

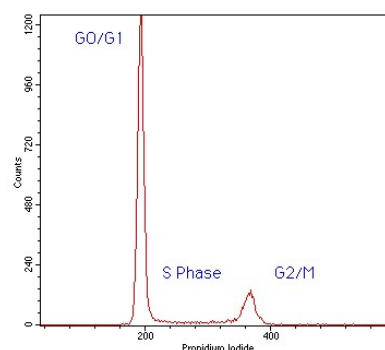
第 1 章 流式細胞技術發展與應用

十九世紀初開始，科學家們就不斷地在探索測量細胞的新技術，1972 年史丹福大學的幾位教授（LA Herzenberg 等）研製出螢光活化細胞分選儀的原型機，從此細胞測量技術進入一新紀元。1973 年 Becton Dickinson 公司與史丹福大學合作，以 FACS 商標名推出了第一台流式細胞分選儀 (Fluorescence-activated cell sorter, FACS)，售予原研發機構史丹福大學遺傳系。隨著單株抗體技術的發展，流式細胞儀檢測技術 (Flow Cytometer, FCM) 已經廣泛使用在基礎研究和臨床實驗的各個方面，包括細胞生物學、腫瘤學、血液學、免疫學、藥理學、遺傳學及臨床檢驗學等領域，對各個學科的發展發揮著重要作用。

1.1 流式細胞技術的臨床應用

1.1.1 在腫瘤學中的應用

這是 FCM 在臨床醫學中應用最早的一個領域。首先需要把實體瘤組織剪碎解聚、製備成單細胞懸浮液，用螢光染料染色後對細胞的 DNA 含量進行分析，將原本不易區分的群體細胞分成三個亞群(G1 期，S 期和 G2 期)，DNA 含量直接代表細胞的倍體狀態，非倍體細胞與腫瘤惡性程度有關。DNA 分析在腫瘤學中的應用有：



發現癌前病變，協助腫瘤早期診斷

人體正常組織發生癌變要經過一個由量變到質變的漫長過程，而癌前細胞即處於量變過程中向癌細胞轉化階段。人體正常的體細胞均具有比較穩定的 DNA 二倍體含量。當人體發生癌變或具有惡性潛能的癌前病變時，在其發生、發展過程中可伴隨細胞 DNA 含量的異常變化，FCM 可精確定量 DNA 含量的變化，作為診斷癌前病變發展至癌變中的一個有價值的標誌，能評估癌前病變的性質及發展趨勢，有助於癌變的早期診斷。有文獻資料證實，癌前病變的癌變發生率與細胞不典型增生程度有密切關係，增生程度越重，癌變發生率越高。隨著細胞不典型增生程度的加重，DNA 非整倍體出現率增高，這是癌變的一個重要標誌。

在腫瘤的診斷、預後判斷和治療中的作用

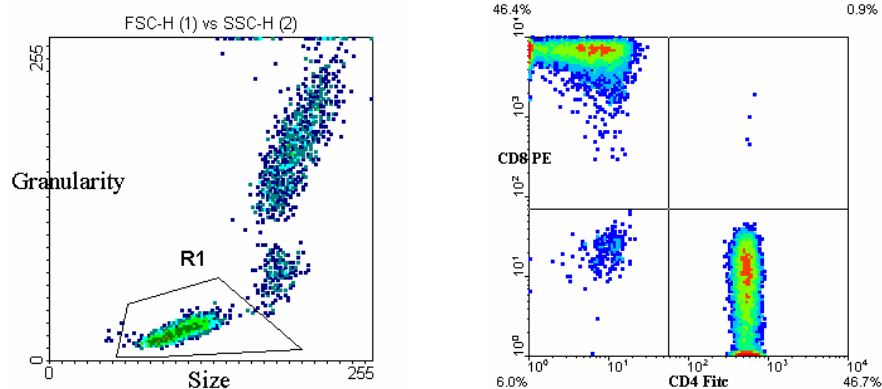
各國病理學家多已認可 FCM 在腫瘤診斷中的重要作用性。DNA 非整倍體細胞峰的存在可為腫瘤診斷提供有力的依據，FCM 分析病理細胞具有速度快、數據量大，敏感度高、優點，已被用在臨床常規工作中。一般而言，腫瘤細胞 DNA 倍體分析對病人預後的判斷有重要作用，異倍體腫瘤惡性病變的復發率高、轉移率高、死亡率也高，而二倍體及近二倍體腫瘤的預後則較好。

