

# 自制红细胞裂解液对流式细胞术测定外周血T淋巴细胞亚群的影响研究

姜 华<sup>1</sup>, 黄 瑛<sup>1</sup>, 王 超<sup>1</sup>, 秦 超<sup>1</sup>, 孙 立<sup>1</sup>, 韩素芹<sup>1,2</sup>, 王三龙<sup>1</sup>, 文海若<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 比较实验室配制的红细胞裂解液的裂解时间对流式测定SD大鼠和食蟹猴外周血T淋巴细胞亚群的影响。**方法** ①取15只食蟹猴的肝素钠抗凝血各50  $\mu$ l, 血样与荧光检测抗体PerCP-CD3/FITC-CD8/PE-CD4孵育后分别经自制和市售红细胞裂解液裂解一段时间, 比较样本经自制与市售裂解液处理不同时间后其CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>淋巴细胞的平均荧光强度(median fluorescence intensity, MFI)等数值的差异; ②取15只SD大鼠的EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血各50  $\mu$ l, 血样与荧光检测抗体APC-CD3/FITC-CD4/PE-CD8a孵育后, 分别经自制红细胞裂解液和市售裂解液裂解一段时间, 比较样本经自制与市售裂解液处理不同时间后CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的MFI等数值的差异; ③取15只大鼠EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血各50  $\mu$ l, 血样与荧光检测抗体APC-CD3/PE-CD4孵育后, 分别经自制红细胞裂解液和市售裂解液裂解一段时间, 比较样本经自制与市售裂解液处理不同时间后PE-CD4<sup>+</sup>的MFI差异。**结果** ①食蟹猴外周血经自制红细胞裂解液, 裂解时间约15min和5min的FITC-CD8<sup>+</sup>的MFI分别为1 745 $\pm$ 173和2 439 $\pm$ 253, 淋巴细胞百分比分别为47.9% $\pm$ 7.2%和42.1% $\pm$ 7.6%; 裂解时间约15min和5min的PE-CD4<sup>+</sup>的MFI分别为12 924 $\pm$ 892和13 695 $\pm$ 984, 淋巴细胞百分比分别为38.7% $\pm$ 7.2%和33.1% $\pm$ 7.2%。裂解时间约15min比裂解5min的FITC-CD8<sup>+</sup> ( $t=8.779$ ,  $P<0.0001$ ) 和PE-CD4<sup>+</sup> ( $t=2.250$ ,  $P<0.05$ ) 的MFI降低; 淋巴细胞百分比占比 ( $t=2.139$ ,  $2.162$ , 均 $P<0.05$ ) 增高, 差异具有统计学意义。食蟹猴外周血经市售红细胞裂解液裂解15min, FITC-CD8<sup>+</sup>, PE-CD4<sup>+</sup>, PerCP-CD3<sup>+</sup>的MFI分别为2 413 $\pm$ 240, 12 428 $\pm$ 1 208和1 015 $\pm$ 123。与自制裂解液裂解5min比较, 市售裂解液裂解15min的PE-CD4<sup>+</sup>和PerCP-CD3<sup>+</sup>的MFI降低, 差异具有统计学意义 ( $t=3.150$ ,  $4.862$ , 均 $P<0.01$ )。②SD大鼠外周血经自制红细胞裂解液, 裂解时间5min和2min的FITC-CD4<sup>+</sup>的MFI分别为55.72 $\pm$ 14.10和225.08 $\pm$ 12.44; 裂解5min与裂解2min的FITC-CD4<sup>+</sup>的MFI比较差异有统计学意义 ( $t=34.89$ ,  $P<0.001$ ) ; SD大鼠外周血经市售红细胞裂解液, 裂解5min和15min的FITC-CD4<sup>+</sup>的MFI分别为277.02 $\pm$ 30.36和310.04 $\pm$ 43.56, PE-CD8a<sup>+</sup>的MFI分别为3 453.43 $\pm$ 443.19和3 211.28 $\pm$ 357.85; 裂解时间5min与裂解15min的FITC-CD4<sup>+</sup>和PE-CD8a<sup>+</sup>的MFI比较差异有统计学意义 ( $t=2.409$ ,  $P<0.01$ )。③SD大鼠经自制红细胞裂解液, 裂解5min和2min的PE-CD4<sup>+</sup>的MFI分别为1 766 $\pm$ 67, 1 765 $\pm$ 51, 差异无统计学意义 ( $t=0.045$ ,  $P>0.05$ )。**结论** 与市售裂解液比较, 自制红细胞裂解液可缩短裂解时间。将FITC荧光抗体更换为PE荧光抗体后, 在一定的裂解时间内可消除对大鼠测定淋巴细胞MFI的影响; 但随着裂解时间延长会造成FITC和PE荧光抗体MFI值的下降。

