

激光流式细胞分析技术及其应用

许松林 杨祐俐

(上海第二医科大学)

提要: 本文叙述了以激光作为细胞荧光和散射光源, 用于细胞流式分析的原理和结构, 给出了各种实验数据采集和处理法。

LXJ laser flow cytometry and its application

Xu Songlin, Yang Youli

(Shanghai Second Medical College)

Abstract: In this paper, the principle of cell analytical technique and device structure based on cell fluorescence and scattered light by laser radiation are described. Some methods to collect and process experimental data are presented.

激光流式细胞分析技术已广泛应用于生物医学领域。经过几年努力, 我们研制成 LXJ 激光流式细胞计, 用在细胞动力学研究、癌症诊断与治疗监视、白血病人血细胞分析、计划生育中生精细胞分析等等。

一、LXJ 多参数流式细胞计的原理

主要原理如图 1 所示。让染色细胞在稳定的液体流动中经过 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ 的小孔, 使细胞排队成行, 每个细胞依次、恒速通过激光束的椭圆焦斑区。细胞受激光照射后产生荧光和散射光, 由硅光二极管或光电倍增管接收, 得到随细胞体积、DNA 或 RNA 变化的电信号 $S(t)$ 。

在细胞流速恒定、激光照射稳定的情况

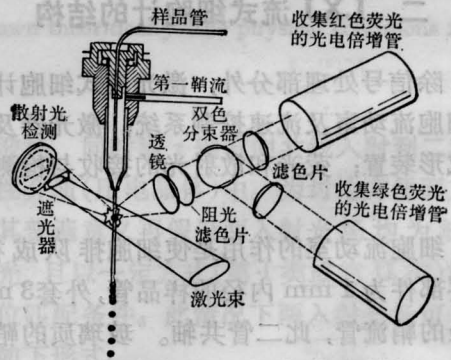


图 1 多参数激光流式细胞计原理图

下, 电信号的幅度和宽度只与细胞体积、DNA 和 RNA 含量有关。同群体细胞的形状可能有区别, 荧光强度的时间分布虽各有差异, 但在 DNA 或 RNA 含量一定的情况下, 电信号对时间的积分应为一与 DNA (或

收稿日期: 1984 年 10 月 22 日。

RNA)成正比的常数,即

$$\int_t^{t+\Delta t} S(t) dt = C$$

式中 Δt 为细胞受照时间。对同子群细胞 C 值一定,对同子群细胞 C 值不同。如果细胞是在增值过程中,则 C 值为一恒定规律的统计分布。

细胞在流动过程中,其体积、DNA 和 RNA 的含量不变,同一子群细胞的荧光信号只随激光焦斑区中光强分布而变化,所以要求所用激光为 TEM₀₀ 模,而荧光信号的时间函数近似地为高斯函数。但是荧光信号的幅度和宽度受各种因素的影响,诸如细胞流速、激光功率不稳定性、细胞流的搅动、光和、电路噪音等,都会使等量 DNA(或 RNA)含量的细胞荧光信号稍有差异,在多道脉冲幅度分析器或电子计算中,细胞数与 DNA(或 RNA)含量的关系曲线被展宽为一正态分布函数。在测量标准荧光小球的情况下,所得正态分布曲线的变异系数(定义为标准差除以均值)代表了仪器的分辨能力。变异系数越小,仪器的分辨能力越大。

二、LXJ 流式细胞计的结构

除信号处理部分外,激光流式细胞计包括细胞流动室及流速控制系统;激光器及光束成形装置;荧光和散射光的接收与检测设备。

细胞流动室的作用是使细胞排队成行,主要部件为 1 mm 内径的样品管,外套 3 mm 内径的鞘流管,此二管共轴。玻璃质的鞘流管出口处呈流线型,出口处直径 100 μm 。样品细胞流出玻璃管后即进入检测区,然后经 100 μm 的小孔流出室外的空气中。

小孔的直径和速度可在一定范围内选择,以保证流动是层流,防止湍流为原则。满足层流条件的直径是:

$$d < 2300 \frac{\eta}{\rho \bar{v}}$$

式中 η 为流体的粘滞系数, ρ 为流体密度, \bar{v} 为平均速度。小孔直径选 100 μm 时,则流速必须控制在 16 m/s 以内。

常用的光源有氩离子激光器、氦离子激光器、氦-镉激光器和氦-氖激光器等,我们采用放电管长 800 mm 的氩离子激光器的 488 nm 谱线作为激发光,单谱线功率 1 W,实际使用在 200 mW 以下,功率稳定度在 1% 以内。

激光经准直后,进入二块柱面透镜组成的光束成形装置,二柱面透镜共轴但正交放置,焦距分别为 200 mm 和 23 mm。在检测区激光焦斑为 23 \times 200 μm 的椭圆截面,短轴沿细胞流方向,长轴垂直于细胞流和激光轴。