FCM 不僅可對惡性腫瘤 DNA 含量進行分析，還可根據化療過程中腫瘤 DNA 分布直方圖的變化去評估療效，了解細胞動力學變化，對腫瘤化療具有重要意義。臨床醫師可以根據細胞周期各時相的分布情況，依據化療藥物對細胞動力學的干擾理論，設計最佳的治療方案，從 DNA 直方圖直接地看到腫瘤細胞的殺傷變化，及時選用有效的藥物，對腫瘤細胞達到最大的殺傷效果。

此外 FCM 近幾年還被應用於細胞凋亡和多藥耐藥基因的研究中。醫學工作者開始研究如何用藥物誘導癌細胞死亡。通過對細胞體積、光散射、DNA 含量及特異性抗原基因（如 bcl-2, Fas 等）測定分析出細胞凋亡情形。多藥耐藥性是腫瘤病人化療失敗的主要原因，FCM 對多藥耐藥基因（P170 等）、凋亡抑制基因、及凋亡活化基因表達的測定，可為臨床治療效果分析提供有力依據。

1.1.2 在臨床免疫中的作用

FCM 通過螢光抗原抗體檢測技術對細胞表面抗原分析，進行細胞分類和亞群分析。這一技術對於人體細胞免疫功能的評估以及各種血液病及腫瘤的診斷和治療有重要作用。有大量文獻資料介紹了淋巴細胞亞群等在各種疾病中的變化。正常人群淋巴細胞 T4 : T8 比值大約為 2 : 1，但在人體細胞免疫力低下時可出現比例倒置（1 : 2）。用 FCM 還可以監測腎移植後病人的腎排斥反應，如果 T4/T8 比例倒置，病人預後良好，較少發生腎排斥現象；反之排異危險性增加。同樣此種測定技術也用於愛滋病的診斷和治療中。目前 FCM 用的各種單株抗體試劑已經發展到了百餘種，可以對各種血細胞和組織細胞的表型進行測定分析。