**关键词:** 红细胞裂解液; 流式细胞测定法; 外周血T淋巴细胞亚群; 食蟹猴; SD大鼠; 荧光标记

**中图分类号:** R446.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 05-165-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2023.05.031

## Study on the Effect of Homemade Erythrocyte Lysate on Flow Cytometric Determination of Peripheral Blood T Lymphocyte Subsets

JIANG Hua<sup>1</sup>, HUANG Ying<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, QIN Chao<sup>1</sup>, SUN Li<sup>1</sup>, HAN Suqin<sup>1,2</sup>, WANG Sanlong<sup>1</sup>, WEN Hairuo<sup>1</sup>

(1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract: Objective** To compare the effect of the lysis time of lab-prepared erythrocyte lysate on flow cytometric determination

**基金项目:** 国家重点研发计划课题(2021YFA1101602): 干细胞及相关治疗产品质量控制和非临床评价关键技术与规范研究; 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金(GJJS-2022-6-1): 脐带间充质干细胞和CD19嵌合抗原受体T细胞非临床有效性评价方法及药效学机制研究。

**作者简介:** 姜华(1976-), 女, 大学本科, 主管技师, 研究方向: 药理毒理, E-mail: 1828800241@qq.com。

黄瑛(1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 药理毒理, E-mail: huangying1002@nifdc.org.cn。

**通讯作者:** 文海若(1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 药理毒理, E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn。

of peripheral blood T lymphocyte subsets in SD rats and cynomolgus monkeys. **Methods** ① About 50  $\mu$ l of heparin sodium anticoagulated blood from 15 cynomolgus monkeys was taken, the blood sample was incubated with the fluorescent antibodies PerCP-CD3/FITC-CD8/PE-CD4 and lysed by erythrocyte lysate for a period of time, the effect of lysis time on the mean fluorescence intensities (MFI) of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes determined by flow cytometry was compared. ② About 50  $\mu$ l of EDTA-K<sub>2</sub> anticoagulant blood from 15 SD rats, the blood sample was incubated with the fluorescent antibodies APC-CD3/FITC-CD4/PE-CD8a and lysed by erythrocyte lysate for a period of time, the effect of lysis time on the MFI of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes determined by flow cytometry was compared. ③ About 50  $\mu$ l of EDTA-K<sub>2</sub> anticoagulant blood from 15 SD rats, the blood sample was incubated with the fluorescent antibodies APC-CD3/PE-CD4 and lysed by erythrocyte lysate for a period of time, the effects of lysis time on the MFI of PE-CD4<sup>+</sup> lymphocytes determined by flow cytometry was compared. **Results** ① The peripheral blood of cynomolgus monkeys was lysed by self-made erythrocyte lysate and the MFIs of FITC-CD8<sup>+</sup> with lysis time of about 15 min and 5 min were  $1\,745 \pm 173$  and  $2\,439 \pm 253$  respectively, and the percentage of lymphocytes was  $47.9\% \pm 7.2\%$  and  $42.1\% \pm 7.6\%$ . The MFIs of PE-CD4<sup>+</sup> with lysis time of about 15 min and 5 min were  $12\,924 \pm 892$  and  $13\,695 \pm 984$ , and the percentage of lymphocytes was  $38.7\% \pm 7.2\%$  and  $33.1\% \pm 7.2\%$ . The MFI of in FITC-CD8<sup>+</sup> ( $t=8.779$ ,  $P<0.000\,1$ ), PE-CD4<sup>+</sup> ( $t=2.250$ ,  $P<0.05$ ) and percentage of lymphocytes ( $t=2.139$ ,  $2.162$ ; all  $P<0.05$ ) lysed for 15min were significantly lower than those lysed for 5min, and the differences were statistically significant. There was also a difference in the percentage of FITC-CD8<sup>+</sup> and PE-CD<sup>+</sup> lymphocytes ( $t=2.131$ ,  $P<0.05$ ). The peripheral blood of cynomolgus monkeys was lysed by commercially available erythrocyte lysate, and the MFIs of FITC-CD8<sup>+</sup>, PE-CD4<sup>+</sup> and PerCP-CD3<sup>+</sup> with lysis time of about 15 min were  $2\,413 \pm 240$ ,  $12\,428 \pm 1\,208$  and  $1\,015 \pm 123$ , respectively. The MFI of PE-CD4<sup>+</sup> and PerCP-CD3<sup>+</sup> lysed for 15min by homemade lysate were different from the commercial lysate ( $t=3.150$ ,  $4.862$ , all  $P<0.01$ ). ② The peripheral blood of SD rats was lysed with self-made erythrocyte lysate, the MFIs of FITC-CD4<sup>+</sup> with lysis time of 5 min and 2 min were  $55.72 \pm 14.10$  and  $225.08 \pm 12.44$ , and the lysis time of 5 min was significantly different from that of FITC-CD4<sup>+</sup> with 2 min lysis ( $t=34.89$ ,  $P<0.001$ ). The peripheral blood of SD rats was lysed with commercially available lysate, the MFIs of FITC-CD4<sup>+</sup> for 5 min and 15min lysis were  $277.02 \pm 30.36$  and  $310.04 \pm 43.56$ , and the MFIs for 5 min and 15 min PE-CD8a<sup>+</sup> were  $3\,453.43 \pm 443.19$  and  $3\,211.28 \pm 357.85$ , and the MFIs of FITC-CD4<sup>+</sup> and PE-CD8a<sup>+</sup> lysed for 5 min were significantly different from those lysed for 15 minutes ( $t=2.409$ ,  $P<0.01$ ). ③ The MFIs of PE-CD4<sup>+</sup> lysed by homemade erythrocyte lysate in SD rats were  $1\,766 \pm 67$ ,  $1\,765 \pm 51$ , and there was no significant change between the two ( $t=0.045$ ,  $P>0.05$ ). **Conclusion** Compared with commercially available lysates, homemade lysates could shorten the lysate time. When the FITC fluorescent antibody was replaced with PE fluorescent antibody, the influence on the determination of lymphocyte MFI in rats could be eliminated within the same lysis time. However, when the lysis time was extended to 3 times, the MFIs of FITC and PE fluorescent antibody were affected to some extent.

