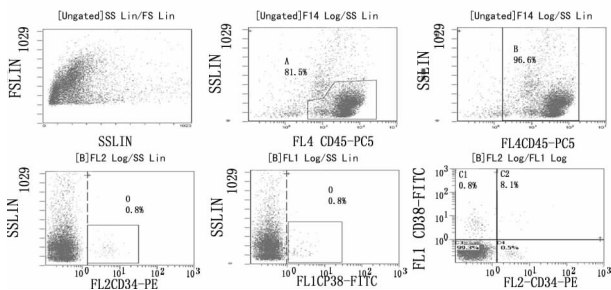


图 1 造血干/祖细胞流式检测方案

含量逐渐增高,第 3~7 天含量维持较高水平,此时采集可以确保收获足够数量的干细胞(通常要求采集 CD34⁺细胞总数大于 4 $\times 10^6$ /kg 体质量^[4]),见图 2。

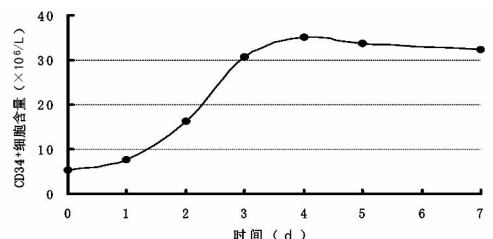


图 2 外周血干细胞动员效果图

2.2 外周血干细胞动员效果 结果提示动员后 CD34⁺细胞

2.3 动员后单采样品质量鉴定结果 本组 8 例患者采用化疗联合粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)动员造血干细胞。外周血干细胞采集从开始动员后每天复查血常规至 WBC 最低点后,此时做外周血单个核细胞计数及外周血 CD34⁺ 阳性细胞计数,结果 87.5% 的患者动员效果较好,其单个核细胞含量均在 70.0% 以上,只有 1 例患者单个核细胞含量不足 70.0%。CD34⁺ 细胞总数大于 4 × 10⁶/kg 体质量者占 90.0%,总体看经动员后干细胞释放效果达到要求,见表 1。

2.4 回输前复苏冻存单采样品的质量鉴定结果 比较冻存前后单个核细胞含量,细胞数量在冻存后存在一定衰减,但衰减量小于 10.0%,经 t 检验证实冻存前后差异无统计学意义(P > 0.05),见表 2。

3 讨 论

AHSCT 作为目前治疗恶性血液系统疾病的重要方法之一与其他移植相比,其具有干细胞来源不受供者的限制、预处理强度低、移植相关并发症少、安全性高、受年龄限制小、适用人群广及花费相对较少等优点,具有显著临床优势^[5]。经研究表明,目前应用流式细胞术能更加准确获得干/祖细胞含量,对移植单采样品质量进行分析,有效提高干细胞移植治疗效果。移植治疗过程中由于正常外周血中造血干细胞浓度很低^[2],患者采用化疗联合粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)动员后,造血干细胞显著增加,但这种情况维持时间较短^[3],因此,选择恰当的指标和合适的时间来确定采集时机对提高采集效果很重要。分析结果其中有几点需要特别注意,由于干细胞计数对于 AHSCT 十分重要,即使是动员后的单采标本,CD34⁺ 细胞含量仍然较少,因此送检一定要及时,标本采集后应按急诊样品 30 min 内进行检测,否则容易造成阳性细胞丢失。另外,检测中同型对照管十分重要,每份标本检测时必须设置同型对照管进行平行测定,用于对仪器各荧光通道电压是否合适的审核与调节,同时有助于发现个别存在污染荧光物质的情况。

本组研究通过建立三色流式细胞术造血干/祖细胞分类计数方法对临床实施 AHSCT 提供了有效指导,主要用于临床进行干细胞采集前,对于细胞捐献者动员后外周血 CD34 干细胞的动员效果进行监测和实施单采的时机判断,辅助临床制定单采计划。另外,用于单采物质质量的鉴别,造血干细胞表达 CD34 不表达 CD38,造血祖细胞既表达 CD34 也表达 CD38,以 CD45 作为外周血有核细胞的标志^[6-7],结合 CD34 和 CD38 单抗,通过流式细胞术可对传统意义上的干细胞总数(CD34⁺ 细胞总

数)进行测定,并同步分别测定造血干细胞和造血祖细胞数量,一般来说,单采物单个核细胞含量可以反映单采效果,质量较好的单采物其单个核细胞含量应大于总细胞数量的 70% 以上。还可用于 CD34 细胞总数的测定,辅助临床做出是否继续或停止单采的判断。为了确保干细胞移植成功,采集的 CD34⁺ 细胞总数应大于 4 × 10⁶/kg 体质量。另外,单采物中造血干细胞和造血祖细胞数量的测定,可用于单采量的精确计算和预后判断。干细胞移植希望移植的是真正的造血干细胞而不是造血祖细胞,质量满意的单采物应该含有高浓度的造血干细胞。通过分类计数可准确获得干/祖细胞数。

参考文献

- [1] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:60-71.
- [2] Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Cytometry, 1998, 34(2): 128-142.
- [3] Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor[J]. Blood, 1989, 74(1): 1905-1914.
- [4] Mougil H, Shinmyozu K, Osame M, et al. Determining the optimal time for peripheral blood stem cell harvest by detecting immature cells (immature leukocytes and immature reticulocytes) using two newly developed automatic cell analyzers[J]. Int J Hematol, 1997, 66 (3): 303-313.
- [5] Barnett D, Janossy G, Lukenko A, et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cell. Prepared by the CD34⁺ haematopoietic stem cell working party. General haematology task force of the british committee for standards in haematology[J]. Clin Lab Haematol, 1999, 21 (5): 301-308.
- [6] Pollard Y, Watts MJ, Grant D, et al. Use of the hemopoietic progenitor cell count of the Sysmex SE29500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells[J]. Br J Haematol, 1999, 106 (2): 538-544.
- [7] 江雁, 穆红, 唐志琴, 等. 急性白血病系列特异性抗原表达分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 338-339.

(收稿日期: 2011-08-08)

(上接第 2309 页)

善预后。所以,对于急性呼吸系统感染性疾病的诊断,流式淋巴细胞亚群检测优于血常规,这些指标对临床的治疗疗效和预后有着重要的临床意义。

参考文献

- [1] Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, et al. T Lymphopenia in relation to body mass index and TNF2-γ in human obesity: adequate weight reduction can be corrective[J]. Clinical Endocrinology, 2001, 54 (4): 347-354.
- [2] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:1, 78-88, 119-122, 124-127.
- [3] 吴丽娟, 刘丁, 陈伟, 等. 外周血 T 淋巴细胞免疫功能与医院感染的关系[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2124-2125.

- [4] 刘建强, 李秀武, 杨志英, 等. 肺结核并呼吸衰竭患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 河北医药, 2010, 32(15): 2075-2077.
- [5] 裴宇容, 何宗忠, 孙德华, 等. 手足口病患儿 T 淋巴细胞亚群与双阴性调节性 T 细胞的检测及其临床意义[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(1): 49-51.
- [6] 金从国, 王熙才, 伍治平, 等. 癌症患者外周血 T 淋巴细胞亚群水平及临床意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2003, 15(1): 33-34.
- [7] 于春宝, 左云, 王俊玲, 等. 肺结核患者细胞免疫功能的研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(2): 138-140.
- [8] 高越, 何建如, 陈小青, 等. 慢性支气管炎急性发作期患者 T 淋巴细胞亚群的研究[J]. 科技通报, 2001, 17(2): 67-69.

(收稿日期: 2011-08-08)