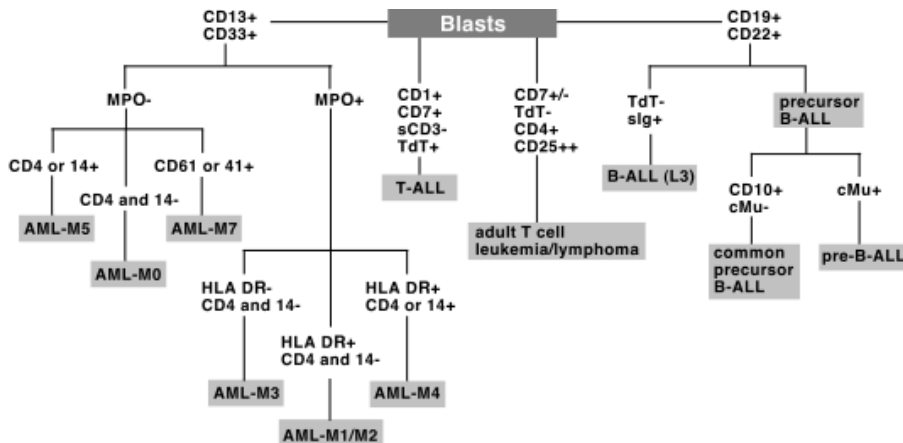
1.1.3 在血液病診斷和治療中的應用

FCM 通過對周邊血細胞或骨髓細胞表面抗原和 DNA 的檢測分析，對各種血液病的診斷、預後判斷和治療有著舉足輕重的作用。常見的應用有：

白血病的診斷和治療

FCM 採用各種抗血細胞表面分化抗原的單株抗體，借助於各種螢光染料來測定一個細胞的多種參數，以正確地判斷出該細胞的屬性。各種血細胞系統都具有其獨特的抗原，當形態學檢查難以區別時，免疫表型參數對各種急性白血病的診斷有決定性作用。例如造血幹細胞表達 CD34，髓系表達 CD13、CD14，B 細胞系表達 CD10、CD19、CD20 等，T 細胞系表達 CD2、CD3、CD5、CD7，利用 FCM 可以測定出血細胞表達各種抗原的情形，協助臨床鑑別診斷。

同其它腫瘤的治療一樣，測定 DNA 倍體和進行細胞周期分析對指導白血病化療有一定作用，不同的白血病患者或同一患者在不同病期白血病細胞增殖狀況不同，定期了解細胞增殖情況採取相應藥物可以提高療效。



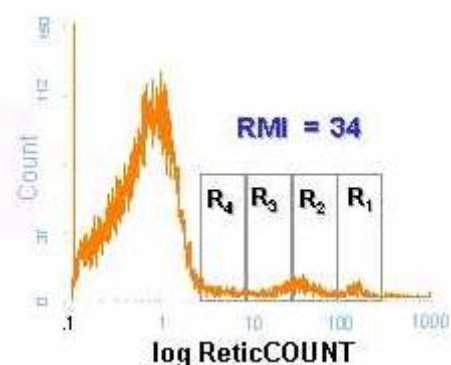
目前臨床除化療藥物治療外，還採用造血幹細胞移植技術治療急性白血病、和一些疑難性疾病。FCM 通過對人白細胞抗原配型的測定，可以為異體造血幹細胞移植病人選擇出最合適的捐血人。造血幹細胞移植技術主要包括幹細胞的鑒別、活性測定、幹細胞動員和採集、分離純化、保存擴增、腫瘤細胞的淨化、幹細胞回輸以及術後保持移植物抗宿主病的低發生率等一系列過程。FCM 測定 CD34、HLA-DR、CD33 等細胞表面標誌物，成為幹細胞移植技術重要的監測手段。用 FCM 檢測一系列指標觀察病人的恢復狀態，可以對預後做出早期的判斷。

其它血液病的診斷和治療監測

陣發性睡眠性血紅蛋白尿症是一種造血幹細胞株病，細胞 CD55、CD59 抗原表達減低是該病的一個特點。該抗原屬於血細胞表面 Glycophosphatidyl Inositol-Linked 蛋白家族，是重要的補體調節蛋白，它通過與補體 C8、C9 的結合以阻止補體膜攻擊複合物的形成，從而抑制細胞被補體激活溶解。FCM 採用螢光標記的單株抗體對血細胞 CD55 與 CD59 的表達做定量分析，可以協助臨床做出診斷並判斷疾病的嚴重程度。

網織紅細胞的測定

網織紅細胞計數是反映骨髓造血功能的重要指標，FCM 通過某些螢光染料（例如 ReticCount）與紅細胞中 RNA 結合，定量測定網織紅細胞中 RNA，得到網織紅細胞占成熟紅細胞的百分比。有作者報導 FCM 方法比目測法結果精確度更高。此外 FCM 還可以測量出網織紅細胞的成熟度，對紅細胞增殖能力的判斷很有意義，為幹細胞移植術後恢復的判斷、貧血的治療監測、腫瘤病人放化療對骨髓的抑制狀況等提供依據。



