

## T、B 淋巴细胞亚类的方法学建立及性能评价

张立霞<sup>1</sup>, 屈晨雪<sup>2</sup>

<sup>1</sup>河北省邯郸市第一医院检验科 河北邯郸

<sup>2</sup>北京大学第一医院 北京

**【摘要】**目的 T、B 淋巴细胞亚类的方法学建立及性能评价。方法 通过查阅文献确立 T、B 淋巴细胞亚类的抗体组合, 沿用溶血洗涤的标本处理方法。基于中华人民共和国卫生部《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》推荐的方法, 建立适用于流式细胞仪性能评价的测试方案, 包括精密度、试剂稳定性、抗体量对结果的影响等。结果 T、B 淋巴细胞亚类的方法学初步建立, 性能评价初步确立。结论 上述性能指标测试方法可靠, 能够对 T、B 淋巴细胞亚类检测性能进行全面评价。该方法对于 T、B 淋巴细胞亚类检测性能验证有一定的指导意义。

**【关键词】**流式细胞仪; 方法学建立; 性能评价

### Methodological establishment and performance evaluation of T and B Lymphocyte subclasses

Lixia Zhang<sup>1</sup>, Chenxue Qu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The First Hospital of Handan, Handan, Hebei, China

<sup>2</sup>Peking University first hospital, Peking, China

**【Abstract】** **Objective** To establish the methodology and evaluate the performance of T and B lymphocyte subsets. **Methods:** the antibody combination of T and B lymphocyte subclasses was established by consulting literature, and the method of hemolytic washing was used. Based on the method recommended by the State Food and drug administration, a test scheme suitable for the performance evaluation of FCM was established, including the precision, the stability of reagents, the influence about the amount of antibody. **Results:** the methods of T and B lymphocyte subsets were established preliminarily, and the performance evaluation met the requirements. **Conclusion:** the above methods are reliable and can be used to evaluate the detection performance of T and B lymphocyte subsets. This method has certain guiding significance for the verification of the detection performance of T and B lymphocyte subsets.

**【Keywords】** Flow Cytometry; Methodology Establishment; Performance Evaluation

淋巴细胞亚群检测对于了解机体免疫功能十分重要。最新的研究显示, T、B 淋巴细胞中还有不同亚类如初始细胞、记忆细胞、活化细胞和效应细胞等等<sup>[1]</sup>。不同疾病时, 这些亚类的变化并不相同, 因此检测 T、B 淋巴细胞亚类对于更准确地了解机体免疫功能, 评估疾病的预后和转归有重要意义<sup>[2]</sup>。本实验通过查阅文献<sup>[3]-[8]</sup>, 确定 T、B 淋巴细胞亚类抗体组合。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 仪器与试剂

BD 公司 FACSCanto II 流式细胞仪 (仪器编号:

MZXY-LS-002) 及配套淋巴细胞精细分型抗体, 新鲜 EDTA 抗凝全血。

##### 1.2 方法

###### (1) 精密度

新鲜外周血标本, 配置三组 (T1、T2、B), 每组上机检测三次, 计算各群亚类的百分比的变异系数。

###### (2) 试剂稳定性

预混试剂, 分别在试剂配置的第二天 (24h) 和第三天 (48h) 加入新鲜外周血, 并设置对照组 (现配的抗体加同一新鲜外周血标本), 标本每天取三

个, 以检测试剂稳定性。计算各群亚类的百分比的偏倚。

(3) 抗体量对结果的影响

取三个新鲜外周血标本, 每个设置两组, 一组加抗体推荐量的半量, 一组加抗体推荐量的全量, 计算各群亚类的百分比的偏倚。

2 结果

2.1 精密度

各群亚类的百分比的变异系数均<10%。其中 CV 值为 0-5%的有: CD3+CD4+、Central Memory4、Naive4、Effector Memory4、Effector4、CD4+/HLADR+、CentralMemory8、Naive8、CD8+/HLADR+、CD8+/CD28-、CD8+/CD28+、

Th17-like、Th1-like、Naïve、PlasmaBlast、Plasma、Transitional; CV 值为 5%-10%的有 EffectorMemory8、Effector8、Treg、Th2-like、Th9-like、non-Switch、Switch。(见表一 A, 表一 B)

2.2 试剂稳定性

试剂: 在试剂放置的 24h, 亚类百分比偏倚均<50%;在试剂放置的 48h, 三组样本的 Central Memory4、Naive4、EffectorMemory4、Effector4 和 CentralMemory8 均变化较大。(见表二 A, 二 B)

2.3 抗体量对结果的影响(见表三 A, 三 B)

除一组 EffectorMemory4 偏倚为 45.8%, CentralMemory8 为 38.9%, CD8+/CD28-为 46.2%, Transitional 为 50%外, 其余均<30%。

