昆明医科大学学报 2014,35(6):129~132
Journal of Kunming Medical University
CN 53-1221/R

应用流式细胞仪准确进行细胞计数的参数设定

柏春玲，董馨忆
（昆明医科大学科研实验中心，云南 昆明 650500）

［摘要］**目的** 探索运用流式细胞仪准确进行细胞计数的参数设定. **方法** 使用 CyFlow® Space 流式细胞仪对体外培养的宣威人肺腺癌细胞 GLC 进行细胞计数设定前向角散射（FSC）、侧向角散射（SSC）及进样速度，编制 GLC 细胞计数程序，流式细胞仪法计数结果与血球计数板法比较. **结果** 适当进样速度的流式细胞仪法与血球计数板法计算的细胞浓度差异无统计学意义（$P>0.05$）. **结论** CyFlow® Space 流式细胞仪能对培养细胞株准确快速计数，流式细胞仪法进行细胞计数可应用于大规模细胞实验中.

［关键词］细胞计数；流式细胞仪；进样速度；细胞存活率
［中图分类号］R331［文献标识码］A［文章编号］2095-610X（2014）06-0129-04

Parameter Settings for Accurate Cell Counting by Flow Cytometer

BAI Chun-ling, DONG Xin-yi
(Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

［**Abstract**］Objective To set parameters for accurate cell counting by flow cytometer. Method By setting forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and speed, we programmed the enumeration of GLC, and compared the results between flow cytometer method and blood counting plate method. Result There was no significant difference in the concentration of GLC between the blood counting plate method and flow cytometer method of the appropriate speed ($P>0.05$). Conclusions CyFlow Space flow cytometer is able to quickly and accurately count cultured cell lines, flow cytometer method can be recommend to be applied in large scale experiments for cell counting.

［**Key words**］Cell counting; Flow cytometer; Speed; Cell survival rate

分析细胞的浓度或细胞亚群浓度统称为绝对计数. 通过对细胞绝对计数才能确定培养细胞的密度，这对细胞培养中细胞状态监测、生物工程学研究等都有很重要意义[1,2].

传统的细胞计数是采用血球计数板法，此法易受操作细节及操作者主观因素影响，精确性得不到保证，并且费时费力，不适用于大规模的细胞实验. 而应用流式细胞仪进行细胞计数所得数据准确可靠，重复性好，具有快速稳定的特点[3]. 据报道显示，采用不同品牌、不同型号的流式细胞仪进行细胞计数所得的结果有差异[4]. 任何一台流式细胞仪，保证其合适的参数，是获得准确计数结果的前提[5].

目前，昆明医科大学科研实验中心新进一台德国 Partec CyFlow® Space 流式细胞仪，Partec 拥有真正的液量绝对计数专利，进行细胞绝对计数的精确性好，定标准确无误，成本更低. 之前，笔者采用此台仪器对人全血细胞进行了计数，结果显示，6 组进样速度所得计数结果均存在显著性差异[6]. 这一结果使得我们无法判断哪一进样速度下的计数结果是准确的，这可能是由于该实验中所检测的细胞样品特性和所设仪器参数导致的. 该实验中所检

［作者简介］柏春玲（1984~），女，彝族，云南峨山县人，医学硕士，助理实验师，主要从事细胞生物学实验及大型仪器管理工作.
［通讯作者］董馨忆. E-mail: 82320297@qq.com

测细胞样品为人全血细胞，所含细胞种类多，细胞大小和细胞内容物差异较大，为了全面体现所有经检测的细胞，笔者只能选择对数坐标系，收集到的信号成对数放大，从而不同进样速度具有的推进压力，对计数结果产生了很大影响.

为了探讨德国 Partec CyFlow ® Space 流式细胞仪准确进行细胞计数的参数设定，笔者选用了体外培养的宣威人肺腺癌细胞 GLC 作为检测样品，该细胞形态、大小较为均一，而且被广泛应用于生物工程和药理实验[7,8]. 因为此台仪器由昆明医科大学科研实验中心专人专管，有研究者可能担心前往使用该仪器进行细胞计数，所花费的时间会影响细胞活性，从而影响后续实验，为了证实这一影响是否存在，笔者应用流式细胞仪对室温放置长达 2 h 的细胞进行了细胞活率检测.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 宣威人肺腺癌细胞 GLC（昆明医科大学第一附属医院中心实验室保存）.