1.1.4 在血栓與出血性疾病中的應用

血小板功能的測定

正常情況下血小板以分散狀態在血管內運行，但當血管損傷、血流改變或受到化學物質刺激時血小板被活化而發生一系列改變。由於血小板的活化程度可由血小板膜糖蛋白表達情形的高低來判斷，FCM 測定血小板膜糖蛋白的表達情況成為檢查血小板功能的一種新手段。該方法靈敏、特異性高。如果採用全血法測定，只需微量標本，適合於兒童及血小板減少性疾病的患者。血小板活化時其質膜糖蛋白較其靜止期發生顯著改變，FCM 可以通過單抗免疫螢光標記（血小板膜糖蛋白 II b/III a, CD62, CD63 等）監測血小板功能及活化情況，有利於血管栓塞性疾病的診斷和治療。

血小板相關抗體的測定

免疫性血小板減少性紫癜病人血漿中可產生血小板自身抗體，結合在血小板表面，稱為血小板相關抗體，其分子可以是 IgG、IgA 或 IgM，用鼠抗人 IgG、IgA、IgM 螢光抗體標記被測血小板，FCM 可以測定血小板相關抗體含量。直接法檢測血小板表面的相關抗體，間接法可測定血清中的相關抗體。該方法用於該病的診斷及治療監測，具有檢測速度快、靈敏度高的優點。

1.2 應用於基礎醫學研究

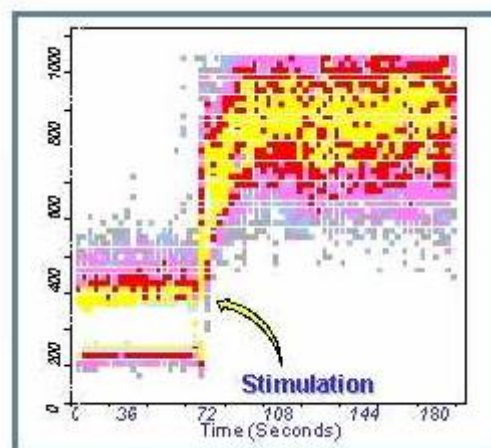
1.2.1 在細胞生物學中的應用

細胞周期分析

在細胞周期內，DNA 含量隨時相發生周期性的變化。通過螢光探針對細胞進行相對 DNA 含量測定，可分析細胞周期各時相的百分比，周期動力學參數以及 DNA 異倍體。DNA 和 RNA 特異性染料有 PI、EB、7-AAD、和 AO 等。通過抗 BrdU 的單株抗體也可對 DNA 進行染色。

細胞內鈣離子濃度測定

螢光染料 (如 Fura-Red、Fluo-3 和 Rhod-2 等) 通過乙醯甲酯(AE) 導入細胞後，與鈣離子特異性結合。染料的激活或發射特性與鈣離子濃度有關，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得。



細胞內 pH 值測定

螢光染料 (BCECF、COFDA、DCH 和 SNARF 等) 激發光譜或發射光譜是隨 pH 值而異的。在生理 pH 值範圍內，比例螢光與 pH 值有很好的線性關係，故可用比例螢光測 pH 值，實際 pH 值經校正後獲得。

1.2.2 在凋亡細胞生物學中的應用

細胞凋亡又稱為程序化細胞死亡，是某些生理或病理條件下，細胞接受某種信號的觸發後主動發生一連串連續性細胞變化，最終導致細胞死亡而不引起炎症的細胞死亡過程。細胞凋亡現象是由 Kerr Whyuie 等人於1972年首次提出，1980年他們在對細胞凋亡進行長期觀察和分析後提出細胞凋亡不同於細胞壞死。細胞凋亡被認為是與細胞增生相反的方式，來調節細胞群體，它不僅對胚胎發生、器官發育、分化作用、及保持機體的平衡穩定等過程至為重要，而且對控制細胞的增殖、腫瘤發生和發展極為重要。通過細胞凋亡，機體及時清除受損及危險的細胞，因此細胞凋亡對機體的正常發展具有十分重要的生物學意義。