**Keywords:** erythrocyte lysate; flow cytometry; T lymphocyte subsets in peripheral blood; cynomolgus monkey; SD rats; fluorescent labeling

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是使用流式细胞仪开展的试验技术, 可在细胞、分子水平上通过识别荧光标记的单克隆抗体, 对单个细胞或其他生物因子进行定量分析和分选<sup>[1]</sup>。使用流式细胞术对动物淋巴细胞免疫表型进行检测, 已成为药物非临床安全性评价中常规的药物免疫毒性评价手段<sup>[2]</sup>。其中, CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的表达量是最常见的检测对象。体内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞作为辅助/诱导细胞亚群, 通过分泌的淋巴因子增强免疫应答; 而 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞为抑制/细胞毒细胞亚群, 具有特异性杀伤病毒和肿瘤等作用<sup>[3]</sup>。检测时通常以一定量细胞 (多通常为 5 000 个至 20 000 个) 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)、细胞计数值、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值等指标是药物临床前免疫毒性主要评价的常用考察指标<sup>[4-5]</sup>。

淋巴细胞分类计数样本制备的操作流程, 如红细胞的去除效果、红细胞的裂解时间及红细胞裂解液的制备方法对检测数值存在重要影响。故本研究以药物非临床安全性评价常用动物食蟹猴和 SD 大鼠的外周血样本作为研究对象, 比较其经市售和自制的红细胞裂解液分别处理不同时间后, 对外周血淋巴细胞表型检测结果的影响, 为相关流式检测提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 食蟹猴, 普通级, 约 3 ~ 4 岁, 共 15 只, 均为雌性, 由昆明亚灵生物科技有限公司提供, 动物生产许可证号为 SCXK (滇) 2020-007。饲养于国家药物安全评价监测中心的普通级动物房内, 单笼饲养, 自由饮水, 每天定量给饲料和水果 (各 150 g), 自由摄取。饲养环境中温度和相对湿度

度分别控制在 16℃~26℃和 40%~70%，每小时换气次数不少于 8 次，每天照明 12 h，饲养 3 周，适应环境后采血测定。

SD 大鼠，SPF 级，9~10 周龄，共 15 只，均为雌性，繁育单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为 SCXK（京）2021-0011。饲养于国家药物安全评价监测中心屏障系统内的大鼠笼具中（460mm×315mm×210mm），饲养密度为 2~3 只/笼。自由饮水与摄取饲料。饲养环境中温度和相对湿度分别控制在 20℃~26℃（日温差≤3℃）和 40%~70%，每小时最低换气次数为 15 次/h，照明时间为 12h/天。动物检疫适应 5 天后进行测定。

试验方案经国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会审阅并批准（编号：IACUC-2022-054 和 IACUC-2022-061）。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪、分析软件 Cell Quest™，FACS Aria III 流式细胞仪、分析软件 Diva（美国 BD 公司）；H-60R 高速离心机（日本 Kokusan 公司）；流式仪校准微球：BD Calibrite™ 3-color（批号 1190654），APC bead（批号 98738），CS&T 荧光校准微球（批号 1088460）均购自美国 BD 公司；流式检测抗体：异硫氰酸荧光素标记的抗 CD8 抗体 FITC-CD8（批号 0104976），PE-CD4（批号 9172628），PerCP-CD3（批号 0205481），异硫氰酸荧光素标记的抗 CD4 抗体 FITC-CD4（批号 8274677），PE-CD8a（批号 7271748），APC-CD3（批号 1308882），市售红细胞裂解液用前十倍稀释（批号 1029757）均购自美国 BD 公司。配制用的红细胞裂解液主要成分：氯化氨（批号 20161208）、碳酸氢钾（批号 20150924）、乙二胺四乙酸二钠（批号 20140328）和多聚甲醛（批号 20150120）购自国药集团；按照裂红液 1L 体积配制，氯化铵 8.29 g，碳酸氢钾 1.0 g，乙二胺四乙酸二钠 0.372 g。磷酸盐缓冲液（美国 Hyclone 公司，批号 AH29787896）；肝素钠抗凝管（江苏康健医疗用品有限公司，批号 22020301），EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管（比克曼生物公司，批号 20220408）。