1.1.2 主要试剂与仪器 1640 培养基（Gibco）、小牛血清（TBD）、胰蛋白酶（上海生工）；碘化丙啶（PI）（Solarbio）.

CyFlow ® Space 流式细胞仪、流式管（Partec）、TE2000U 倒置荧光显微镜（Nikon）、CO_2 培养箱（Sheldon）；T75 细胞培养瓶（Corning）.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 液氮冻存的细胞，用 37 ℃水浴复苏，接种在 T75 培养瓶中，培养基为含 10%小牛血清的 1640 培养基，置 37.5℃，5% CO_2 的培养箱中培养. 待细胞融合率达到 85%时，用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液，用含 10%血清的 1640 培养基终止消化，离心收集细胞，用 15 mL 培养基重悬细胞，用于细胞计数. 部分细胞在室温放置 2 h 后，进行细胞活率检测.

1.2.2 应用流式细胞仪进行细胞计数 将制备好的细胞悬液充分混匀，分装于 3.5 mL专用流式管中，每管 800 μL. 采用德国 Partec CyFlow ® Space 流式细胞仪检测，分别以前向角散射（FSC）和侧向角散射（SSC）作为横坐标和纵坐标，采用线性坐标系，调节电压参数，使检测细胞群位于坐标系中央，在结果图中划多边形门 R1，排除杂质，圈出细胞群. 修改进样速度（Speed）为 10、5、1，不改变电压参数和 R1，记录 R1 中细胞群的计数结果，每一进样速度重复 3 次.

1.2.3 应用血球计数板进行细胞计数 将计数板及盖片擦拭干净，并将盖片盖在计数板上，将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间，静置 3 min，注意盖片下不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中. 将血球计数板置于显微镜的低倍镜下观察，并移动计数板，当看到镜中出现计数方格后，数出计数板四大格细胞总数，压线细胞只计左侧和上方的. 然后按公式计算：

$$\text{细胞数（mL）} = \frac{\text{四大格细胞总数}}{4} \times 10^4$$

1.2.4 应用流式细胞仪进行细胞活率检测 取 1 mL 室温放置 2 h 的细胞悬液，离心收集细胞，加入 200 μL PBS 重悬细胞，在此细胞悬液中加入 2 μL PI（1 mg/mL），室温染色 20 min，用 PBS 洗 1 遍，再用 3 mL PBS 重悬细胞，将此细胞悬液充分混匀，分装于 3.5 mL专用流式管中，每管 1 mL. 以未经 PI 染色的细胞作为阴性对照，采用德国 Partec CyFlow ® Space 流式细胞仪检测，先在 FSC-SSC 线性坐标系中，调节电压参数，使检测细胞群位于坐标系中央，在结果图中划多边形门 R1，排除杂质，圈出细胞群. 再在以 FL3 为横坐标，Counts 为纵坐标的对数坐标系中，调节 FL3 的电压参数，使阴性对照细胞的信号在横坐标的值在“1”以内，在横坐标“1”右侧划门 RN1，不改变任何参数，检测经 PI 染色的样品，记录 RN1 的细胞比例，重复 3 次.

细胞存活率 =100% – RN1 的细胞比例

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 软件进行分析处理，采用方差分析及 LSD 多重比较分析，$P < 0.01$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 FSC-SSC 线性坐标系适于检测形态、大小均一的培养细胞株

设置 FSC 电压值为 115.0，SSC 电压值为 209.0，流式细胞仪检测宣威人肺腺癌细胞 GLC 的散点图见图 1. 由图 1 可见，在分别以 FSC 和 SSC 作为横坐标和纵坐标的线性坐标系中，GLC 细胞集中分布在坐标系中央，所有经检测的细胞能全面地体现出来，说明此坐标系适于检测 GLC 细胞.