凋亡細胞的特徵

發生凋亡的細胞從形態到功能會發生一系列的變化。具體變化為：

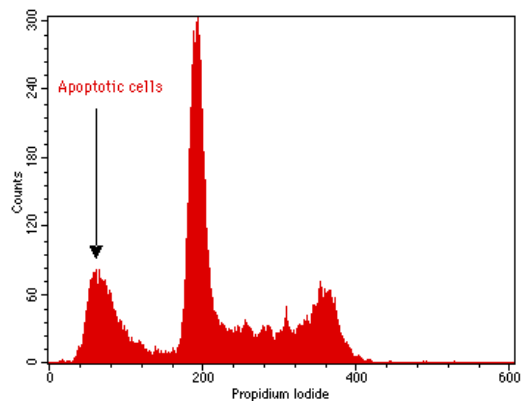
- ✓ 凋亡細胞會有喪失微絨毛、偽足等胞膜結構，細胞變圓等外觀上的變化，隨後，細胞會皺縮、胞質濃縮，細胞密度增大。
- ✓ 凋亡細胞最特別的型態特徵是胞核染色質的濃縮呈致密鹼性染色，在一般或電子顯微鏡下觀察可見。
- ✓ 細胞核離散，呈現月牙形凝集在核膜下。
- ✓ 隨著細胞膜和細胞核分離，會裂解形成含一定比例核糖體、細胞器和核物質的凋亡小體(Apoptotic body)。
- ✓ 凋亡過程的最後階段發生細胞核的 DNA 降解，降解後產生的 DNA 片段由 185-200bp 多聚體組成。在瓊脂凝膠上呈現特徵性凋亡“梯型”。

細胞形態

在流式細胞分析術中，前方散射光（FSC）代表細胞大小，側方散射光（SSC）表示細胞顆粒性，凋亡細胞應該 FSC 變小，SSC 先增加後減小。文獻中此法常見使用於血液細胞之凋亡現象，如淋巴球或胸腺細胞，同時此法必需檢測活細胞才有意義。與其他方法相比，此分析法特異性較低，因一般物理性損傷，或 Ficoll 分離皆可能改變細胞形態。

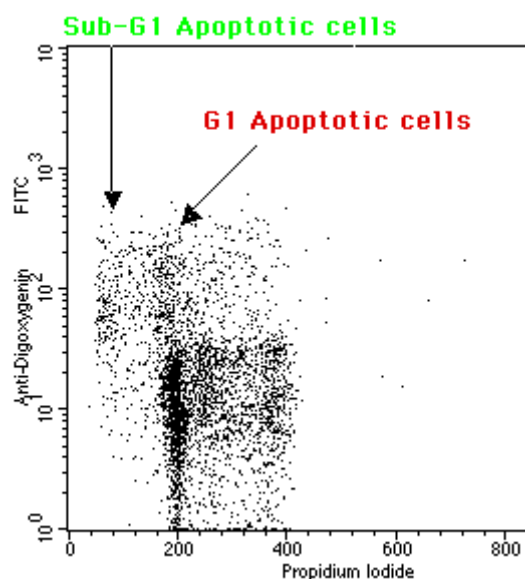
DNA 單染法 (Hypodiploidy Analysis)

細胞凋亡時，DNA 斷裂，在流式細胞光度計上呈現亞 G1 峰型的特徵。利用 Propidium iodide 單染，在 DNA 直方圖上，凋亡細胞出現二倍體峰 (G1 細胞) 減少，G1 峰左側出現亞二倍體細胞群的峰型。以 DNA 單染法進行凋亡細胞定量是最經濟的方法，可作凋亡定量分析，但其漏檢及錯檢率都很高。漏檢主要發生在 S 期或 G2/M 期的凋亡細胞，這些細胞即使有 DNA 含量降低，但其實際存有的 DNA 含量並不低於二倍體細胞所含的 DNA 的量，因而不會出現亞 G1 峰。錯檢的原因是一部分細胞碎片或小顆粒發生低螢光位於亞二倍體區。