### 1.3 方法

1.3.1 食蟹猴血样制备与分析：采集食蟹猴前臂静脉血，每只约 0.3~0.5 ml，共 15 只。将样品添加至肝素钠抗凝管中混匀；取荧光检测抗体 PerCP-CD3/FITC-CD8/PE-CD4 各 5 μl，与肝素抗凝血 50 μl 混合。样本在室温下避光孵育 20~30 min 后，加入配制的红细胞裂解液约 1ml 后混匀，裂解以肉眼可见澄清为准，同样操作分别制备 3 套样本，采用不同裂解时间，自制裂解液裂解时间约为 5 min 或 15

min，市售裂解液裂解时间约为 15 min。以 200 × g 离心 5 min，弃上清，加入适量 PBS 清洗一次，再次加入含 1g/100ml 多聚甲醛的 PBS 重悬细胞上机测定。所有血样均在采集后 4h 内完成制备与测定分析。上机检测前通过 CS&T 荧光校准微球质控。在散点图上圈选淋巴细胞群去粘连，并使用空白对照管和单荧光标记管调节电压和荧光补偿，每个样本收集 5 000 个淋巴细胞，分析猴 T 淋巴细胞亚群的 MFI 和淋巴细胞百分比。

1.3.2 SD 大鼠血样采集与制备：采集 SD 大鼠腹主静脉血约 0.5 ml，将样品添加至 EDTA-K<sub>2</sub> 的抗凝管中混匀，共 30 只，分别制备样本。①取 2 μl APC-CD3，1 μl FITC-CD4 和 2 μl PE-CD8a，分别与 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝大鼠血 50 μl 混合。样本在室温下避光孵育 20~30 min 后，加入配制的红细胞裂解液约 1ml。同样操作共制备 4 套，自制裂解液用 15 只大鼠血样，市售裂解液用 15 只大鼠血样，分别制备各自比较。采用自制裂解液裂解时间约为 2 min 或 5 min，市售裂解液裂解时间约为 5 min 或 15min。加入适量 PBS 清洗一次，加入适量含 1g/dl 多聚甲醛的 PBS 重悬细胞，分别上机测定。②取其中 15 只大鼠血样分别制备 2 套样本，与 APC-CD3/PE-CD4 各 2 μl，与 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝大鼠血 50 μl 混合。孵育结束后加入配制的红细胞裂解液。采用自制裂解液裂解时间约为 2 min 或 5 min，以 200 × g 离心 5 min，弃上清，加入适量 PBS 清洗一次，再次加入含 1g/100ml 多聚甲醛的 PBS 重悬细胞上机测定。所有血样均在采集后 4h 内完成制备与测定分析。上机检测前通过四色荧光校准微球质控。在散点图上圈选淋巴细胞群去粘连，并使用空白对照管和单荧光标记管调节电压和荧光补偿，每样收集 5 000 个淋巴细胞，分析大鼠 T 淋巴细胞亚群的 MFI 和淋巴细胞百分比。

1.4 统计学分析 采用 IBM SPSS Statistics 26.0 分析数据，计数资料以例（*n*）表示，行 *F* 检验；符合正态分布的计量数据以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。如果为等方差，两组间行独立样本 *t* 检验。如果为异方差，在  $n_1 = n_2$  时，进行 Aspin-Welch 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 自制红细胞裂解液及市售裂解液不同裂解时间对食蟹猴淋巴细胞亚群检测结果的影响 不同红细胞裂解液对食蟹猴 T 淋巴细胞 MFI 和百分比的影响见表 1 和表 2。检测结果提示，FITC 标记的 CD8<sup>+</sup> 细胞经自制红细胞裂解液裂解 15 min 时的 MFI 与裂解 5 min 时相比，下降约 28.5%，差异具有统计学意义（*t*=8.779，*P* < 0.001）；其百分比升高 16.9%，