表一 A

T1 (%)	CD3+	CD3+CD4+	CentralMemory4	Naive4	EffectorMemory4	Effector4	CD4+/HLADR+	CD8+	CentralMemory8	Naive8	EffectorMemory8	Effector8	CD8+/HLADR+	CD8+/CD28-	CD8+/CD28+
1-1	22.4	34.5	47.7	21	32.9	0.2	29.5	49.1	15.3	23.6	0.5	4.7	41.3	28	21.2
2-2	22.4	36.3	47.8	21.2	30.9	0.2	27.5	48.3	15.5	24	0.5	5.7	41.7	26.9	21.4
3-3	22.5	36.9	47.8	19.6	32.5	0.2	27.9	48.2	15.7	24	0.6	5.7	41.8	26.9	21.2
均数	22.4	35.9	47.8	20.6	32.1	0.2	28.3	48.5	15.5	23.9	0.5	5.4	41.6	27.3	21.3
SD	0.0	1.0	0.0	0.7	0.9	0.0	0.9	0.4	0.2	0.2	0.0	0.5	0.2	0.5	0.1
CV	0.2%	2.8%	0.1%	3.5%	2.7%	0.0%	3.1%	0.8%	1.1%	0.8%	8.8%	8.8%	0.5%	1.9%	0.4%

表一 B

T2 (%)	Treg	Th17-like	Th2-like	Th9-like	Th1-like	B (%)	Naive	non-Switch	Switch	PlasmaBlast	Plasma	Transitional
	4.9	9.80	8.9	6.0	28.7		63.7	12.7	18.6	0.3	0.1	3.8
	4.2	9.4	8.9	5.0	31.3		65.8	12.5	16.3	0.3	0.1	3.8
	4.3	9.1	10.5	4.2	29.1		62.0	11.3	20.6	0.4	0.1	3.5
均数	4.5	9.4	9.4	5.1	29.7		63.8	12.2	18.5	0.3	0.1	3.7
SD	0.3	0.3	0.8	0.7	1.1		1.6	0.6	1.8	0.0	0.0	0.1
CV	6.9%	3.0%	8.0%	14.5%	3.8%		2.4%	5.1%	9.5%	14.1%	0.0%	3.8%

表二 A

	CD3+	CD3+CD4+	CM4	Naive4	EM4	Effector4	CD4+/HLADR+	CD8+	CM8	Naive8	EM8	Effector8	CD8+/HLADR+	CD8+/CD28-	CD8+/CD28+
10月24日配置抗体															
10月25日															
标本1. 预混抗体	15.8	34	38.7	48.7	10.8	1.8	5.1	33.5	6.9	32.5	4.3	24.6	16.2	14.8	18.7
标本1. 现用现配抗体	15.5	33.1	43.1	48.4	9.8	1.5	5.5	33.6	9	33.6	3.9	21.3	16.4	14.7	18.9
偏倚 (%)	1.9%	2.7%	-10.2%	0.6%	10.2%	20.0%	-7.3%	-0.3%	-23.3%	-3.3%	10.3%	15.5%	-1.2%	0.7%	-1.1%
标本2. 预混抗体	11.7	47.9	41.7	40.9	17.2	0.2	10.2	38.2	20.5	31.8	3.7	5	19.2	9	29.2
标本2. 现用现配抗体	11.8	47.2	48.2	38.3	13.4	0.2	11.2	38.4	23.8	31.9	3.2	4.4	19.3	9.3	29.1
偏倚 (%)	-0.8%	1.5%	-13.5%	6.8%	28.4%	0.0%	-8.9%	-0.5%	-13.9%	-0.3%	15.6%	13.6%	-0.5%	-3.2%	0.3%
标本3. 预混抗体	17.7	48.2	59.6	20.8	29.4	0.3	11.1	42	9	27.9	10.9	14.2	26.5	19.4	22.7
标本3. 现用现配抗体	17.9	46.4	61.5	19.6	28	0.2	11.4	43.5	13	28.3	9.8	13.5	26.5	20.1	23.4
偏倚 (%)	-1.1%	3.9%	-3.1%	6.1%	5.0%	50.0%	-2.6%	-3.4%	-30.8%	-1.4%	11.2%	5.2%	0.0%	-3.5%	-3.0%
10月26日															
标本4. 预混抗体	20.8	46.7	14.1	28.2	41	16.7	5.5	47.6	1.4	17.3	10.5	39	10.5	27.2	20.4
标本4. 现用现配抗体	20.5	47.3	34.3	43.6	20.3	1.8	5.7	46.7	5.5	20.4	10.9	36.9	11.9	27	19.7
偏倚 (%)	1.5%	-1.3%	-58.9%	-35.3%	102.0%	827.8%	-3.5%	1.9%	-74.5%	-15.2%	-3.7%	5.7%	-11.8%	0.7%	3.6%
标本5. 预混抗体	23.2	52.9	9.7	21.9	40.7	27.7	2.4	41.5	1.7	32.8	3.8	2.2	11.1	5.4	36.1
标本5. 现用现配抗体	24	53.3	30.5	48.6	19.9	0.9	2.8	40.7	7	42	3.5	2.2	11.9	5.4	35.3
偏倚 (%)	-3.3%	-0.8%	-68.2%	-54.9%	104.5%	2977.8%	-14.3%	2.0%	-75.7%	-21.9%	8.6%	0.0%	-6.7%	0.0%	2.3%
标本6. 预混抗体	14	52.2	12.8	29.5	39.5	18.2	4.9	37.5	1.5	37.8	1.6	8.1	6.9	7.3	30.2
标本6. 现用现配抗体	13.9	52.7	31.7	45.8	21.5	1.1	5.6	37.1	8.8	49.6	1.3	8.3	7.6	7.3	29.8
偏倚 (%)	0.7%	-0.9%	-59.6%	-35.6%	83.7%	1554.5%	-12.5%	1.1%	-83.0%	-23.8%	23.1%	-2.4%	-9.2%	0.0%	1.3%