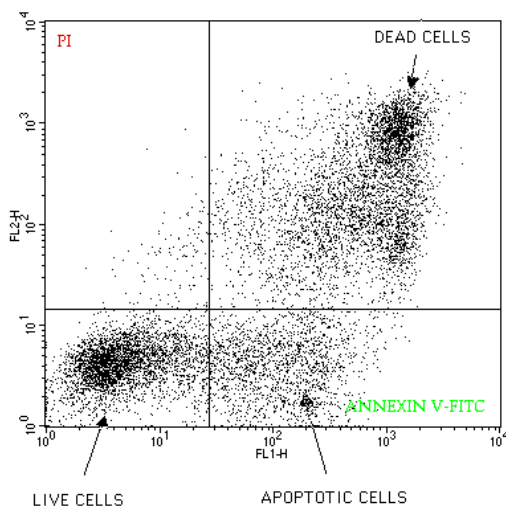
DNA 末端轉移酶標記技術 (TUNEL)

細胞凋亡時，DNA 被內源性核酸內切酶降解，產生帶有 3' 末端的 DNA 片段，在末端脫氧核糖核酸轉錄酶介導下，使標有螢光素的核糖核酸連接到 DNA 片段的 3' 末端螢光強度與 DNA 片段含量成正比，根據螢光強度對凋亡細胞作出定量分析。該方法檢測與凋亡相關的 DNA 降解片段的特異性和敏感性比瓊脂糖凝膠電泳高的多，它能檢出少於 2,000 個細胞的 DNA 斷鏈。



Annexin V-FITC/PI 雙染法

細胞膜內的磷脂絲氨酸 (Phosphatidyl Serine, PS) 暴露到膜外，是細胞凋亡的早期變化之一。健康的細胞膜有一不對稱性 (asymmetry)，即 PS 只存在於胞膜內層而不外露，此不對稱性之維持，需借助一套酶系與能量 ATP (如例圖二)，而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，故而無法維持此不對稱性，而使得磷脂絲氨酸外露。



Annexin V 是一種鈣依賴性的磷脂結合

蛋白，它與 PS 具有高度的親和力，因此可以作為檢測暴露在細胞膜表面 PS 的探針，將 Annexin V 標記上螢光素(如 FITC)，同時結合使用 PI 拒染法進行凋亡細胞雙染後，進行流式細胞儀檢測。該方法是檢測早期凋亡細胞的較好的方法，可以區分正常細胞，壞死細胞及凋亡細胞，如圖例。

總之，流式細胞技術的數據可與細胞形態學，DNA 電泳技術等方法相互佐證，以推動凋亡細胞研究的深入與進展，但值得注意的是上述幾種研究方法均有一定的應用條件及局限性，因而多種方法結合分析是十分必要的。

1.2.3 在藥理學中的應用

多重耐藥性

多重耐藥性 (Multidrug Resistance, MDR) 指對幾種自然產生細胞毒素的交叉抗性，是成功化療的一種主要障礙。MDR 可能是因為跨膜 P-糖蛋白的高表達和/或細胞內藥物重新分配異常，從而使細胞內藥物在有效作用部位的攝入量減少所致。

評價 MDR 及其調控因素

在結構方面可檢測 P-gp 的高表達，在功能方面可檢測抗腫瘤藥物的細胞內積聚程度，判斷療效；檢測藥物在細胞內的重新分配，判斷是否在藥物作用位點。

化療藥物作用機制及療效評價

FCM DNA 直方圖變化分析，可快速顯示腫瘤細胞體的增殖能力，應用 BrdU 摻入技術和抗 BrdU 單株抗體免疫螢光，的準確測定 DNA 合成速率，動態觀察腫瘤生長狀態。因此可根據細胞周期各時期分布情況，研究化療藥物作用機制(是否周期特異性或時相特異性)，並直觀了解化療藥物對癌細胞動力學的干擾和影響。