差异具有统计学意义 ( $t=2.139$ ,  $P < 0.05$ )。PE 标记的  $CD4^+$ T 细胞经自制红细胞裂解液中裂解 15 min 时的 MFI 与裂解 5 min 时相比, 下降约 5.6%, 其百分比升高 13.8%, 差异具有统计学意义 ( $t=2.162$ ,  $P < 0.05$ )。自制红细胞裂解液在不同裂解时间条件下对  $CD3^+$  荧光抗体 MFI ( $t=0.945$ ,  $P > 0.05$ ) 和淋巴细胞百分比 ( $t=0.348$ ,  $P > 0.05$ ), 以及  $CD4/CD8$  比值均未见明显影响 ( $t=0.321$ ,  $P > 0.05$ )。

参考市售样品使用说明, 食蟹猴样本需裂解 15 min, 裂解时间较长。与自制裂解液裂解 5min 后检测值比较, 食蟹猴样本经市售裂解液裂解 15 min 后, FITC 标记的  $CD8^+$  细胞 MFI 和百分比均未见差异。

表 2 不同裂解时间对食蟹猴外周血 T 淋巴细胞百分比 (%) 结果 ( $n=15$ )

裂解液种类	裂解时间 (min)	FITC- $CD8^+$ (%)	PE- $CD4^+$ (%)	$CD4/CD8$ (%)	PerCP- $CD3^+$ (%)
自制裂解液	5	42.1 $\pm$ 7.6	33.1 $\pm$ 7.2	0.8 $\pm$ 0.2	78.9 $\pm$ 7.7
	15	47.9 $\pm$ 7.2	38.7 $\pm$ 7.2	0.8 $\pm$ 0.3	79.8 $\pm$ 8.6
市售裂解液	15	43.6 $\pm$ 8.5	34.3 $\pm$ 7.2	0.8 $\pm$ 0.3	81.7 $\pm$ 8.4

2.2 自制红细胞裂解液及市售裂解液不同裂解时间对 SD 大鼠淋巴细胞亚群检测结果的影响 不同红细胞裂解液对 SD 大鼠 T 淋巴细胞 MFI 的影响见表 3。在 SD 大鼠外周血 T 淋巴细胞中, FITC 标记的  $CD4^+$  细胞在自制红细胞裂解液中裂解 5 min 比 2 min 的 MFI 下降约 75.2%, 差异具有统计学意义 ( $t=34.890$ ,  $P < 0.001$ )。裂解 5 min 的样本中 PE 标记的  $CD8a^+$  杀伤性 T 细胞的 MFI 虽降低约 7.8%, 但与裂解 2 min 的样本比较差异无统计学意义 ( $t=1.574$ ,  $P > 0.05$ )。市售的裂解液裂解 5 min 与 15 min 后比较, 样本经市售裂解液裂解 15 min 后, FITC 标记的  $CD4^+$  细胞 MFI 升高 10.7%, 而 PE 标记的  $CD8a^+$  细胞 MFI 降低 7.5%, 差异具有统计学意义 ( $t=2.409$ ,  $P < 0.05$ )。自制和市售的红细胞裂解液不同裂解时间对  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  和  $CD4^+/CD8^+$  的百分比无影响, 见表 4。

表 3 裂解时间对 SD 大鼠 T 淋巴细胞 MFI 的影响 ( $n=15$ )

裂解液种类	裂解时间 (min)	PE- $CD8a^+$	FITC- $CD4^+$
自制裂解液	2	3881.86 $\pm$ 471.69	225.08 $\pm$ 12.44
	5	3578.26 $\pm$ 579.25	55.72 $\pm$ 14.10
市售裂解液	15	3211.28 $\pm$ 357.85	310.04 $\pm$ 43.56
	5	3453.43 $\pm$ 443.19	277.02 $\pm$ 30.36

表 4 不同裂解时间对 SD 大鼠外周血 T 淋巴细胞百分比 (%) 的影响 ( $n=15$ )

裂解液种类	裂解时间 (min)	$CD3^+CD4^+$	$CD3^+CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$
自制裂解液	2	58.32 $\pm$ 3.38	37.42 $\pm$ 3.80	1.58 $\pm$ 0.27
	5	57.91 $\pm$ 4.05	37.14 $\pm$ 3.94	1.59 $\pm$ 0.28
市售裂解液	15	62.42 $\pm$ 10.45	34.57 $\pm$ 10.59	2.30 $\pm$ 2.00
	5	63.27 $\pm$ 8.18	32.60 $\pm$ 8.62	2.26 $\pm$ 1.45

### 3 讨论

但 PE 标记的  $CD4^+$  细胞和 PerCP 标记的  $CD3^+$  细胞的 MFI 则分别降低至 9.25% 和 20.3%, 差异具有统计学意义 ( $t=3.150$ , 4.862, 均  $P < 0.01$ )。此外, PE 标记的  $CD4^+$  细胞 ( $t=0.478$ ,  $P > 0.05$ ) 和 PerCP 标记的  $CD3^+$  细胞的百分比 ( $t=0.945$ ,  $P > 0.05$ ), 以及  $CD4/CD8$  比值 ( $t=1.828$ ,  $P > 0.05$ ) 均未见明显影响。

