图像辅助流式细胞仪在鲫鱼血细胞分析中的应用

张树花,刘逸尘,胡锦丽,任星潮,晋伟,张亦陈*

(天津市动植物抗性重点实验室/天津师范大学生命科学学院,天津 300387)

摘要 [目的]探讨图像辅助流式细胞仪在鲫鱼血细胞分析中的应用。[方法]将图像辅助流式细胞仪引入鲫鱼血细胞分类计数分析, 并进一步用于急性铜离子胁迫对鲫鱼血细胞影响的机制探讨。[结果]多维全景分析仪独有的图像辨识功能较好地解决了有核红细胞 对不同类群细胞分群设门分析的干扰,测量鲫鱼白细胞类群占比为1.18% ~1.43%,与同类研究结果一致;120 mg/L 铜离子急性刺激能 够导致鲫鱼白细胞计数下降,并提示细胞水肿是铜离子的一种急性毒性效应。[结论]该研究建立了一种适用于含有核红细胞样本的操 作简便、自动化程度较高的血细胞分群分析方法,可为同类研究提供新的技术手段。 关键词 图像辅助流式细胞仪;鲫鱼;血细胞;铜离子;毒性

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)12-0007-04

Application of Image-based Flow Cytometry on Blood Cell Analysis of Carassius auratus

ZHANG Shu-hua, LIU Yi-chen, HU Jin-li et al (Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance/College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] The aim was to explore application of image-based flow cytometry on blood cell analysis of *Carassius auratus*. [Method] Image-based flow cytometry was introduced into the automatic classification analysis of *Carassius auratus* blood cells, and then applied to the affect analysis of copper ion on *C. auratus* blood cells. [Result] The image-based analysis function greatly improved gating efficiency for distinguish the leucocyte population from huge amount of erythrocytes, which possess unremovable nuclei. 1. 18% – 1.43% of whole blood cells were leucocytes. 120 mg/L Cu²⁺ stress could cause serious decline of blood cell counting. This decline resulted from cell swelling and cell injury caused by stimulation of high concentration Cu²⁺. [Conclusion] In this research, an automatic method for efficiently distinguish *C. auratus* leucocyte is established. It will facilitate the blood cell analysis of fish.

Key words Image-based flow cytometry; Carassius auratus; Blood cell; Copper ion; Toxicity

血液是动物体中不可或缺的液体组织,不仅可以运输生 命活动所需的营养物质及其代谢产物,还对维持动物体内环 境的稳态有重要作用,机体的免疫反应也有血液的参与。血 细胞是动物体免疫系统的重要成分,其种类和丰度可以反映 机体自身的生理状态变化以及外界环境因子的刺激等[1]。 鱼类虽然是较低等的水生动物,但与人类一样,其血液和其 中各类血细胞承担着运输、防御、免疫、体液调节等功 能[1-7],尤其是其中的白细胞,不仅直接参与大量的免疫应 答过程,还能敏感地反映自身生理状态的变化和对外界刺激 的响应^[8-9]。机体的生理及病理变化往往都能在血细胞的 组成和数量等方面有明确的反应,因此,可以通过血液学指 标的检查了解养殖鱼类的健康水平,还能通过"哨兵鱼"的 健康状况评价其生活水域的环境质量[8,10]。很多研究关注 鱼类等水生动物的血细胞分类和功能分析,积累了大量相关 研究结果。李超等^[9]采用 Ficoll - Urografin 法将罗非鱼外周 血细胞分为红细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞;唐 银^[2]根据光镜和电镜观察将花斑裸鲤的外周血细胞分为红 细胞、粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和血栓细胞;周玉等[11]利 用光镜和透射电镜技术,将鳗鲡外周血细胞分为红细胞、单 核细胞、淋巴细胞、粒细胞和血栓细胞:任培丽等^[12]根据血 涂片观察结果,将鲫鱼血细胞分为红细胞、单核细胞、嗜中性

