

流式细胞仪检测白细胞髓过氧化物酶的方法研究

崇慧峰¹, 丁天凌^{2△}, 吴蓓倩², 朱萍² (1. 安徽省铜陵市人民医院检验科 244000; 2. 上海华山医院血液科 200040)

【摘要】 目的 评价流式细胞仪检测胞浆内抗原髓过氧化物酶(MPO)的方法, 探讨实验中各因素对检测结果的影响。**方法** 以 HL-60 细胞为模型, 多参数流式细胞仪分析, 比较 3 种不同破膜剂处理及不同处理时间, 标本不同放置时间, 不同荧光染料对实验结果的影响。**结果** 比较 FACS、Fix & Perm、Fixation & Permeabilization 3 种破膜剂, 得出 FACS 破膜剂对细胞的前向散射角/侧向散射角(FSC/SSC)影响最小, 相对荧光强度(RFI)明显高于其他两者, 效果最佳。3 种破膜剂均在破膜时间 15 min 时可达到最佳效果。标本放置在室温条件下, 12 h 内应对其进行处理, 至 24 h 细胞已出现部分死亡, 将影响实验结果的正确性。PE 荧光的 MPO 在荧光强度上明显优于 FITC 荧光, 因此推荐在条件允许的情况下, 尽可能地选用 PE 荧光的 MPO 抗体。**结论** 流式细胞仪检测 MPO 的推荐方法: 调整样本细胞数, 应用 FACS 破膜剂 15 min, 标本必须当天完成检测, 尽量采用 PE 标记的 MPO 抗体。

【关键词】 髓过氧化物酶; 流式细胞术; 胞浆内抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0657-02

Detection of cytoplasmic antigen MPO by flow cytometry CHONG Hui-feng¹, DING Tian-ling², WU Bei-qian², ZHU Ping² (1. Department of Clinical Laboratory, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244000, China; 2. Department of Hematology, Huashan Hospital, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To explore the examination method of cytoplasmic antigen myeloid peroxidase(MPO) and to study the factors affecting the flow cytometry analysis. **Methods** With HL-60 cells as model, multiple parameters flow cytometry was used to analyze the effect of three kinds of fixation and permeabilization procedure, different color direct immunofluorescence staining and different sample treatment time on the experimental results. **Results** FACS permeabilization had the best effect, with the minimal influence of forward scatter/side scatter(FSC/SSC) and highest relative fluorescence intensity(RFI). 15 min of permeabilization was enough. In ordinary temperature, the sample should be treated within 12 h, at the most extending to 24 h. PE stained MPO was better than FITC and the PE stained MPO was suggested. **Conclusion** The standard method of detecting MPO is suggested as follows: using the FACS permeabilization for 15 min, choosing the PE stained antibodies and sample should be completed the detection on the same day.

【Key words】 myeloid peroxidase; flow cytometry; cytoplasmic antigen

髓过氧化物酶(myeloid peroxidase, MPO)为中性粒细胞内嗜苯胺蓝颗粒的主要成分。20 世纪 90 年代初, 开始出现流式细胞仪检测 MPO 的临床研究^[1-3]。在应用中, 大家发现 MPO 的表达在同一白血病细胞多次重复检测时经常出现阳性表达不稳定^[4-6]现象。为使检测对象齐同, 本实验采用 HL-60 细胞作为细胞模型, 对流式细胞仪检测的各影响因素, 如破膜剂的差异, 标本放置时间和不同荧光标记的抗体等进行了系统的再评估, 为更好地规范目前流式细胞仪检测提供实验资料。

1 材料与方

1.1 材料 (1) 单克隆抗体 MPO-FITC, MPO-PE, PI 染料购于 DAKO 公司, 由联科公司代理; 破膜剂 FACS、Fix & perm、Fixation & Permeabilization 分别由 BD 公司、DAKO 公司和 CATALOG 公司提供; 缓冲液 PBS 加 0.1% 叠氮钠; HL-60 细胞株。(2) 主要仪器: 流式细胞仪, 型号 FACScan, 美国 Becton-Dickinson 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 基本步骤 取 HL-60 细胞, PBS 洗涤, 离心两遍后, 细胞计数。调整细胞数约为 $10 \times 10^9/L$; 取 100 μL 细胞置于 Falcon 管中, 加入破膜剂, 振荡混匀, 避光反应一定时间; 加入

PBS 2 mL, 离心 5 min, 弃上清液, 加入 PBS 0.5 mL 重悬浮, 上机。

1.2.2 FCM 检测 在流式细胞仪的 FSC(前向散射)-SSC(侧向散射)点图上框取 HL-60 细胞群。MPO-FITC、MPO-PE 的检测: 分别以空白管(未加抗体)调整电压, 阴性对照管(小鼠 IgG)划定阴性细胞区域, 然后检测标本阳性细胞比例、平均荧光强度算术均值(MFI)和平均荧光强度几何均值(MFI_{geo})。