2.2 适当进样速度的流式细胞仪法与血球计数板法计算的细胞浓度结果一致

不同进样速度的流式细胞仪法与血球计数板法

计算的细胞浓度结果见表 1. 由表 1 可见，当进样速度为 5 和 10 时，流式细胞仪法与血球计数板法计算的细胞浓度的差异无统计学意义，说明在适当进样速度条件下，流式细胞仪计数可替代血球计数板计数.

2.3　进样速度过低时，流式细胞仪法计算的细胞浓度结果是不准确的

不同进样速度的流式细胞仪法计算的细胞浓度结果见表 1，由表 1 可见，进样速度为 5 和 10 时，流式细胞仪法计数的细胞浓度差异没有统计学意义，而且与血球计数板计数结果一致. 而当进样速度较低，为 1 时，所得计数结果与进样速度为 5 和 10，及血球计数板计数结果均存在显著性差异. 说明采用流式细胞仪进行细胞计数时，应设定合适的进样速度，以免检测时间过长，引起细胞明显沉降，影响计数结果的准确性.

2.4　GLC 细胞室温放置 2 h 后，细胞活率仍高达 96.76%

PI（碘化丙啶）是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但能够透过死细胞和晚期凋亡细胞的细胞膜，在 488 nm 激发光下使细胞核红染[9]. 因此，可用 PI 作为计算细胞存活率的染料，荧光强度低的为活细胞，荧光强度高的为死细胞. 室温放置 2 h 的 GLC 细胞，经 PI 染色流式细胞仪检测的细胞活率结果见图 2.

由图 2 可见，阴性对照细胞 PI 阳性比例为 0.12%（远小于 1%），说明 FL3 电压参数设置合理. 经 PI 染色的细胞 PI 阳性比例为 3.53%，说明室温放置 2 h 后，有少部分细胞坏死，但存活率仍很高，3 次重复的统计值为（96.76 ± 0.22）%，说明使用流式细胞仪进行细胞计数花费的时间，将不会影响细胞活率，不会对后续实验产生不良影响.

3　讨论

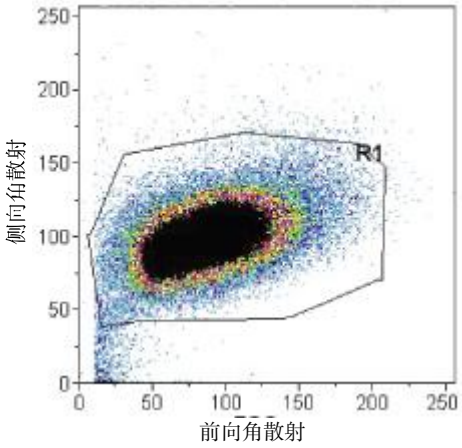

图 1　流式细胞仪检测宣威人肺腺癌细胞 GLC 散点图（FSC/SSC）

Fig. 1　Dotplot of human lung adenocarcinoma cell GLC by flow cytometer (FSC/SSC)

表 1　不同进样速度的流式细胞仪法与血球计数板法计算的细胞浓度（$\bar{x} \pm s$）

Tab. 1　The cell counting results of flow cytometer and blood counting plate（$\bar{x} \pm s$）

计数方法	结果（个 × 10^3/mL）
流式细胞仪法 speed=10	829.59 ± 38.95
流式细胞仪法 speed=5	829.59 ± 38.95
流式细胞仪法 speed=1	374.36 ± 83.21**
血球计数板法	830.83 ± 31.66

