

● 左连富 / 主编

流式细胞术 与生物医学



● 辽宁科学技术出版社

LIU SHI
XIAO SHU
YU
SHENG WU
YI XUE

参加编著人员 (按姓氏笔画为序)

- 丁政云 河北医科大学第四临床医学院
王世杰 河北医科大学第四临床医学院
左连富 河北医科大学第四临床医学院肿瘤所
刘洪祥 北京卫生部工业卫生实验所
刘炳荣 上海第二医科大学
刘江惠 河北医科大学第四临床医学院肿瘤所
齐凤英 河北医科大学
吕尚增 河北医科大学第一临床医学院
李 琰 河北医科大学第四临床医学院肿瘤所
宋平根 北京师范大学生物系
张祥宏 河北医科大学
周道安 河北医科大学第四临床医学院
张瑞欣 河北医科大学第二临床医学院
金瑞芳 河北医科大学第四临床医学院
林凤茹 河北医科大学第二临床医学院
-

张巧敏 河北省胸科医院
段惠军 河北医科大学
郭建文 河北医科大学第四临床医学院肿瘤所
胡俊兰 河北医科大学第四临床医学院
姚尔固 河北医科大学第二临床医学院
韩文素 河北医科大学
徐欣 美国库尔特公司驻北京代表处
高文生 河北医科大学第二临床医学院
高顺强 河北医科大学第四临床医学院
董玉昌 河北医科大学第三临床医学院
蔡文清 河北医科大学第二临床医学院
霍红旭 河北医科大学第二临床医学院

序一

流式细胞术是70年代发展起来的一种快速对单细胞定量分析和分选的高新技术,其测量速度之快,精度之高是任何传统的测量方法无可比拟的,且从一个细胞中同时测得多种参数,这种高速、多信息分析和分选的高新技术,为细胞生物学和生物医学方面研究提供了强有力的手段,成为现代最先进的定量分析细胞学技术。

流式细胞是集激光技术、电子计算机技术、电子物理技术、流体力学、细胞生物化学等技术于一身的先进科学仪器,该技术发展十分迅速,应用层出不穷,流式细胞术已广泛应用于生物医学基础和临床研究领域,在免疫学、体细胞遗传学、生物化学、血液学、肿瘤学和放射生物学等学科得到广泛应用,并形成了独特的学科分支;诸如流式免疫学、流式遗传学、流式病理学等,已成为现代生物医学很有发展前景的新技术,并开创了荧光定量技术的又一个崭新领域,受到了生物医学界的极大关注。

自1982年中国第一台FACS420流式细胞仪在河北肿瘤研究所安装运行以来,此类仪器硬件系统更新已经历了四代,在此期间,在部件更新,新技术建立与联系临床实践等方面做了一些探索,并使整个分析系统和激光器能长期稳定地运行,它不仅为河北省各地医药研究与研究生培养做了大量的测量与分析,而且也为全国,除台湾和西藏地区外29个省市

单位做了样品分析,干部培训与技术交流。整个流式分析系统,特别是激光器一直能在长达10年时间里稳定地高功率地运行,也许不仅是幸运,它实际蕴含着主持与操作者对此复杂硬件系统的深入理解,精心运行与维护,它经历了无数次的故障排除与部件更新,此项技术发展也体现各级领导的长期重视与支持。

由左连富等编著的《流式细胞术与生物医学》一书即将付梓,这本书是我国目前较详细地介绍流式细胞术在生物医学上应用的书籍,题材广泛,内容丰富,重点介绍了流式在临床医学,肿瘤学领域的应用,并注意介绍了流式技术在当前生物医学应用的新进展,该书的出版为从事流式技术研究和临床工作的人员提供了有价值的参考书,对推动发展我国应用流式细胞术将起到促进作用,为流式技术在国内的推广普及应用也发挥了积极作用。

流式细胞术是能在保持细胞、细胞器或其他颗粒的完整结构与功能状态下,从分子水平上进行高灵敏度、高信息量、高速度和高精度地定量分析与分选技术,在即将进入的分子生物时代,定将发挥此项技术的优势。