表二 B

T2	Treg	Th17-like	Th2-like	Th9-like	Th1-like	B	Naive	non-Switch	Switch	PlasmaBlast	Plasma	Transitional
	4.3	7.3	7.5	6.5	9.1		60.4	17	16.7	0.8	0.7	3.3
	3.9	7.1	7	6.3	9.8		60.5	14.8	18.3	0.9	0.9	3.5
	10.3%	2.8%	7.1%	3.2%	-7.1%		-0.2%	14.9%	-8.7%	-11.1%	-22.2%	-5.7%
	5.4	11.5	8.5	10.2	13.5		38.5	33.8	24.1	0.1	0	1.9
	4.8	10.1	8.5	11	13.6		40.2	31.4	24.4	0.1	0	2
	12.5%	13.9%	0.0%	-7.3%	-0.7%		-4.2%	7.6%	-1.2%	0.0%	0.0%	-5.0%
	4.1	10.9	9.2	10.9	25.4		65.6	8.2	19.1	0.4	0.1	6.1
	4.1	9.6	8.3	11.5	24.8		64.6	8.3	20.1	0.3	0.1	6.1
	0.0%	13.5%	10.8%	-5.2%	2.4%		1.5%	-1.2%	-5.0%	33.3%	0.0%	0.0%
	6.0	12.2	5.2	8.1	10.1		67.2	17.7	12.2	0	0	0.5
	7.4	11.6	5	6.4	11.7		65.3	18.3	14.1	0	0	0.7
	-18.9%	5.2%	4.0%	26.6%	-13.7%		2.9%	-3.3%	-13.5%	0.0%	0.0%	-28.6%
	5.4	13.1	6.4	7.9	8.9		51.4	30.1	17	0	0	0.4
	5.2	12	5.8	8	9		52.7	29.2	16.5	0	0	0.4
	3.8%	9.2%	10.3%	-1.3%	-1.1%		-2.5%	3.1%	3.0%	#DIV/0!	#DIV/0!	0.0%
	4.0	9.3	5.8	5.7	15.2		49	12.4	31.3	0.1	0	0.3
	3.6	7.4	5.5	4.2	16.1		47	10.6	34.8	0.1	0	0.4
	11.1%	25.7%	5.5%	35.7%	-5.6%		4.3%	17.0%	-10.1%	0.0%	#DIV/0!	-25.0%

表三 A

全半量比较	CD3+	CD3+CD4+	CD4	Naive4	EM4	Effector4	CD4+/HLADR+	CD8+	CD8	Naive8	EM8	Effector8	CD8+/HLADR+	CD8+/CD28-	CD8+/CD28-
标本7+半量	22.2	68.1	54.9	35.1	17.5	0.1	4.4	25	9.6	15.9	11.7	22	20.3	17.1	12.3
标本7+全量	21.3	70	50	38	12	0.1	4.1	23.1	15.7	17.6	16.3	22.9	26.3	11.7	11.4
偏倚 (%)	4.2%	-2.7%	9.8%	-7.6%	45.8%	0.0%	7.3%	8.2%	-38.9%	-9.7%	-28.2%	-3.9%	-22.8%	46.2%	7.9%
标本8+半量	20.5	63.2	35.7	21.3	30.9	0.1	21	27.3	17	9.6	16	18	43.1	16.7	10.6
标本8+全量	23.4	64.3	37.7	27.3	34.9	0.1	21.7	28.6	17.6	12.5	16.1	18.1	42.8	16.7	11.9
偏倚 (%)	-12.4%	-1.7%	-5.3%	-22.0%	-11.5%	0.0%	-3.2%	-4.5%	-3.4%	-23.2%	-0.6%	-0.6%	0.7%	0.0%	-10.9%
标本9+半量	19.4	52.3	28.3	43.4	26.8	1.5	15.9	41.5	4.6	20.6	12.6	45	26.2	27.9	13.6
标本9+全量	21.1	52.9	32	44.5	28.8	2	18.3	43	5.2	20.8	15.1	48	26	27.4	15
偏倚 (%)	-8.1%	-1.1%	-11.6%	-2.5%	-6.9%	-25.0%	-13.1%	-3.5%	-11.5%	-1.0%	-16.6%	-6.3%	0.8%	1.8%	-9.3%