表 1 裂解时间对食蟹猴 T 淋巴细胞 MFI 的影响 ( $n=15$ )

裂解液种类	裂解时间 (min)	FITC- $CD8^+$	PE- $CD4^+$	PerCP- $CD3^+$
自制裂解液	5	2 439 $\pm$ 253	13 695 $\pm$ 984	1 273 $\pm$ 164
	15	1 745 $\pm$ 173	12 924 $\pm$ 892	1 218 $\pm$ 154
市售裂解液	15	2 413 $\pm$ 240	12 428 $\pm$ 1208	1 015 $\pm$ 123

使用流式细胞术对淋巴细胞亚群进行分类计数是非临床安全性评价中常规的免疫毒性评价手段之一, 用以评价药物的免疫毒性风险。常见的淋巴细胞亚群分类指标包括  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  等。细化试验条件和积累经验有助于控制和减少检测中的干扰因素, 从而保证检测结果的可靠性和准确性。多种因素可对流式法细胞表型测定结果产生影响, 包括样本本身的因素和样本制备因素等。其中样本自身的因素包括: ①来源: 动物的种属、性别、年龄和免疫状态<sup>[6]</sup>; ②制备条件: 放置时间、是否存在凝血或溶血<sup>[7]</sup>、抗凝剂的选择; ③仪器的性能及日常维护与操作; ④荧光抗体的选择等<sup>[8-11]</sup>。本研究中大鼠样本检测结果提示, 自制红细胞裂解液对 FITC 标记的  $CD4^+$  淋巴细胞的 MFI 有明显降低的作用, 更换强荧光抗体标记后, 在一定红细胞裂解时间内 (大鼠常规裂解时间的两倍) 可消除其对 MFI 的影响。在食蟹猴样本检测时发现裂解时间超过时间的三倍以上时, FITC- $CD8^+$  的 MFI 值明显降低, 而 PE- $CD4^+$  的 MFI 值和淋巴细胞百分比也有所影响。上述结果提示, 随裂解时间延长, 裂解液对荧光抗体的影响有所增加。

出现上述现象的原因首先可能与荧光染料 (FITC 和 PE) 自身特性, 如荧光强度、稳定性及荧光淬灭衰减速率等有关<sup>[12]</sup>, 首先荧光染料 PE 的荧光强度明显高于荧光染料 FITC; 其次 FITC 染料比 PE 染料易受干扰, FITC 和 PE 均由 488 nm 的蓝色激光器激发, FITC 最大发射光波长为 520 nm ~530 nm, 接受蓝色激光器激发后呈现绿色荧光; 而 PE 的发射光波长为 595 nm, 接受蓝色激光器激发后呈现红色荧光, 与绿色荧光比相比, 激发光对

于红色荧光的发射光和本底荧光的影响较小。同时试验中发现, FITC 与 PE 染料相比更易于淬灭, 也许是样本中淋巴细胞的细胞膜随着裂解时间延长发生一定裂解作用相关<sup>[13]</sup>。第三, 可能与 FITC 相结合的淋巴细胞膜的荧光信号易破坏程度高于 PE 荧光染料, 导致 FITC 荧光抗体与淋巴细胞膜表面的 CD 分子结合力下降, 影响了 MFI 数值。这一现象也可能说明 FITC 荧光抗体与细胞结合力较差有关。食蟹猴实验中辅助性 T 淋巴细胞和杀伤性 T 淋巴细胞的百分比均增高, 推测原因可能是细胞膜破裂后, 结合在细胞膜上的微弱信号被流式细胞仪识别, 导致其淋巴细胞的占比有所增加。因此, 流式试验中对于全血样本的制备时应严格控制红细胞的裂解时间, 以避免影响目的细胞的平均荧光强度的表达。

实验室常规使用的红细胞裂解液的主要成分包括  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$  和 EDTA 等。其中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的主要作用是改变细胞膜的渗透压, 并在 EDTA 的共同作用下导致红细胞的破裂。但随红细胞裂解液作用时间延长, 对粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的抗原表达量均存在影响, 其中对粒细胞的影响最大, 其次是单核细胞和淋巴细胞。本研究发现裂解时间延长对淋巴细胞的 MFI 产生了一定的影响, 提示制备髓系细胞样本时, 需严格控制红细胞裂解的时间<sup>[14]</sup>。现有市售红细胞裂解液可在稀释后直接用于红细胞裂解, 但费用高且裂解时间较长(说明书建议时间通常为 15 min)。本研究比较了自制裂解液和市售裂解液对各检测指标的影响, 结果提示食蟹猴样本使用自制裂解液的裂解约 5 min 的检测结果与市售裂解液裂解 15 min 相比更佳; 大鼠样本使用自制裂解液的裂解约 2 min 的检测结果与市售裂解液裂解 5 min 相比基本相当。因此, 使用自制的红细胞裂解液可在节省成本的同时缩短检测时间。当前用于流式检测的新型荧光抗体不断涌现, 检测表达量较低的细胞时应根据强弱搭配的原则, 选择灵敏度较高且特异度强的抗体<sup>[15-16]</sup>。