基金项目 国家自然科学基金项目(31472299);天津市应用基础与前 沿技术研究计划项目(15JCZDJC33800);天津市水产生态及 养殖重点实验室开放基金项目(TJAE2015005);"十二五" 农村领域国家科技计划课题(2011BAD13B04)。 粒细胞、血栓细胞、淋巴细胞。鱼类血细胞的分类模式总体 而言基本相近,但对血栓细胞尚未形成较为一致的看法, Shigdar 等^[13]把鱼类的血栓细胞列为白细胞系以外的另一类 细胞;但 Gao 等^[14]以及杨淞等^[15]则把血栓细胞归为白细胞。

研究者一直都在尝试各种准确、快速的血细胞检测方 法。光镜、电镜观察分类计数等常规方法耗时长、工作量大, 对低丰度细胞类群统计较困难;另一方面,由于鱼类血细胞 中占比最大的红细胞有细胞核,用常规方法难以去除,所以 会干扰白细胞的分析,无形中增加了很多不必要的工作量。 自动化的血液分析技术能极大地提高检测效率,相较于人 工,仪器检测的批次稳定性更高,重复性更好,通量更大。目 前,医学血液学检测多采用基于流式细胞技术的自动化分类 分析,数分钟即可获得丰富的数据,为疾病的诊疗提供了重 要的技术保障。常规流式细胞仪在边界细胞划分方面缺乏 针对鱼类有核红细胞干扰的高效辅助手段,因此一直以来, 利用流式细胞仪对鱼类进行血液学检测的应用尚不普遍。 Inoue 等^[16]尝试用水处理鲤鱼血细胞 20 s 以去除红细胞,然 后将样品用于流式细胞仪进行分群分析,并把血细胞分为5 个类群:红细胞群、凝血细胞与淋巴细胞混合群、单核细胞 群、嗜中性粒细胞群和嗜碱粒细胞群,但未见该方法广泛应 用的后续报道。FlowSight 等带有同步图像采集功能的流式 细胞仪是近年来出现的一类新型多功能快速检测设备,除了 具备常规流式类仪器高通量的检测能力外,还有一个最大特 点是能将每一个样点的明场及其他荧光视场的图像实时呈 现并记录下来,所以也被称为图像辅助流式细胞仪或显微流 式细胞仪、多维全景分析仪。该类仪器在类群边界划分方面 较常规流式细胞仪具有显著的优势,另外由于其改进了检测

作者简介 张树花(1992—),女,山西朔州人,硕士研究生,研究方向: 水生动物分子生物学。*通讯作者,副教授,博士,硕士生 导师,从事水生生物学研究。 收稿日期 2018-02-04

模块以及管路设计,所以能够获得更多方面的测量数据,便 于精确分群,而且对样品的适应性大大提高,不易堵塞。已 经有越来越多的研究者利用此类仪器开展各项研究。Pan 等^[17]利用其分析了细菌的生存能力。也有学者借助多维全 景的图像辅助开展自噬的研究以及相关药物的研发^[18]。

鲫鱼是我国广泛养殖的鲤科经济鱼种,其血液学研究的 技术探索和相关结果可为多种养殖鱼类提供参考。笔者借 助图像辅助流式细胞仪将白细胞与有核红细胞区分开,建立 了一种自动化的分析技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。试验所用鲫鱼购自本地水产市场,体长为(26.7±2.5)cm,体重为(420±30)g。活体运回实验室后暂养5d,选取体表完好、摄食及运动行为正常的个体用于试验。

1.1.2 试剂。肝素钠抗凝剂购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,多聚甲醛购自生工生物工程(上海)股份有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器。台式冷冻离心机(Eppendorf 公司); FlowSight 图像辅助流式细胞仪为 Merck Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 血细胞样品的制备。参照杨兴棋^[19]的采血方法,用 经肝素钠处理的注射器从鲫鱼尾静脉微创采集全血,从中吸 取 20 μL 血细胞样品经 4% 多聚甲醛固定后洗涤 3 次,用 70 μm细胞筛过滤,去除黏连的多细胞团,按照仪器操作说明 上机检测。