刘洪祥

1986年5月

序二

流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是以流式细胞仪为工具来完成细胞等生物粒子理化特性研究的重要方法。它的主要特点是在单细胞水平上对大量细胞进行快速、准确、多参数的定量分析及分选。流式细胞术的出现为细胞分析提供了一个全新的视角。

流式细胞术迄今已有二十多年的发展历史,传入我国也有十几年时间了。随着 FCM 应用的不断拓展,人们已经从最初的单参数 DNA 分析、单色免疫荧光分析发展到利用流式细胞仪与分子生物学手段相结合,探讨细胞在分子水平上所表达的特性;在免疫荧光分析方面,可同时完成对单个细胞上四种不同荧光抗体表达的检测……。流式细胞术在医学、生物学研究领域以及临床医学领域所显示的重要作用正在为许多科研人员和临床医生所关注。《流式细胞术与生物医学》这本书详细介绍了流式细胞仪在生物学、医学上的广泛应用,内容充实,取材广泛,为从事这方面科研及临床工作的人们提供了很好的参考资料。这本书的出版,为流式细胞仪技术在国内的普及与推广做了很有意义的工作。

流式细胞术的不断发展有赖于科学技术的不断进步,流式细胞术的广泛应用有赖于生物学、医学工作者的不断努力与探索,我国流式细胞术的发展已经走过了十几年的历程,今后的发展将会更快、更好。

徐 欣

1996年5月

目 录

第一章 流式细胞术的发展简史.....	1
第二章 流式细胞术的分析和分选原理.....	8
一、概述.....	8
二、工作原理.....	8
三、散射光的测量.....	10
四、荧光测量.....	13
五、细胞分选.....	19
六、标准样品.....	22
七、流式细胞计的技术指标.....	26
八、商品仪器介绍.....	27
第三章 数据的显示与分析.....	32
一、数组的显示.....	32
二、DNA 直方图的对比分析.....	37
三、直方图的时间序列分析.....	39
四、直方图的定量分析.....	39
五、多参数分析.....	43
第四章 流式细胞术的参考标准.....	48
一、使用参考标准样品的意义.....	48

二、参考标准的使用方法	49
三、参考标准样品的制备方法	50
四、DNA 定量分析参考标准	56
五、肿瘤 DNA 倍体标准	61
第五章 流式细胞术的样品制备	68
一、实体组织单分散细胞的制备	68
二、血液单细胞样品的制备	77
三、脱落细胞单细胞悬液的制备	82
第六章 FCM 定量细胞参量和荧光探针	86
一、细胞参量	86
二、定量细胞荧光染色原理	87
三、细胞内部结构参数的 FCM 检测	88
四、细胞外部结构参量 FCM 检测	90
第七章 流式细胞术的质量控制和影响因素	111
一、标本的采集和固定方法的质量控制	112
二、单细胞悬液制备的质量控制	113
三、石蜡包埋组织单细胞制备的质量控制	115
四、脱落细胞样品的采集	117
五、细胞悬液荧光染色的质量控制	117
六、流式细胞仪操作技术的质控	119
七、流式细胞分析资料处理的质量控制	121
八、流式免疫学检测的质量控制	124

第八章 实体肿瘤 DNA 倍体的 FCM 分析	129
一、DNA 倍体研究的理论依据	129
二、DNA 含量的表示方法	130
三、DNA 倍体的判定标准	131
四、DNA 倍体的命名原则	136
五、DNA 组方图的倍体类型	138
六、流式细胞术在泌尿系肿瘤中的应用	138
七、FCM 在妇科肿瘤中的应用	150
八、FCM 在脑肿瘤中的应用	160
九、恶性淋巴瘤 FCM DNA 倍体分析	162
十、流式细胞术在软组织肿瘤中的应用	168
十一、骨肿瘤 FCM DNA 倍体分析	175
十二、流式细胞术在皮肤肿瘤中的应用	179
第九章 流式细胞术在肿瘤病理学中的应用	199
一、FCM 的测定在肿瘤早期诊断和鉴别诊断中的作用	200
二、流式参数的预后意义	204
三、FCM 在肿瘤脱落细胞学检查的应用	207
四、FCM 用于定量分析肿瘤细胞表面标记及癌基因产物	209
第十章 肿瘤分子生物标志物的流式定量分析	213
一、DNA 异倍体	214
二、抑癌基因 P ⁵³ 基因	222
三、癌基因蛋白产物	226