在与激光轴和细胞流垂直的方向上检测荧光,接收透镜焦距 10 mm,焦点调节在细胞流与激光相交处。用一分束器将 DNA 的绿色荧光与 RNA 的红色荧光分离,经各自的滤光片后,通过由二透镜和小孔(200 μm)组成的杂散光过滤器,分别进入蓝敏和红敏光电倍增管。

侧向散射光的检测与荧光检测用同一接受透镜,在此透镜之后先分离散射光,然后分离红、绿荧光。侧向散射光也用光电倍增管接收。

在与激光轴同方向的小角度范围内($2^\circ \sim 7^\circ$),进行前向小角度散射光检测,以测定细胞的体积。用一椭圆锥形物挡住中心光,让小角度散射光进入硅光二极管,进行光电转换。

在零分辨率的仪器中,细胞核体积小于焦斑线度,对信号宽度仅有较小的影响,决定因素是细胞流速和椭圆焦斑的短轴尺寸。在我们的实验条件下,鸡血红细胞的脉冲信号宽度约 2.5 μs ,这就是脉冲被积分后的前沿。

等量 DNA(或 RNA)含量而分布有差异的细胞信号幅度也有一些起伏,光电倍增管中光脉冲在管内产生的电荷分布也有些时间

展宽的起伏。为减少这些影响,光电倍增管输出端接一有源积分放大器。使积分脉冲的幅度与光脉冲的面积成正比,即与 DNA 含量或 RNA 含量成正比。

仪器的工作状态有二种监视装置:用示波器监视光电倍增管输出的模拟信号,用多道脉冲幅度分析器监视仪器工作的最佳状态。在多道分析器中,细胞信号的积分幅度决定道数,该道的存储内容即为细胞数。显示二维曲线,此二维曲线的 X 坐标为道数,即 DNA(或 RNA)含量;Y 坐标为细胞数。显然, DNA(或 RNA)恒定的细胞群,应显示出一正态峰;细胞在增值过程中,如腹水癌细胞,由于 DNA 在连续变化中,应显示如图 2 所示的曲线。

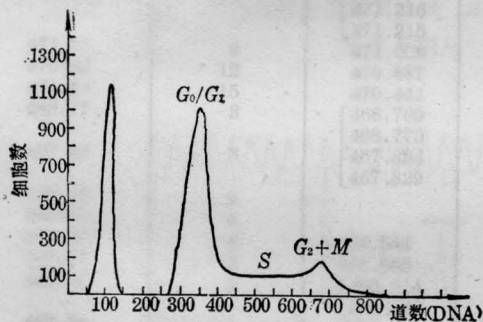


图 2 腹水癌细胞的 DNA 分布

鸡血红细胞有固定的尺寸,时常用作标准。LXJ 流式细胞计测定鸡血细胞时,变异系数为 2~3%。

三、实验结果的处理

为了便于实验结果的分析、显示和记录,用模数变换器将细胞信号变换成二进制数字信号后送入计算机进行分析处理、显示和存储。

来自每一检测元件的信号放大到 0~8 V,经 A/D 变化成 6 位数字信号,送入计算机(Слотетсо 公司, CPU-Z80)的平行口,用中断方式存储数据于计算机内存。双参数接收时,内存中开辟的数据区应有 $64 \times 64 = 4096$

个单元。单元号由被接收的数据决定,即决定于细胞参数,而单元中的内容即细胞数。图 2 第一尖峰为鸡血红细胞 DNA 分布,第二条曲线为腹水癌细胞 DNA 分布,前部尖峰为 G_0/G_1 相,中间部分为 S 相,尾部突起部分为 G_2+M 相,明显地显示出 DNA 的合成过程。其它仪器无法显示出此种过程。经过计算机合理计算还可把每一相占的百分数算出,以确定增值过程是否按正常规律进行。

通过软件控制,可使计算机输出细胞数随双参数变化的立体分布图,如图 3 所示。X、Y 分别代表细胞的二个参数(DNA 和 RNA,或其它),Z 轴表示细胞数,按斜二角投影方式绘制。从图可以看出:不同群体细胞以不同的山峰形状显示,能分清单参数检测法不能区分的细胞群体。这种立体图能直观显示实验结果,易被生物工作者和医生接受。

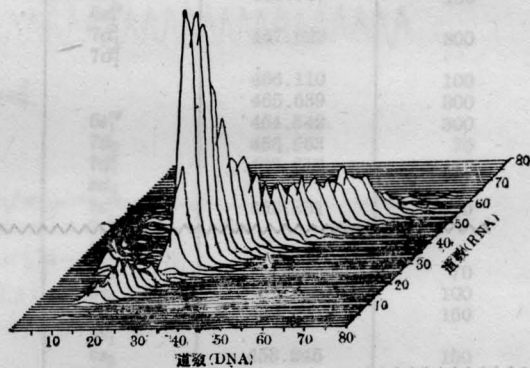


图 3 细胞数随 DNA、RNA 变化的三维图

四、LXJ 流式细胞计在医学中的应用

应用 LXJ 流式细胞计做了一系列的生物医学工作。

1. 测定了 EAT G_1 期细胞、L615 小鼠骨髓 G_0/G_1 期细胞、肝细胞倍体以及混合细胞群体样品中各亚群细胞的 DNA 含量。在生物医学中检测异倍体、高倍体等异常细胞是有用的工具,是其它仪器难以达到的。