**$P < 0.01$.

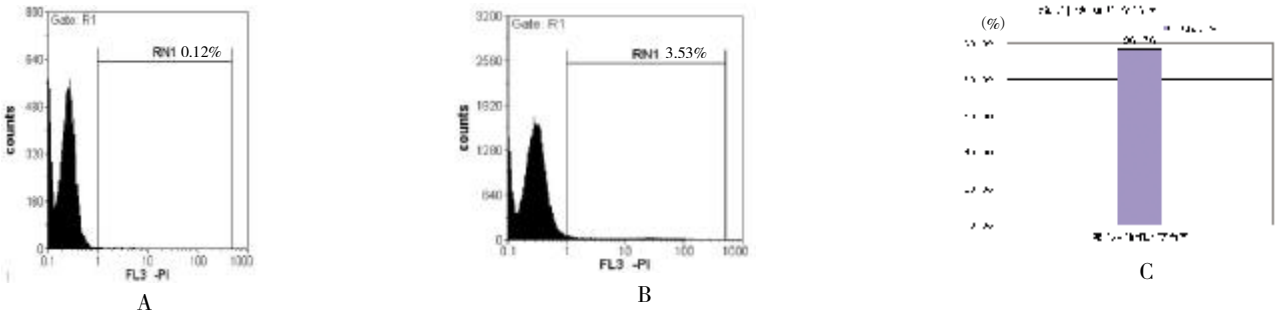

图 2　流式细胞仪检测细胞存活率

Fig. 2　Cell survival rate estimated by flow cytometer

A: 流式细胞仪检测未经 PI 染色的阴性对照细胞直方图，坏死细胞比例为 0.12%；

B: 流式细胞仪检测经 PI 染色细胞直方图，坏死细胞比例为 3.53%；

C: 流式细胞仪检测细胞存活率三次重复的均值及标准差（96.76 ± 0.22）%.

流式细胞仪具有快速定量的特点，而 Partec 拥有真正的液量绝对计数专利，笔者的实验数据表明，无需免疫荧光染色，通过物理参数 FSC 和 SSC，在适当的进样速度下，即可对培养的 GLC 细胞进行准确计数. 这与此前笔者采用物理参数对人全血进行细胞计数的结果不同，很可能是因为人全血细胞所含细胞种类多，细胞大小和细胞内容物差异较大. 而培养的 GLC 细胞形态、大小较为均一，各个细胞的物理参数 FSC 与 SSC 差异较小.

进样速度过低会导致细胞计数结果不准确，这可能是因为在较低的进样速度条件下，完成计数的进样时间过长，导致了细胞悬液中细胞明显沉降. 在今后的计数实验中，实验者应选择合适的进样速度，根据以上实验结果，笔者建议选择进样速度在 5 ~ 10 之间.

室温放置 GLC 细胞 2 h，并不会导致 GLC 细胞大比例坏死，说明使用流式细胞仪进行细胞计数花费的时间，将不会明显降低细胞活率，不会对后续实验产生不良影响.

综上所述，可运用流式细胞仪对形态、大小均一的培养细胞株准确快速计数，在大规模的细胞实验中，可用流式细胞仪法替代血球计数板法对细胞进行计数.

[参考文献]

[1] 管莹,夭建华,高茜,等. CHO细胞初始接种密度对细胞毒性试验结果的影响 [J]. 化学与生物工程,2012,29(9):39 – 42.

[2] BRAAM S R,DENNING C,VAN DEN BRINK S,et al. Improved genetic manipulation of human embryonic stem cells[J]. Nature Methods,5(5):389 – 392.

[3] 高茜,管莹,米其利,等. 应用流式细胞仪进行CHO细胞计数及存活率计算[J]. 2012,29(10):71 – 74.

[4] LEVERING W H,PREIJERS F W,VAN WIERINGEN W–N,et al. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(3): 178 – 188.

[5] 苏炳男,彭明婷. 流式细胞仪计数造血干细胞的影响因素[J]. 实验与检验医学,2012,30(3):213 – 218.

[6] 董馨忆,柏春玲. 流式细胞仪进样速度对细胞计数的影响[J]. 昆明医科大学学报,2013,34(12):132 – 134.

[7] 尹德刚,杨鸿生,李文辉,等. NP方案同期放疗对人肺癌细胞GLC生存率的影响[J]. 临床肺科杂志,2008,13(6):748 – 749.

[8] 胡月新,徐天勇,张钰雯,等. 蛋氨酸酶联合顺铂协调抑制人肺癌细胞GLC生长作用 [J]. 昆明医科大学学报,2014,35(1):5 – 7.

[9] 陈必成,夏鹏,杨丽红,等. 两种荧光染料 – CFSE与碘化丙啶染色方法检测细胞杀伤能力[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(2):192.

(2014 – 03 – 06 收稿)