

■ 概述

造血干细胞移植 (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT) 是治疗血液系统疾病、自身免疫性疾病、某些实体瘤和基因缺陷疾病的重要手段之一。在造血干细胞移植的过程中, 采集足够数量的造血干细胞是移植成功的关键。CD34 是 80 年代中期发现的一种细胞表面分子, 此分子在骨髓和外周血未成熟的造血细胞及所有具有造血潜能的集落形成细胞上表达, 包括多能和定向造血祖细胞。大量的临床研究证实富含 CD34⁺ 细胞组分移植可安全、持久地获得多系造血重建。^[1, 2]

流式细胞术因具有快速、简便、可定量等特点, 已广泛应用于移植中造血干 / 祖细胞数量的检测及确定采集时机等。流式细胞术计数 CD34⁺ 细胞经历了从单参数到多参数分析、从双平台到单平台计数、从各实验室自由抗体组合到商业化试剂盒应用等一系列的演变 [1]。1996 年血液病治疗与移植国际联合会 (International Society of Hematotherapy and Graft engineering, ISHAGE) 采纳了 CD45/CD34 双色标记多参数累积设门的方法用于 CD34⁺ 细胞识别及计数, 被命名为 ISHAGE

方案。ISHAGE 方案使用 CD45、CD34、FSC 和 SSC 四个参数累积设门。CD45 是白细胞抗原, 只表达于白细胞而不表达于血小板和红细胞表面, 在不成熟的干 / 祖细胞表面表达较弱。因此利用 CD45 设门可以去掉血小板、红细胞和碎片, 设定干 / 祖细胞。在 SSC/CD45 二维图中设 CD45⁺ 为 R1, 基于 R1 在 SSC/CD34 二维图中选 CD34⁺ 为 R2, 基于 R2 在 SSC/CD45 二维图中设 CD45 弱阳性为 R3, R3 中 FSC 大的细胞为造血干 / 祖细胞。CD34 阳性细胞计数时, 应获取最少 75000 个 CD45⁺ 细胞及 100 个 CD34⁺ 细胞, 比例计算的分母为 CD45⁺ 白细胞^[3]。

ACEA NovoCyte 流式细胞仪采用高精度注射器精准控制样本体积量, 配合极低流路细胞损失, 无需借助参考微球即可实现绝对计数。本文采用 CD34 计数试剂盒免洗流程, 基于国际公认的 ISHAGE 圈门方法, 在 NovoCyte 上单平台、免微球计数 CD34⁺ 细胞, 展示一个简单、准确、低成本的 CD34⁺ 绝对计数方法。

■ 试剂盒

ACEA CD45/CD34 检测试剂盒, 含 CD45 FITC/CD34 PE 组合抗体、10X 溶血素和 7-AAD 染液。

■ 样本制备

- 1、流式管做好标记;
- 2、在流式管底加入 20 μ l 抗体和 20 μ l 7-AAD 染液;
- 3、加入 100 μ l 样本, 室温避光孵育 20 分钟;
- 4、用去离子水 10 倍稀释 10X 溶血素为 1x 溶血素;
- 5、每管加入 1ml 1x 溶血素, 室温避光孵育 10 分钟, 1 小时内检测。

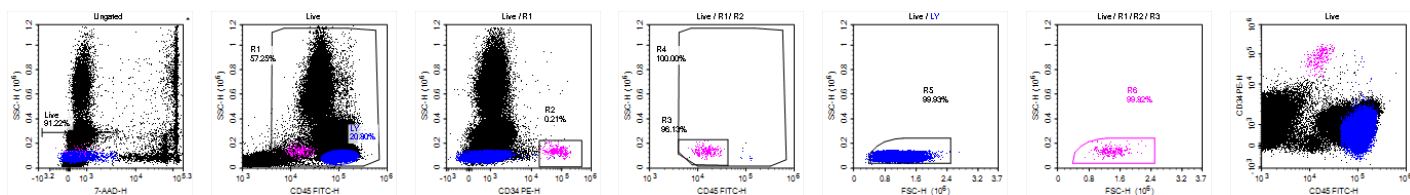
■ 数据采集和分析

- 1、采用 NovoCyte 配套软件 NovoExpress 采集和分析数据。
- 2、建 7-AAD/SSC 散点图, 设门 live 圈出 7-AAD 阴性活细胞;
- 3、建 CD45/SSC 散点图, 围绕 CD45 阳性和弱阳性细胞设门 R1, 围绕 CD45 强阳性 SSC 低细胞群设门 LY;
- 4、建 CD34/SSC 散点图, 显示 R1 门细胞, 围绕 CD34 阳性 SSC 低细胞群设门 R2;
- 5、建 CD45/SSC 散点图, 显示 R2 门细胞, 复制 R1 门到该图, 围绕 CD45 弱阳性细胞设门 R3, 除外 CD45 强的细胞;
- 6、建立 FSC/SSC 散点图, 显示 LY 门细胞, 围绕细胞群设门 R5;

- 7、建立 FSC/SSC 散点图，显示 R3 门细胞，复制 R5 门到该图为 R6 门，去除比淋巴细胞 FSC 小的细胞；
- 8、设置采集条件，勾选 BL1、BL2 和 BL4，阈值 FSC-H 100,000，停止条件可设为 R1 门 75,000 个，同时需满足 R6 门数量多于 100 个；
- 9、R6 门为造血干细胞，CD34+ 比例为 R6 门占 R1 门的比例，CD34+ 计数为 R6 门的绝对计数，在主菜单“样本”-“绝对计数设置”中设置样本稀释比 100 : 1140，可直接读取绝对计数。

■ 检测结果

A. NovoCyte 检测结果



B. 对比机型检测结果

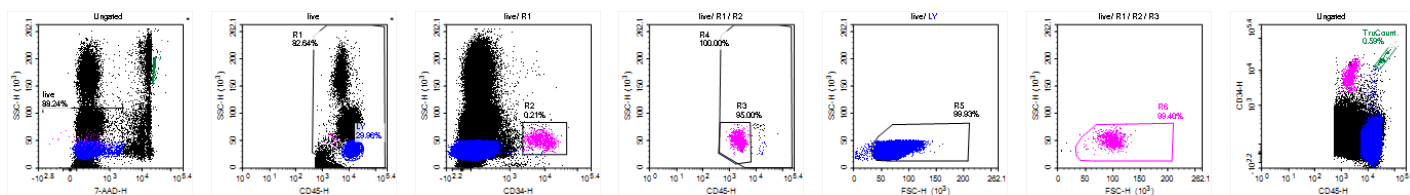


图 1. 造血干细胞移植供者动员外周血通过血细胞分离机分离得到的单个核细胞，经抗体标记后，裂解红细胞，在 NovoCyte 和对比机型上平行检测。在 7-AAD/SSC 二维图中圈出活细胞，基于活细胞在 SSC/CD45 二维图中设 CD45+ 为 R1，基于 R1 在 SSC/CD34 二维图中设 CD34+ 为 R2，基于 R2 在 SSC/CD45 二维图中设 CD45 弱阳性为 R3，R3 中 FSC 大的细胞 R6 为造血干/祖细胞，占白细胞 R1 门比例为 0.20%，绝对计数为 242 个/μl。A. NovoCyte 检测得到的图形和圈门过程；B. 对比机型上检测图形和圈门过程，相比 NovoCyte 多出绝对计数参考微球 TruCount 的设门和计数，且由于使用 TruCount 参考微球，使用 CD45 荧光阈值。

在 NovoCyte 和对比机型上平行计数三例造血干细胞移植供者动员外周血中 CD34+ 细胞，结果如下表所示，两台仪器的结果完全一致，偏差不得超过 ±5%。

表 1 三例临床样本 CD34+ 细胞绝对计数结果

	NovoCyte		对比机型		绝对计数偏差
	占有核细胞比例	体积法绝对计数 (个 / 微升)	占有核细胞比例	TruCount 法绝对计数 (个 / 微升)	
Sample 1	0.20%	242	0.20%	242	0.00%
Sample 2	0.89%	1,948	0.89%	1,997	-2.50%
Sample 3	0.21%	292	0.22%	304	-3.90%

ACEA NovoCyte 流式细胞仪在造血干细胞计数应用上充分体现了准确、自动及快速的定量分析优势。

参考文献

- 1、中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. CD34 阳性细胞绝对计数的流式细胞术测定指南. 中华血液学杂志. 2015; 36(7):539-546.
- 2、刘艳荣, 陈姗姗, 于弘. 流式细胞术计数 CD34 阳性细胞的标准化与质量控制. 中国实验血液学杂志. 2000; 8(4):302-306.
- 3、Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996 Jun;5(3):213-26.