本研究仅以市售红细胞裂解液作为自制裂解液的参照比对, 未对不同裂解时间作进一步比较分析。今后应继续总结经验, 以确定更为合适的裂解时间。

综上所述, 使用自制的红细胞裂解液时, 延长裂解时间可影响 FITC 荧光标记的检测结果以及淋巴细胞 MFI 和细胞百分占比, 从而影响检测结果的准确性。将 FITC 荧光抗体更换为 PE 荧光抗体后, 在相同的裂解时间内可消除对大鼠测定淋巴细胞 MFI 的影响; 但裂解时间延长至三倍时长后对其 FITC 和 PE 荧光抗体的 MFI 有一定影响。本研究比较了不同裂解时间对流式测定外周血 T 淋巴细胞亚群的影响, 为非临床药物安全性评价的流式检测

方法提供数据支持。

#### 参考文献:

- [1] 杭海英, 刘春春, 任丹丹. 流式细胞术的发展、应用及前景[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(9): 68-83.  
HANG Haiying, LIU Chunchun, REN Dandan. Development, application and prospect of flow cytometry[J]. China Biotechnology, 2019, 39(9): 68-83.
- [2] 李新, 王园园, 侯婉毅, 等. 外周血 T 淋巴细胞亚群流式检测方法的优化及验证[J]. 生物技术进展, 2022, 12(5): 786-792.  
LI Xin, WANG Yuanyuan, HOU Wanyi, et al. Method optimization and validation of flow cytometry for detection of T lymphocyte subsets in peripheral blood[J]. Curr Biotechnol, 2022, 12(5): 786-792.
- [3] 杨锐创, 胡燕, 屈蒙蒙, 等. 多聚甲醛固定对流式细胞术检测人外周血淋巴细胞亚群的影响[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(10): 729-733.  
YANG Ruichuang, HU Yan, QU Mengmeng, et al. Evaluation for impacts of paraformaldehyde fixation on detection of flow cytometry for human peripheral blood lymphocyte subsets[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2020, 38(10): 729-733.
- [4] 鞠颖慧, 莫惠芳, 吴蕙, 等. 2 种 6 色流式细胞术试剂检测淋巴细胞亚群的性能比较[J]. 检验医学, 2022, 37(3): 270-273.  
JU Yinghui, MO Huifang, WU Hui, et al. Performance comparison of lymphocyte subset determination by 6-color flow cytometry with 2 different reagents[J]. Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 270-273.
- [5] 李雪, 丁艳, 黄玲, 等. HIV/TB 并发感染患者外周血 T 淋巴细胞表达及与 HIV RNA 载量的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 88-91, 124.  
LI Xue, DING Yan, HUANG Ling, et al. Study on the expression of T lymphocytes in peripheral blood and its correlation with HIV RNA in HIV/TB co-infected patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(1): 88-91, 124.
- [6] 陈潇, 吴丽娟. 抗凝剂、标本保存温度和保存时间对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 146-147, 150.  
CHEN Xiao, WU Lijuan. Empirical study of the influence of anticoagulant, storage temperature and time on the detection of peripheral blood T-lymphocyte subgroups by flow cytometry[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(2): 146-147, 150.
- [7] 陈潇, 吴丽娟. 两种不同溶血免洗方法对流式 T 淋巴细胞亚群检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 151-153.  
CHEN Xiao, WU Lijuan. Effects of two different haemolyzing/no washing methods on T-lymphocyte subgroups detection by flow cytometry[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(2): 151-153.
- [8] 胡泽斌, 李博, 曲守方, 等. 流式细胞术检测试剂质量控制要点分析[J]. 中国药事, 2021, 35(10): 1142-1148.  
HU Zebin, LI Bo, QU Shoufang, et al. Analysis to the key points of quality control for flow cytometry detection reagents[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2021, 35(10): 1142-1148.
- [9] 班玉梅, 霍伟, 赵萌, 等. 一种新的淋巴细胞亚群流

- 式细胞检测方法的建立[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(7): 1235-1242.
- BAN Yumei, HUO Wei, ZHAO Meng, et al. A novel method of applying flow cytometry to detect lymphocyte subsets[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2021, 28(7): 1235-1242.
- [10] 吴丹蕾. 流式细胞术在临床检验中的应用研究[J]. 东方药膳, 2021(3): 104.
- WU Danlei. Research on the application of flow cytometry in clinical testing[J]. Oriental Medicated Diet, 2021(3): 104.
- [11] 郭冉, 李芸芊, 屠鹏飞, 等. 小鼠B细胞亚群及其组织分布的流式细胞检测方法的优化[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(4): 302-310.
- GUO Ran, LI Yunqian, TU Pengfei, et al. Optimization of analysis of mouse B-cell subgroups and their tissue distributions with flow cytometry[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2020, 34(4): 302-310.
- [12] 姜华, 刘丽, 李路路, 等. 不同荧光标记检测抗体组合及不同抗凝剂对流式测定食蟹猴T淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(5): 391-399.
- JIANG Hua, LIU Li, LI Lulu, et al. Impact of different fluorescence labeled antibody combinations and different anticoagulants on the detection of T lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys by flow cytometry[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2021, 16(5): 391-399.
- [13] 任向华, 李新萍. 影响血液样本检验质量的相关因素及管控措施[J]. 东方药膳, 2020(15): 11.
- REN Xianghua, LI Xinping. Relevant factors affecting blood sample test quality and control measures[J]. Oriental Medicated Diet, 2020(15): 11.
- [14] 崔巍, 刘飒, 蔡伦, 等. 流式细胞术分析小鼠外周血免疫细胞全血裂解试剂比较研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(2): 491-495.
- CUI Wei, LIU Sa, CAI Lun, et al. Comparative study of whole blood lysis reagents for analysis of immunocytes in peripheral blood of mice by flow cytometry[J]. Journal of Experimental Hematology, 2011, 19(2): 491-495.
- [15] 王丙瑞. 影响血液样本检验质量的相关因素及管控措施[J]. 中国卫生产业, 2020, 17(12): 147-149.
- WANG Bingrui. Relevant factors affecting blood sample test quality and control measures[J]. China Health Industry, 2020, 17(12): 147-149.
- [16] 费奇力, 王维维, 袁向亮, 等. 标本前处理因素对流式细胞术检测淋巴细胞亚群的影响[J]. 诊断学理论与实践, 2014, 13(3): 325-328.
- FEI Qili, WANG Weiwei, YUAN Xiangliang, et al. Effect of pre-analytical factors on detection of lymphocyte subset by flow cytometry[J]. Journal of Diagnostics Concepts & Practice, 2014, 13(3): 325-328.

收稿日期: 2023-03-24

修回日期: 2023-06-14

- (上接第164页) 童外周血白细胞形态参数的变化及临床意义研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(9): 925-927.
- ZHANG Lei, DUAN Xiaojing, WANG Jinhua, et al. Study on the changes of parameter of peripheral blood leucocytes in physical examination of children[J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2017, 25(9): 925-927.
- [5] KHARTABIL T A, DE FRANKRIJKER M M, DE RIJKE Y B, et al. The sysmex XN-L (XN-350) hematology analyzer offers a compact solution for laboratories in niche diagnostics[J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2021, 43(1): 29-39.
- [6] LEE J, CHO Y, KIM H S, et al. A comparison of the analysis of 3 types of body fluids using the XN-350 hematology analyzer versus light microscopy assessment[J]. Medicine, 2021, 100(11): e24852.
- [7] 张金彪, 代荣琴. ISO 15189 医学实验室认可标准下血细胞分析仪故障修复后的检验质量验证[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 168-172.
- ZHANG Jinbiao, DAI Rongqin. Verification of inspection quality after repair of blood cell analyzer failure by ISO 15189 medical laboratory accreditation standards[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 168-172.
- [8] 刘振玲, 王兴丽, 王劲松. SYSMEX XN-3000 全自动血细胞分析仪的性能验证[J]. 医疗装备, 2019, 32(7): 51-54.
- LIU Zhenling, WANG Xingli, WANG Jinsong. Performance verification of SYSMEX XN-3000 automated hematology analyzer[J]. Medical Equipment, 2019, 32(7): 51-54.
- [9] BRUEGEL M, NAGEL D, FUNK M, et al. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: abbott cell-dyn sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(7): 1057-1071.
- [10] BECKER P H, FENNETEAU O, DA COSTA L. Performance evaluation of the Sysmex XN-1000 hematology analyzer in assessment of the white blood cell count differential in pediatric specimens[J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2016, 38(1): 54-63.
- [11] KONTOS A, WILLOUGHBY S, LUSHINGTON K, et al. Increased platelet aggregation in children and adolescents with sleep-disordered breathing[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2020, 202(11): 1560-1566.
- [12] GURSEL O, ATAY A A, KUREKCI A E, et al. Platelet aggregation in children with *Helicobacter pylori* infection[J]. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 2010, 16(6): 637-642.
- [13] LIN C Y, HWANG D, CHIU N C, et al. Increased detection of viruses in children with respiratory tract infection using PCR[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(2): 564.

收稿日期: 2023-03-01

修回日期: 2023-06-14