1.3 统计学方法 流式细胞仪参数用 CellQuest 软件获取。所有数据分析应用 SPSS 10.0 统计软件包进行, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。正态分布数据采用 *t* 检验、配对 *t* 检验和方差分析, 非正态分布数据采用非参数检验。

2 结 果

2.1 不同破膜剂对实验结果的影响 本实验采用了临床上常用的 3 种破膜剂, 分别由 BD 公司、DAKO 公司和 CATALOG 公司提供。经比较, 在检测 MPO 中 BD 公司生产的破膜剂 FACS 对细胞 SSC 和 FSC 影响最小, 荧光强度和阳性百分比皆比较高, 效果比较理想。见表 1。

2.2 不同破膜时间对实验结果的影响 表明随着破膜时间的延长, 阳性细胞百分比以及荧光强度都逐渐增强, 说明细胞的

破膜效果在逐渐增加;破膜时间在 15 min 以上,其破膜效果已无明显差异,见图 1。

表 1 不同破膜剂对 FSC、SSC 影响

项目	SSC	FSC
破膜前	350±20	650±30
FACS	380±20*	725±40*
Fix and perm	400±30	775±50
Fixation and Permeabilization	400±30	775±40

注:分别与 Fix & perm、Fixation&Permeabilization 比较,* P<0.05。

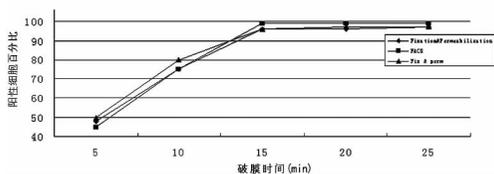


图 1 不同破膜时间对细胞影响

2.3 标本不同放置时间对实验的影响 结果显示标本放置在室温下 12 h 内,检测的阳性细胞百分比和相对荧光强度 RFI 无明显差异,而超过 24 h 后与前有明显差异。而 PI 染色的阳性细胞比例在 24 h 后明显增加,表明细胞凋亡的比例明显增多。

2.4 不同荧光标记的 MPO 抗体对实验结果的影响 结果显示 PE 荧光染料标记的 MPO 抗体与 FITC 标记的 MPO 抗体比较,在阳性细胞百分比上无明显差异,但在荧光强度上 PE 标记的明显要高于 FITC 标记,因此两者在 RFI 上具有明显差异。见表 2。

表 2 不同荧光标记的 MPO 抗体对实验结果的影响

项目	MPO-FITC	MPO-PE
阳性率 (%)	98.97±0.24	98.30±0.12
MFI	110.20±20.53	155.94±23.10*
MFIgeo	70.45±13.26	106.33±13.33*
RFI	10 906.20±4.93	15 288.00±27.00*
RFIgeo	6 972.44±3.18	10 268.00±16.00*

注:PE 与 FITC 相比较,* P<0.05。

2.5 实验的可重复性 FCM 法的观察者内偏倚:在相同的实验条件下,同一份样本由一名操作者重复 2 次,结果各项指标的变异度(CV)均小于 5%。FCM 法的观察者间偏倚:在相同的实验条件下,同一份样本由两名操作者分别进行,结果无明显差异。

3 讨 论

流式细胞仪检测胞浆内抗原 MPO,虽然已开展多年,但其检测结果在各大实验室差异较大,波动幅度大,究其原因除了临床资料本身复杂性外,可能主要是与破膜剂的选择或标本保存时间及不同荧光标记的抗体有关。本实验利用髓系细胞株 HL-60 来研究不同破膜剂对检测胞质内抗原 MPO 的影响,由于检测对象比较一致可以比较客观地反映各种破膜剂存在的差异。好的破膜剂要保持细胞完整和颗粒不变的同时,使细胞膜通透,使抗体进入胞浆与胞浆抗原充分结合^[7-8]。流式细胞仪检测参数,FSC 反映的是细胞的大小,SSC 反映的是细胞颗