1.2.2 血细胞分群方法分析。随机采集 10 尾鲫鱼全血样本,各收集 10 万个样点,利用本机软件进行分析,借助同步 采集的图像验证分群结果。该研究对比了 2 种分析方案:一种是常规流式细胞仪分析所用的根据前向散射与侧向散射 2 个方面差异进行分类;另一种是利用本机独有的明场图像的 面积与长宽比差异对细胞加以区分。2种方法都根据各类细 胞样点的聚集情况将其归入不同类群,并参考仪器同步采集 的每个样点的图像信息对所划分类群的准确性进行验证,确 保优化的设门范围,然后进一步计算细胞比例。

1.2.3 急性 Cu²⁺刺激对鲫鱼白细胞的影响分析。在初步建 立鲫鱼血细胞快速分类分析方法的基础上,参考杨丽华 等^[20]的研究结果,设置鲫鱼急性 Cu²⁺刺激试验,对照组 Cu²⁺添加量为0 mg/L,试验组为120 mg/L,每组5 尾鲫鱼。 处理24 h 后分别抽取对照组和试验组鲫鱼血样,利用该方法 进行血细胞分类计数和体积变化分析,以了解 Cu²⁺对鲫鱼 白细胞的影响。

2 结果与分析

2.1 血细胞分群分析 首先参考常规流式细胞分析的模 板,利用反映细胞大小和颗粒度的前向散射和侧向散射参数 对细胞样点加以区分,但未能获得较为理想的分群结果,绝 大部分细胞样点都集中在一起。辅助图像验证显示其中以 有核红细胞为主,并含有少量白细胞,大部分白细胞样点分 布于前述细胞群的边缘,偏向面积较大的一侧,但其与红细 胞类群之间界限不够清晰,所以不利于准确统计各类细胞 数量。

利用图像辅助流式细胞仪独有的明场图像的测量结果 进行分群分析则显示了较清晰的类群边界。以面积和长宽 比为坐标系做样点分布散点图,处于面积较小区间的一群样 点为红细胞,其显著的特点是细胞小,呈椭圆形或长圆形,略 有收缩。位于散点图右侧的是白细胞类群,该类群细胞特征 为体积大,形态近圆形或不规则;从明场图像可以看出胞内 不均一,普遍具有高对比度像素点,提示该类群细胞具有较 为复杂的胞内结构。两群细胞间具有明显的低密度间隙,可 以据此将其选定为设门依据(图1)。

| А | | R1 R2 | В | 70 | 2772 | 10265 | С | 108 | 1555 | 2821 |
|------------------|-----|------------------|---|-------------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|
| 长宽比 Aspect ratio | 0.9 | | | 17050 | 23116 | 27231 | 27231 | 4908 | 8374 | 17340 |
| | 0.6 | <u>io</u> 20 300 | | 32014 | 37689 | 40517 | 3423 | 34233 | 37247 | 40820 |
| | 0.3 | | | 45187 54784 | 59967 | | 43994 | 49148 | 58704 | |
| | | 面积 Area | | ■ ■ ■20 µm | | | | | and the second | |

注: A. 鲫鱼血细胞流式散点图,其中 R1 类群为红细胞, R2 类群为白细胞; B. R1 类群的单细胞明场图像; C. R2 类群的单细胞明场图像; B、C 图 中的数字代表该细胞样点通过检测器的序号

Note: A. Scatterplot of *Carassius auratus* blood cells, among them group R1 stands for erythrocytes, and group R2 stands for leukocytes; B. Single-cell images of group R1; C. Single-cell images of group R2; The numbers in B and C represent the sequence number of cells passing through the flow cytometry