2. 研究哺乳类动物睾丸精子发生过程, 测定动物及人睾丸组织内 1 倍体、2 倍体与 4 倍体 DNA 含量及其相对比例。发现同种动物的比例恒定, 异种动物的比例稍有差异。

3. 用于癌细胞动力学研究, 如小白鼠 Ehrlich 腹水癌细胞动力学参数测定及一般生长规律的研究, 提供了较系统的数据。检测精度高, 工作周期短, 可快速获得各相细胞数比值, 是其它方法无法获得的细胞信息。

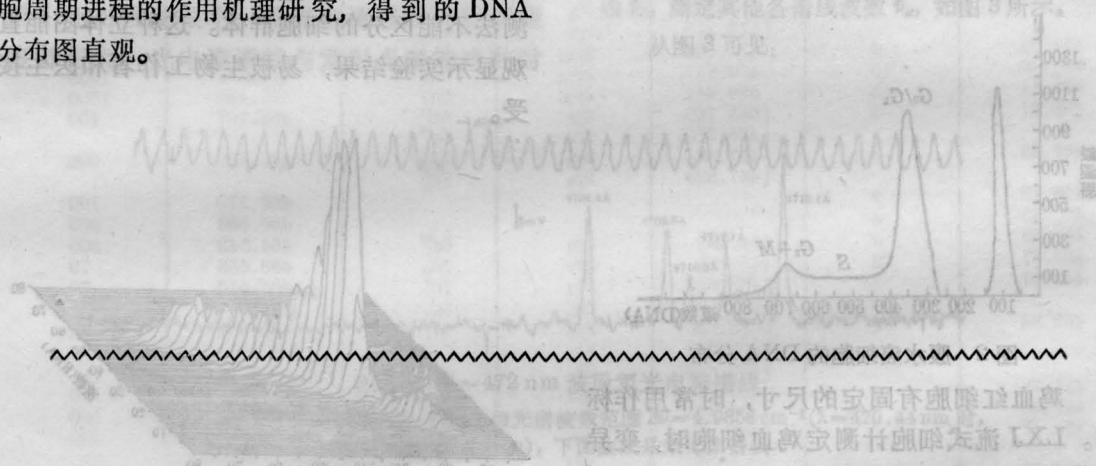
4. 用于化疗癌症治疗的监视。抗癌药物的工作机理与时效关系是设计合理用药方案的重要依据。LXJ 流式细胞计测定细胞成份时简便迅速, 故可随时监视用药前后细胞动力学过程发生的变化。已用 LXJ 进行了 Ara-c 和 V_{CR} 对小鼠 Ehrlich 腹水癌细胞周期进程的作用机理研究, 得到的 DNA 分布图直观。

5. 测绘出了各种癌细胞的直方图。有白血病人血细胞 DNA 分布, 甄别出一例急性淋巴细胞性白血病复发, 另一例为慢性细胞性白血病急变。此外, 还绘出了胃癌、子宫癌、乳房癌和直肠癌的 DNA 分布图, 对癌症的诊断提供了直观信息。

LXJ 激光流式细胞计应用的潜力是很大的。由于它提供的是生物细胞的基本信息, 从中可了解内在的本质的变化。它将在细胞生长规律研究、肿瘤诊断、免疫分析以及计划生育研究中发挥巨大作用。

参 考 文 献

- [1] H. M. Shapiro; *Cytometry*, 1983, 3, No 4.
- [2] M. R. Melamed *et al.*; *Flow Cytometry and Sorting*, 1979, John Wiley and Sons, Inc.



简 讯

激光热处理成倍提高纺锭的使用寿命

中国科学院上海光机所和重庆大学、重庆纺织机械专件厂共同试验用激光热处理纺织机用的纺锭, 经过两年多时间的试验研究, 取得了可喜的结果。最近在重庆召开的鉴定会测定表明, 激光热处理过的纺锭使用寿命可以提高一倍以上, 其他机械性能也有明显的提高。专家们认为, 这是一项国际首创的纺锭热处理工艺。

纺锭是纺织工业的重要基础件之一, 但因工作过程中锭杆端点受磨损的原因, 每年需要更换大量

的锭杆。据有关部门的统计, 每年至少需要更换 600 万件, 价值 4200 万元。因此, 自五十年代中期起, 纺织工业部门就组织力量攻关, 以期提高锭杆的使用寿命。激光热处理锭杆的成功, 为我国提高纺锭使用寿命开创了一项新工艺。据有关专家的测算, 采用这项新工艺之后, 每年至少可以为国家节约资金 2100 万元, 钢材约 4300 吨。同时, 也大大提高了纺织品的质量和产量, 减轻纺织工人的劳动强度。

(纪钟)