粒的多少。FACS 破膜剂,较其余两种破膜剂对 FSC、SSC 影响最小,即在保持细胞完整和颗粒不变方面最好;阳性细胞百分比和荧光强度明显高于其他两家公司产品,其破膜效果亦最佳,且 FACS 破膜剂破膜过程较为简单,一步完成;另两家产品均需先进行 A 液固定,固定完全后 B 液进行细胞的破膜,耗时、费力。近来国内文献报道亦支持在检测 MPO 过程中, FACS 破膜剂为最好选择^[9]。虽然在检测 MPO 时 FACS 破膜剂明显占优势,但在检测其他胞质内抗原指标如胞质 CD3、胞质免疫球蛋白时,国外文献报道 fix and perm 破膜剂为最佳选择,国内尚未见相应报道^[10-11]。是否因为国外的检测对象疾病基础不同所致,和不同抗原需要不同的破膜剂,尚需进一步选择多种细胞株,以评价在不同破膜剂条件下多种胞浆内抗原的测定效果。本实验测定了 3 种破膜剂在不同时间下的破膜效果,当破膜过程在 15 min 左右时,破膜效果已达到 95% 以上,而破膜时间再长至 25 min,在统计学上已无明显差异。3 种破膜剂在破膜时间方面均在 15 min 左右达到临床检测要求;小于 15 min,其破膜效果都有明显的不足,对检测结果的影响相当明显。故检测胞浆内抗原必须破膜充分,要有充分的破膜时间,且时间一般需在 15 min 以上,但如果破膜时间过长,可引起细胞过分通透,从而导致细胞肿胀,细胞死亡。在流式细胞仪点图中死亡细胞堆积于点图下方,影响细胞内真实的抗原表达。本研究的统计结果显示,在破膜时间 15 min 已可达到最佳效果,这样可尽量缩短整个实验流程的时间。

同时,本实验还就标本在体外放置的时间对实验结果的影响作了比较。结果发现室温下标本放置 12 h 内,结果无明显差异;随着标本放置时间超过 12 h,标本检测的荧光强度逐渐减少,且随着放置时间的延长,阳性细胞百分比和荧光强度逐渐减弱。随着放置时间的延长,HL-60 细胞可能逐渐死亡。PI 测定证实在流式细胞仪上逐渐分成两群,有一群细胞高表达,证实部分细胞已经死亡。随着放置时间的延长,PI 标记的细胞百分比逐渐增多。因此本研究的结果提示,样本放置在室温下时,至多 12 h 内应对其进行处理,至 24 h 以后白血病细胞已出现相对部分死亡,势必将影响实验结果的正确性。本实验还评价了 FITC 和 PE 荧光标记的 MPO 抗体在实验结果的影响。发现 PE 荧光的 MPO 在荧光强度上明显优于 FITC 荧光,可能是由于激发光的频率不同,不容易受到 HL-60 细胞的自发荧光或一些非特异性荧光的干扰,因此在检测中效果明显好于 FITC 荧光标记的 MPO 检测结果。因此推荐在条件允许的情况下,尽可能地选用 PE 荧光的 MPO 抗体。

从本实验的结果中,得出了流式细胞仪检测 MPO 的推荐方法。(1)调整标本细胞数为 10 × 10⁹ /L;取 100 μL 置于 Falcon 管中,加入 FACS 破膜剂 1 × 500 μL,振荡混匀,避光反应 15 min;加入 PBS 2 mL,980 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 MPO 20 μL,振荡,混匀后避光反应 30 min 左右;加入 PBS 2 mL,980 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 PBS 2 mL,800 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 PBS 0.5 mL 重悬浮,准备上机。(2)标本必须当天完成检测。(3)可能的情况下尽量采用 PE 标记的 MPO 抗体。

参考文献

[1] Tay S,Cheong S. Flow cytometric analysis of intracellular myeloperoxidase distinguishes lymphocytes, monocytes and granulocytes[J]. Malays J Pathol, 1998, 20(2): 91-94. (下转第 661 页)

平均值)/X 平均值×100%],显示两种方法对同一份血清 Cr 的测定均值差值较小,分布较合理,图 4 是 Y 单个值与 X 平均值相对偏差的偏置曲线图[相对偏差=(Y 单个观测值-X 平均值)/X 平均值×100%],显示 Y 方法测定单个值与 X 均值相比偏差较小,分布较合理。

2.2.6 系统误差的估计值及其置信区间计算 两检测法之间的系统误差的估计值(B_C)和置信区间($|B_{Clow}, B_{Chigh}|$)计算得到: Xc_1, Xc_2 水平下的系统误差的 95% 的可信区间 $|B_{Clow}, B_{Chigh}|_1 = [0.39, 7.32], |B_{Clow}, B_{Chigh}|_2 = [0.46, 7.25]$ 。根据允许误差 $= \pm BIAS\% \times Xc$, 两个 Xc 下的允许误差分别为:允许误差 1 = (-26.52, 26.52)、允许误差 2 = (-39.78, 39.78)。可见 $|B_{Clow}, B_{Chigh}| <$ 允许误差,因此系统误差符合临床要求。