四、肿瘤转移基因 CD44	229
五、血型糖蛋白 A	230
六、肿瘤多药抗药性基因蛋白的流式分析	231
第十一章 流式细胞术在免疫学中的应用	240
一、流式细胞免疫学样品制备的基本原理	240
二、流式免疫学染色方法	240
三、免疫荧光测定的标本处理技术	242
四、T 淋巴细胞及其亚群细胞免疫标记	245
五、造血系统的分化及白血病抗原标记	248
六、血小板膜表面受体的标记	249
七、肿瘤基因蛋白产物的免疫标记	262
八、FCM 在 AIDS 病检测中的应用	266
九、淋巴造血系统恶性肿瘤流式免疫表型分析	267
第十二章 流式细胞在生物细胞遗传学中的应用	280
一、细胞培养	280
二、染色体分离	283
三、染色体的荧光染色技术	288
四、流式染色体分析的临床意义	292
第十三章 流式细胞术在酶学中的应用	300
一、概述	300
二、流式细胞计测量与时间的结合	301
三、酶分析的底物	305
四、反应产物的定量	307
五、酶类的测量	308

第十四章 流式测量细胞内钙离子、膜电势和 pH	319
一、细胞内钙离子	319
二、细胞膜电势	327
三、细胞浆 pH 的测量	330
第十五章 流式细胞术在血液学中的应用	337
一、流式细胞术在基础血液学中的应用	346
二、流式细胞术在血液病学中的应用	353
三、FCM 在白血病基因产物的表达和细胞凋亡的检测	355
四、FCM 在器官和骨髓移植中的应用	357
五、FCM 在免疫血液病中的应用	358
第十六章 流式细胞术在生物细胞增殖和凋亡研究中的应用	371
一、FCM 在生物细胞增殖周期研究中的应用	371
二、FCM 在细胞凋亡研究中的应用	374
第十七章 流式细胞术在肿瘤治疗中的应用	388
一、肿瘤细胞动力学的流式细胞分析	388
二、肿瘤化疗药物与细胞动力学	389
三、流式细胞术在评价肿瘤化疗中的作用	391
四、流式细胞术在放射治疗的应用	393
五、癌基因对肿瘤细胞放射敏感性的影响	395
六、放疗中的细胞时相和倍增时间	397
七、放疗中外周血 T 淋巴细胞亚群的分布与预后	399

八、DNA 倍体与肿瘤放疗的预后	401
第十八章 流式细胞在寄生虫检测中的应用	406
一、FCM 对疟原虫的检测	406
二、FCM 对毛滴虫的分析	415
三、流式细胞术对人血清中鼠弓形虫抗体的分析.....	419
附一 COULTER 公司流式细胞仪	423
附二 BD 公司流式细胞仪 (FACS) 的发展史	429

第一章 流式细胞术的发展简史

流式细胞计的发展,从开始的设想到第一台仪器的问世,经历了几十年的时间,在这期间,从事该项技术探索的科学工作者进行了不懈的努力,随着现代激光技术,电子检测技术和电子计算机技术的迅速发展,以致使该技术在近十年来才有迅速的发展,成为目前比较完善的细胞分析的工具。

Moldvan 是世界上最早设想使细胞检测自动化的人。1934年,他首先提出细胞计数流式自动化的设想,并设计了一种装置,使被染色的中性酵母菌和红细胞悬液压入通过安装在显微镜载物台上的一根细玻璃管,在显微镜观察下,采用光电仪记录每个通过视觉观察的细胞,在试验过程中,他注意到许多问题,在细玻璃管中确定适当的焦点,维持一定的流速,以及消除细胞团块对细玻璃管的堵塞,得到感兴趣的电子信号是困难的,他没有再作进一步深入的研究就作了报导,1936年 Casperson 等,在定量细胞检测中迈出了关键的一步,他引入显微光度术,使显微荧光光度术和自动显微分光术方面取得了一些进展,但从速度和准确性都进展不大,1941年 Kielland 也描述了与 Moldavan 设计基本相同的细胞计数的仪器,并提出专利申请。