图1 鲫鱼血细胞的图像辅助流式分析

Fig. 1 Blood cells analysis of Carassius auratus by image-based flow cytometry

2.2 急性 Cu²⁺刺激对鲫鱼白细胞的影响 高浓度 Cu²⁺刺 激24 h之后,鲫鱼体内白细胞与对照组相比在数量和细胞形

态 2 个方面都发生了明显的变化。首先,白细胞计数急剧下降,从 2.3 × 10⁷ 个/cm³ 下降为 1.5 × 10⁷ 个/cm³,降幅达

34.8%;其次,白细胞体积也显著增大,通过测量白细胞大小的直方图可以发现,试验组仅有79.0%的细胞落在了对照组95.0%的细胞覆盖的大小区间,而试验组更有约16.6%的白



细胞大小完全超出了对照组的分布区间,向体积增大的方向 偏移(图2)。



注:A. 对照组白细胞大小分布情况;B. 试验组白细胞大小分布情况

Note: A. The size distribution of leukocyte in the control group; B. The size distribution of leukocyte in the experimental group

图 2 Cu²⁺ 刺激对鲫鱼白细胞的影响

Fig. 2 The effect of Cu²⁺ stimulation on the leucocytes of Carassius auratus

3 结论与讨论

鱼类虽然是较为低等的脊椎动物,但具有与人类相似的 血液和血细胞构成,因此将医学血液学检测的技术原理应用 于鱼类血液检测一直都是研究者所期望的。对血细胞进行 人工染色,借助显微镜观察分类计数可以了解鱼类血细胞在 生理和病理条件下的变化,但不适合大规模、高通量操作。 流式细胞技术具有高通量、自动化等优势^[21-23],但多年来的 研究表明常规流式细胞仪在处理鱼类等有核红细胞与白细 胞混合样品方面区分度尚不理想,所以还没有普遍适用的自 动化分析方法被广泛使用。图像辅助流式细胞仪是近年来 衍生出的一种新型检测设备,其采用流式进样方式,保证了 检测的高通量,升级了常规测量模块,还为每个检测通道添 加了图像采集功能,极大地提高了样品分析的便利性、准确 性和效率^[24]。

该研究利用图像辅助流式细胞仪对鲫鱼血细胞进行了 初步的自动化分类分析和应用的探索。在区分有核红细胞 与白细胞类群边界方面,该仪器表现出了极大的优势。与常 规流式细胞仪需要将样品回收分析后才能确定样点特征不 同,该仪器可以直接通过同步采集的图像对样点进行甄别; 更为重要的是,可以针对任意一个样点单独分析,这对于常

规流式细胞仪而言,相当于连续单独回收类群边界的每一个 细胞再加以甄别,实际上在操作中是无法实现的。前向散射 和侧向散射特征对于不经荧光标记的细胞是较为常用的区 分指标,但在无法去除的大量有核红细胞的干扰下,很难发 挥其区分效力。该研究也遇到了这种情况,不但有白细胞混 杂在红细胞类群当中,而且白细胞与红细胞的类群边界也不 清晰,虽然在红细胞和白细胞各自样点聚集范围之间存在低 密度区,但通过单独样点的明场图像辨识发现此区域仍然是 混合细胞群。该研究又进一步尝试利用该仪器独有的明场 图像信息对血细胞进行分群分析,获得了较为理想的结果。 以面积和长宽比为坐标系的散点图可以呈现出较为清晰的2 个细胞聚集区。位于面积较小的区间内的细胞数量占绝大 多数,且具有红细胞的典型特征,体积较小,长宽比较大,加 之胞内缺乏类似白细胞内的复杂膜系统,所以甲醛固定后更 容易收缩,其体积与大部分白细胞甚至其中的小淋巴细胞的 差距都更为明显,所以整个类群几乎不含有明显可辨的白细 胞。另一方面,从白细胞类群的占比也可作出同样的推断, 该方法设定的白细胞门内所包含的白细胞占比与已报道的 同类研究结果吻合(表1)。更为重要的是,同步采集的每个 样点的明场图像提供了其形态学的佐证。