3 讨 论

Cr 是肌酸代谢的最终产物,它是由磷酸肌酸通过脱磷酸基并闭环成环而形成的内脱水物。Cr 是肌肉组织代谢产物的废物,它仅仅由肾小球排泄,不被肾小管重吸收。血清 Cr 浓度和尿中 Cr 排泄量,正常时主要与体内肌肉总量关系密切^[6]。测定血清 Cr 浓度及根据血清 Cr 与 Cr 浓度计算所得的 Cr 清除率,可作为肾小球滤过率受损的指标^[7],深受临床重视。因此,血 Cr 测定是肾功能检测的重要常规生化指标^[8]。

EP9-A 文件是美国临床实验室标准化委员会在 1995 年出台的标准化系列文件之一,用患者血清标本,按 EP9-A 特定的测试顺序,不同浓度间相互交错,浓度选择覆盖检测线性范围,更接近临床标本的真实情况,适用同一标本于不同仪器、方法、试剂的检测结果对比分析和偏差评估,评价结果真实可靠。本研究根据 EP9-A 文件,结合临床工作实际情况选择不同 Cr 浓度的患者新鲜血清标本 100 例,将自主研发生化诊断试剂与进口生化诊断试剂进行比对,在 Olympus AU5421f 生化分析仪上,以方法学比对评估的系统误差小于 1/2 CLIA'88 的允许误差范围属临床可接受水平,评价了国产与进口生化诊断试剂临床测定值的相符性,验证了自主研发 Cr 生化诊断试剂的产品

质量和综合性能,安全性和有效性均符合临床应用要求,说明自主研发生化诊断试剂可取代进口生化诊断试剂应用于临床。

在实际的临床应用中,由于目标人群和地域的不同,将可能影响到检测试剂的有效性,如国内人群血脂正常参考值低于欧洲人群,所以进口产品中的参考范围可能不适用于临床的实际应用,而国内自主研发的生化诊断试剂,将能为国内的临床使用提供更科学、客观和实际的检验诊断。

参考文献

- [1] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2004:111-123.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline, EP9-2A[M]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1986:1-14.
- [3] 吴立翔,林一民,沈德华. 不同分析系统检测 AST、ALT、BUN、CRE、GLU 的偏倚分析及应用[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(11):992-993.
- [4] 贾雄飞,王惠莹. 两种生化试剂测定 GGT 的方法对比及偏差评估[J]. 中国实验诊断学,2010,14(3):334-336.
- [5] 郑菲,韩波,石启洋. 不同生化分析系统血清肌酐、尿素测定结果的偏倚评估[J]. 临床和实验医学杂志,2007,6(4):88-89.
- [6] 张秀明. 现代临床生化检验学[M]. 北京:人民军医出版社,2001:1-71.
- [7] 陈文彬,王友赤. 诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:380-381.
- [8] 林其燧. 临床化学诊断方法大全[M]. 北京:北京大学出版社,1990:8.

(收稿日期:2010-08-22)

(上接第 658 页)

- [2] Nguyen P, Olszak I. Myeloperoxidase detection by three color flow cytometry and by enzyme cytochemistry in the classification of acute leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 1998,110(2):163-169.
- [3] Imamura N. Sensitive detection technique of myeloperoxidase precursor protein by flow cytometry with monoclonal antibodies[J]. Am J Hematol, 1998,58(3):241-243.
- [4] Konikova E, Glasova M. Intracellular markers in acute myeloid leukemia diagnosis[J]. Neoplasma, 1998,45(5):282-291.
- [5] Groeneveld K, Marvelde J. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes[J]. Leukemia, 1996,10(8):1383-1389.
- [6] Knapp W, Strobl H. Flow cytometric analysis of cell surface and intracellular antigen in leukemia diagnosis[J]. Cytometry, 1994,18(4):187-198.
- [7] Baker E, Gerard D. HL-60 cell growth conditioned medium is an effective inducer of myeloperoxidase expression in K-562 human leukemia cells[J]. Leuk Res, 2002,26

(11):1017-1025.

- [8] Kappelmayer J, Gratama W. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a[J]. J Immunol Methods, 2000,242(1-2):53-65.
- [9] Liu YR, Yu H. Detection of cytoplasmic antigens by flow cytometry and its implication for leukemia immunophenotyping[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2002,10(1):17-21.
- [10] Latorraca A, Lanza F. Diagnostic value of MPO and lysozyme antibodies in acute leukemia. Implications for the definition of FAB subtypes using a flow cytometric approach in combination with different permeabilizing methods[J]. Eur J Histochem, 1997,41(Suppl 2):27-28.
- [11] Lanza F, Latorraca A. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells[J]. Cytometry, 1997,30(3):134-144.

(收稿日期:2010-09-27)