流式细胞测量要求一个狭窄的管道,并且常被大的细胞或细胞团块所阻塞,以至成为后来的在这类仪器设计方面重点解决的问题,于1947年,在解决狭管阻塞的问题上有了实

质上的进展，Guclcer 把早在 1883 年由 Reylence 研究的层流和湍流原理加以应用而研制成了烟雾微粒计数器，1953 年 Crosland-Taylor 也应用分层鞘流原理，成功的设计了红细胞光学自动计数器，在此装置中，把一种细胞悬液缓慢地注入一个快速流动的液流中，这液流作为一种鞘液流，细胞悬液流就被包绕在这层鞘流中，始终保持一个轴流状态，这样就可允许用一直径较粗的管道，而中心细胞悬液流又比较窄，这种方法成功的达到两个目的，1. 它有效的消除了任何较大的细胞在管道中阻塞的可能性，2. 又能使细胞流处于轴流状态，这种流动的液流焦点对准基础就建立了，现今的流式细胞计几乎都采用了这种分层鞘流原理。

1949 年，Wallace coulter 提出在悬液中计数粒子方法的专利，在那项专利中，他公开了一种精确计数微粒的方法（如血细胞），后来被人们称为 Coulter 计数器，其基本原理使细胞通过一个狭窄小孔，在小孔处细胞发生电阻上的变化，从而能够进行电子特性变化的检测，这种方法必须使悬液和细胞粒子之间在电子特性不尽相同，在这种原理的基础上成功的发明了白细胞计数仪，由于信号产生的振幅或脉冲大小与粒子细胞体积有关，所以可以测量出细胞的大小，随着分析要求的提高，以致后来 Van Dilla 又把单道脉冲高度分析器引入到该仪器的设计装置方面，极大的加速获得数据的速率和分析能力，1953 年 Parker 和 Horst 描述了一种全血细胞计数器装置，血细胞悬液在等渗溶液中染色，白细胞被染成靛色或蓝色，红细胞仍保持红色或加深，然后使细胞流过一个窄的管道，在此流过的细胞被红光或蓝光照射，发射出的红光或蓝光成分分别进入各自的光电池内，由光电池驱动相应的电子计数器电路，这两个光电子信号互不相干，这已形成

了流式细胞计雏型。

1954年 Beirne 和 Hutcheon 发明了一种能够计数 50-700 μm 大小透明粒子的光电粒子计数器，并于 1957 年公开发表，其在仪器原理和设计方面和 Moldavan 的仪器相类似，他突出的设计是在显微镜的目镜上安装了一个光电倍增管，经过照射光源的细胞发出光脉冲被光电倍增管放大转变为电子脉冲，根据脉冲的大小尝试测量粒子大小的分布，但是他的设计仍然不能维持一个稳定的流速。

1959年 Coulter 和他的同事们在其原来（1949年）发明的 Coulter 计数器的基础上作了进一步的改进，采用电流敏感放大器改进了电子电路系统，这种电子放大器的脉冲在电解传导上具有独立性，并对测量粒子大小系统也作了改进使信噪比减少到最小，并可减少粒子的重叠，所以又出现了 B 型 Coulter 计数器。

1965年 Kamemtsky 等提出了扩展应用流式细胞术潜力两个新的设想，第一是用分光光度计定量细胞成分，第二是根据细胞的各种特征，同时结合测量值去进行细胞分类，在他们的初步报告中以 500 细胞/秒的速率，同时对非染色细胞核酸的紫外吸收，光谱和可见的光散射进行测量，他们首先利用二维组方图去显示和分析多参数资料，接着他又报道了在流式细胞计上对每个细胞进行 4 个参数的测量，并且首次把计算机与流式细胞装置系统接口对接起来，记录和分析多参数资料，美国 Ortho 公司生产的流式细胞计 Cytograf 和 Cytofluorograf 即是此基础上发展起来的仪器。

以上所叙述的这些系统中，细胞悬液流过管道时，均被垂直管道的激发光束所照射，每个细胞所产生的光强度是取决于细胞在管道中的位置，而不考虑入射光的焦点平面，因

此，在1965年 Meyer-Doering 和 Knauer 设计了一种以光散射为基础的粒子计数器，使细胞流直接垂直于光束，要求细胞穿过光束焦点的平面。

1966年 Coulter 等提出应用两个不同无线电频率和直流电源可以确定类似的更多的物理性质，这种可以鉴别不同物质粒子大小两个不同的信号，以后这两种 Coulter 计数器渐渐代替了大部分人工计数细胞的方法，并为现代流式细胞计所采用。

1968年，Dittrich 和 Gohde 制成了测量粒子荧光系统，使粒子平行于透射光显微镜的光轴流动，通过一个高数值孔径的物镜焦点，应用 Kohler 照明，此种系统经流动焦点出口提供了单色的照射区，这样解决了聚焦问题，在其很短时间之后，于1969年，他们应用大数值孔径的光学透镜，达到一个大立体角的激发和荧光收集，这样使用一种普通的氙灯和高压汞灯就能够提供充分的照明，并且可以更有效地选择紫外以及可见光谱的激发波长，另外大角度的激发和荧光收集可有效地减少或消除由于不对称细胞的位向不同而产生的信号偏差，因此能在测量细胞 DNA 的过程中，使其获得极小的变异系数 (Coefficient of variation, CV)，Phywe 脉冲细胞光度计 (ICP22) 即是这种仪器的商品化产品。

60年代末期和70年代初期，是流式细胞计迅速发展的时期，由于把流体喷射偏转技术，激光技术和电子计算机等技术结合使用于流式细胞计上，使静态的细胞术一跃为高自动化的流式细胞术。

1969年，Fulwyler 改进了他于1965年首先报道的流式细胞计的分选细胞装置，应用 Sweet 静电喷射偏转技术，和 Coulter 计数器，能按照要求进行分选细胞，同年，具有实用

意义的细胞分选装置是 Hulett 等提出的，以检测荧光信号为基础的分选装置，1972 年 Bonner 又对分选器作了很大的改进，简化了分选计的操作，并对液流中测量细胞作了改进，在液流离开流动室喷嘴后的空气中，但在液滴形成之前而获得信号，这样在细胞测量和液滴带电之间就缩短了时间延迟，Becton-Dickinson 研制的荧光激活细胞分选仪 (Fluorecence activated cell sorter FACS)，就是基于这种分选装置的仪器，并且已广泛应用到免疫学获得纯种细胞的研究，其他类型的仪器分选装置的原理也基本相同，直到今天，大部分流式细胞仪的分选装置仍采用液滴偏转的原理技术。

在流式细胞计的设计方面，最有雄心的努力是从流动细胞中获得较高的分辨力形态学信号，以上所述的流式细胞计的设计，只有提供细胞某一参数而不能分辨其内部结构，其激发光测量孔径都大于被测的细胞和粒子，是零分辨率的形态信号，在提高分辨率方面 Wheeless 作了大量的研究，他发展了狭缝扫描技术，设计了狭缝扫描流式细胞仪，他采用了丫啶橙荧光染色细胞，使细胞流过一个激发光被聚焦的很窄的光束，分析其荧光脉冲信号，获得低分辨率的形态学信号，但这种技术系统的测量常受到细胞取向的影响。

在流式细胞仪早期发展阶段，很少对其在生物学和医学的应用方面感兴趣，大多数学者对仪器的设计和性能方面关注，随着仪器的不断发展，该技术在生物医学的应用也有了很大发展，Van Dilla 和 Los Alamos 研究组发明了第一台流式细胞仪，激发光源与液流方向和检测的轴线都是相互正交的，在他们仪器中使用了 Crosland-Talor 设计的层流室，也使用了 Coulter 计数，用氩离子激光器作光源，促进了荧光和光散射检测的进一步发展，他们利用该仪器首先对 Feulgen