表三 B

T2	Treg	Th17-like	Th2-like	Th9-like	Th1-like	B	Naive	non-Switch	Switch	PlasmaBlast	Plasma	Transitional
	4.4	9.7	6.5	5.2	9		60	12.2	20.6	0	0	2.4
	3.7	11.2	7.7	6.4	9.6		64.2	15.4	17.7	0	0	1.6
	18.9%	-13.4%	-15.6%	-18.8%	-6.3%		-6.5%	-20.8%	16.4%	#DIV/0!	#DIV/0!	50.0%
	2.7	6	3	4	33		39.8	33.7	22.7	0	0	1.5
	3.3	9.6	3.2	4.9	33.3		45.2	31.6	21.7	0	0	1.7
	-18.2%	-37.5%	-6.3%	-18.4%	-0.9%		-11.9%	6.6%	4.6%	#DIV/0!	#DIV/0!	-11.8%
	4.2	4.6	5.8	2.6	24.8		52.3	38.1	6.3	0.1	0.1	1.9
	6.0	6.1	7.2	3.5	28.1		56.1	39.3	8.2	0.1	0.1	2.2
	-30.0%	-24.6%	-19.4%	-25.7%	-11.7%		-6.8%	-3.1%	-23.2%	0.0%	0.0%	-13.6%

### 3 讨论

通过查阅文献确立了 T、B 淋巴细胞亚类的抗体组合。关于淋巴细胞亚类性能的评价,国际上还没有公认的方法和要求。本实验从精密度,试剂和样品稳定性,抗体量对结果的影响及生物参考区间等方面进行验证。流式细胞仪的检测结果会被用于了解机体免疫功能,评估疾病的预后和转归。因此,应该更关注可能影响检测结果准确性的性能指标。

为此,中华人民共和国卫生部在 2011 年发布了医药行业标准《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》,评价项目涵盖了流式细胞仪的质量控制,包括光路,荧光分辨率,荧光补偿及性能评估(准确度,特异度,灵敏度和精密度)<sup>[9]</sup>。本实验基于指南里的性能评估内容,加上实际工作中检测结果的影响因素,从精密度、试剂和样本稳定性、抗体量对结果的影响以及生物参考区间四方面进行实验,

为医学实验室评价流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚类的性能提供了一套详尽的参考方法<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

- [1] 骆必伟, 谢勇, 袁晓东, 田佩凯, 欧希, 林泽伟等。中央型和效应型记忆 T 细胞亚群在肝癌患者肿瘤浸润淋巴细胞中的分布[J]. 中华肝胆外科杂志, 2016, 7 (22) : 445-449.
- [2] 张智贤, 何秋莹, 方伟祯, 鲍蕴文, 曾华等。CD19、CD27 和 CD38 标记的 B 淋巴细胞亚群在类风湿关节炎患者外周血中的变化及意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 5 (35) : 382-386.
- [3] Ditadi A, Sturgeon CM, Tober J, et al. Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat Cell Biol* 2015; 17:580.
- [4] Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest* 2017; 127:772.
- [5] Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:149.
- [6] Yu VW, Saez B, Cook C, et al. Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. *J Exp Med* 2015; 212:759.
- [7] Johnson JL, Georgakilas G, Petrovic J, et al. Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity* 2018; 48:243.
- [8] Lu Y, Wang Q, Xue G, et al. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* 2018; 33:1048.
- [9] 王小林, 李昂, 杨硕。流式细胞仪性能评价方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 5(36): 1366-1369.
- [10] Andreas Boldt, Stephan Borte, Stephan Fricke. Eight-Color Immunophenotyping of T-, B-, and NK-Cell Subpopulations for Characterization of Chronic Immunodeficiencies. [J] *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2014 ,86B:191-206 .

收稿日期: 2021 年 11 月 30 日

出刊日期: 2021 年 12 月 31 日

引用本文: 张立霞, 屈晨雪, T、B 淋巴细胞亚类的方法学建立及性能评价[J]. 国际医药研究前沿, 2021, 5(1) : 19-22.

DOI: 10.12208/j.imrf.20210008

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2021 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS