

文章编号 1006-8147(2014)02-0157-02

论 著

微流控芯片单细胞分析慢性粒细胞白血病患者 粒细胞表达髓过氧化物酶

曹旭东^{1,4}, 孙续国², 宋敬敬², 苏桂新², 李小亮², 丁红梅², 刘金平³, 黎小沛¹

(1.天津医科大学基础医学院计算机教研室,天津 300070;2.天津医科大学医学检验学院,天津 300203;3.天津医科大学总医院检验科,天津 300052;4.天津医科大学临床医学院实验中心,天津 300270)

摘要 目的:设计微流控芯片,单细胞分析慢性粒细胞白血病患者粒细胞表达髓过氧化物酶(MPO)活性。方法:收集慢性粒细胞白血病患者和对照组各60例,联苯胺-H₂O₂法对血细胞进行MPO染色。应用自行设计的微流控芯片单细胞分析粒细胞表达MPO。结果:联苯胺染色法发现粒细胞中表达MPO,且各阶段染色程度不同,MPO呈现颗粒状分布。芯片分析的结果与联苯胺染色法所呈现的结果在形态特征方面一致,试验组和对照组成熟粒细胞MPO活性均高于幼稚粒细胞,平均MPO活性试验组明显高于对照组。结论:毛细管芯片单细胞分析粒细胞MPO活性,发现慢性粒细胞白血病患者粒细胞平均MPO显著增高,有可能作为慢性粒细胞白血病诊断标志和个体化检查指标。

关键词 细胞芯片;髓过氧化物酶;慢性粒细胞白血病

中图分类号 R446.11

文献标志码 A

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)为中性粒细胞内嗜苯胺蓝颗粒的主要成分,传统观念认为它是人体行使防御、免疫功能的酶。然而,近年来国内外有研究报道称MPO基因的表达水平可能与白血病的发生相关,基因多态性关系到基因变异^[1-2],提示在血液疾病检测中,测定粒细胞表达MPO活性可以用于辅助诊断白血病。常用MPO测定的方法有细胞化学染色、酶底物显色法等^[3],90年代初出现了流式细胞仪检测MPO的临床研究^[4],最近又报道了免疫检测的方法^[5]。单细胞分析是指检测单个细胞内化学组分,或者测定单细胞对外界刺激成分的变化,有助于检测和鉴别大量细胞群体中少量的不正常细胞^[6],提示可以单细胞分析粒细胞表达MPO活性。微流控芯片是指把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、分离、反应、检测等操作单元基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,微米尺寸的通道与细胞的尺寸相匹配,适合做单细胞分析。微流芯片单细胞分析具有分离效率高、所需样品少、分析速度快、自动化程度高等优点^[7]。本组先前自行设计微流控芯片,实现了尿液白细胞的检测^[8]。本文在此基础上开发了一种能够测定特定粒细胞中表达MPO的芯片,用于单细胞分析慢性粒细胞白血病患者粒细胞MPO的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 收集天津医科大学总医院慢性粒细胞白血病诊治患者60例,临床检查大致正常骨髓象人群60例作为对照组,制备骨髓和血液涂片用于细胞形态学检测和测定细胞MPO活性。

1.2 方法

1.2.1 联苯胺-H₂O₂法细胞MPO染色 按照要求制备涂片,固定后加入10 mmol/L联苯胺溶液200 μL,10% H₂O₂ 10 μL室温作用15 min,流水冲洗后,加入瑞氏染液染色10 min,进行显微镜观察细胞。

1.2.2 设计单细胞分析粒细胞表达MPO的微流控芯片 共聚焦显微镜单细胞分析粒细胞表达MPO情况,根据血细胞图形专家诊断系统对细胞进行分析。

1.3 统计学分析 采用SPSS 18.0软件系统进行计算,两组之间计量资料进行t检验,计数资料采用χ²检验,P<0.05具有明显差异。

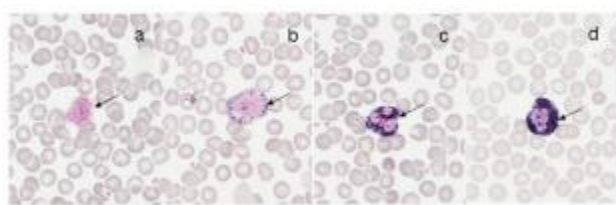
2 结果

2.1 联苯胺法分析各阶段粒细胞表达MPO情况 分析对照组和慢性粒细胞白血病患者各阶段粒细胞表达MPO情况,结果发现幼稚粒细胞、成熟粒细胞均可见MPO阳性,且MPO染色程度不同,分布呈现颗粒状(图1)。

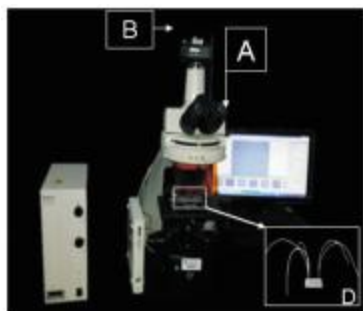
2.2 微流控细胞芯片装置 见图2。该芯片具有两个流体调控通道,血液细胞在“A”进行预处理,然后震动连续进样,分别调控微流体溶液使细胞分离,分离的细胞完整通过细胞信息采集系统“B”,另外“D”可接紫外吸收检测器。

基金项目 天津市自然科学基金资助项目(10JCYBJC14400)

作者简介 曹旭东(1983-),男,硕士在读;研究方向:芯片分子诊断;
通信作者:孙续国,黎小沛, E-mail: sunxuguo@tjmu.edu.cn。



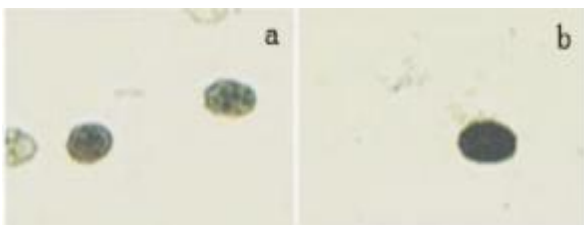
a-b:幼稚粒细胞;c-d:成熟粒细胞

图 1 联苯胺-H₂O₂ 染色法分析血液中粒细胞 MPO

A:细胞 MPO 化学染色和连续进样装置;B:CCD 图形采集器;D:细胞芯片

图 2 细胞 MPO 检测芯片装置

2.3 微流控芯片单细胞分析各阶段粒细胞表达 MPO 情况 分析对照组和慢性粒细胞白血病患者各阶段粒细胞表达 MPO 情况,利用 CCD 图像采集技术,发现对照组和慢性粒细胞白血病患者幼稚粒细胞和成熟粒细胞均呈现 MPO 阳性,并且可见幼稚粒细胞和成熟粒细胞 MPO 均呈现颗粒状分布(图 3)。



a:幼稚粒细胞;b:成熟粒细胞

图 3 芯片法分析粒细胞表达 MPO

2.4 比较粒细胞平均表达 MPO 情况 分析每位研究对象幼稚粒细胞和成熟粒细胞各 100 个细胞,芯片测定各粒细胞 MPO 活性程度相对单位。结果发现慢性粒细胞白血病患者和对照组的幼稚粒细胞平均 MPO 活性明显低于各自成熟粒细胞,提示随着粒细胞的成熟 MPO 表达增高;另外发现,慢性白血病患者幼稚和成熟粒细胞平均 MPO 活性均明显高于对照组(表 1)。

表 1 比较慢性粒细胞白血病患者与对照组之间粒细胞表达 MPO

项目	幼稚粒细胞/(U/cell)	成熟粒细胞/(U/cell)	P
慢性粒细胞白血病	32.1±5.9	78.4±10.2	0.001 1
对照组	28.5±5.6	49.8±8.5	0.002 8
P	0.004 2	0.001 6	

3 讨论

本文首先采用经典方法(联苯胺染色法)测定粒细胞表达 MPO 情况。发现试验组和对照组幼稚粒细胞、成熟粒细胞均呈现 MPO 阳性(图 1)。根据 MPO 染色程度可以判断,试验组和对照组成熟粒细胞 MPO 活性均高于幼稚粒细胞,试验组粒细胞各阶段 MPO 活性均高于对照组粒细胞各阶段 MPO 活性。

本组先前设计了能够动态采集细胞的微流控芯片检测系统,已经成功检测尿液细胞。本文在此基础上开发了一种能够检测特定粒细胞中表达 MPO 的芯片(图 2),建立一种单细胞分析粒细胞表达 MPO 的方法。利用此设计,分析了试验组和对照组粒细胞表达 MPO 情况。结果显示试验组和对照组幼稚粒细胞、成熟粒细胞也均呈现 MPO 阳性。另外粒细胞 MPO 分布也呈现颗粒状(图 3),与联苯胺法染色所呈现的结果在细胞图形特征方面未见有明显不同。

此外,本文采用平均粒细胞 MPO 活性的概念对患者和对照组人群的幼稚粒细胞、成熟粒细胞表达 MPO 活性进行统计分析,发现患者粒细胞 MPO 表达活性在幼稚和成熟阶段均显著高于对照组(表 1),提示粒细胞平均 MPO 活性有可能作为慢性粒细胞白血病诊断标志和个体化检查指标。

参考文献:

- [1] 贾明峰,席亚明,石秀娥,等. MPO NQO1 基因多态性与急性白血病易感性的相关研究[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(6): 1336
- [2] Silveira Vda S, Canalle R, Scrideli C A, et al. Role of the CYP2D6, EPHX, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children[J]. Environ Mol Mutagen, 2010, 51(1): 48
- [3] Paredes A R, Romero G L, Lopez S N, et al. Flowcytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia[J]. Am J Hematol, 2001, 68(2): 69
- [4] 丁天凌,朱萍,吴蓓倩,等. 流式细胞仪检测白细胞胞浆内抗原髓过氧化物酶的实验研究及其应用[J]. 检验医学,2007,22(6): 651
- [5] 韩海荣,梁颖,赵卫国,等. 髓过氧化物酶双抗体夹心光激化学发光检测法的建立[J]. 检验医学,2012,27(4): 291
- [6] 程介克,黄卫华,王宗礼. 单细胞分析的研究[J]. 色谱,2007,25(1): 1
- [7] Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, et al. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices [J]. Lab Chip, 2012, 12(18): 3392
- [8] Sun X G, Wei D J, Liu X C, et al. Improved identification of white blood cells and renal tubular epithelial cells in urine using cytology [J]. Appl Mech Mater, 2012,140:152

(2013-11-07 收稿)