| Table 1 Results from this research and published papers | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 文献 Literature | <u>鱼</u> 种 Fish species | 分析方法 Analysis method | 红细胞比例 Erythrocyte ratio//% | 白细胞比例 Leukocyte ratio//% | | | | | | |
| [25] [11] [2] [26] [27] | 革胡子鲶(Clarias lazera) 欧洲鳗鲡(Anguilla anguilla) 花斑裸鲤(Gymnocypris eckloni Herzenstein) 金鱼(Carassius auratus) 白鲢(Hypophthalmichthys molitrix) 鳙鱼(Aristichthys nobilis) 草鱼(Mylopharyngodon piceus) 异育银鲫(Carassius auratus gibelio) 鲤鱼(Cyprinus carpio) | 光镜 光镜、透射电镜 染色后,光镜、透射电镜观察 扫描电镜、透射电镜 染色后,光镜 | $\begin{array}{c} 99.30 \sim 99.70 \\ 97.82 \sim 98.55 \\ 98.12 \sim 98.22 \\ 90.00 \\ 98.58 \\ 98.48 \\ 98.24 \\ 98.86 \\ 98.07 \\ \end{array}$ | $\begin{array}{c} 0.30 \sim 0.70 \\ 1.45 \sim 2.18 \\ 1.78 \sim 1.88 \\ 10.00^{*} \\ 1.42^{*} \\ 1.52^{*} \\ 1.76^{*} \\ 1.14^{*} \\ 1.93^{*} \end{array}$ | | | | | | |
| 该研究 This study | 鲫鱼(Carassius auratus) | 图像辅助流式细胞仪 | 98.57~98.82 | 1.18~1.43 | | | | | | |

表1 该研究结果与已发表结果的对比

注:* 该数据是根据引用文献中的分类计数结果计算所得 Note: * Besult: were calculated based on publiched papers 在初步建立基于图像辅助流式细胞仪的鲫鱼血细胞分 类分析方法的基础上,该研究进一步尝试将其用于实践检验 的可行性。重金属离子污染是一种常见的环境胁迫,Cu²⁺是 其中的代表之一,会导致鱼类等水生动物出现游泳行为异 常、生理功能紊乱、组织细胞病变甚至死亡等一系列的异常 症状^[28]。血细胞变化可以作为其毒性效应的重要参考指 标^[1]。该研究发现,较高浓度的 Cu²⁺急性胁迫对鲫鱼产生 的影响可反映在其血细胞计数、比例变化及形态改变方面, 其中较为直观的就是细胞计数下降和细胞体积肿胀。该特 征与史增奎^[39]、王丽^[30]的研究结果一致,表明 Cu²⁺通过诱 发细胞水肿等表征导致细胞损伤、破裂,但其深层次的机理 尚需通过离子通道分析等综合研究进一步解析。上述结果 提示,基于图像辅助流式细胞仪的自动化血细胞分类分析方 法适用于鱼类血细胞分类和计数等方面的测量需求。

血液中的细胞承担了气体输送和机体防御等重要功能, 其中各类细胞的种类和数量均必须在一定范围内保持相对 稳定,从而确保机体处于健康状态。当机体遭遇病原刺激或 者环境胁迫时,遍布周身的血细胞往往能在第一时间做出反 应,无论是主动应答还是被动适应,因此对血细胞的分析是 一种敏感、快速的健康监测手段[1-2]。血象分析是医学血液 学研究和检测的重要方法,其中对各种细胞分类计数的信息 能在极短时间内为健康诊断提供指向性的参考,所以各类自 动化的技术和装备都已在医学检测领域广泛应用^[31-32]。流 式细胞技术作为一种快速高通量的样品分析平台,辅以各种 先进检测模块可以衍生出各种新型检测设备,服务于不同领 域的需求,其自动化、高通量、多维度等优势越来越受到研究 者的重视。在当前水产动物疫病频繁大规模暴发的情况下, 提前发现,提前预警,尽早采取有针对性的预防措施显得尤 为重要,而这都依赖于快速准确的分析和诊断。该研究针对 鱼类血细胞高通量自动化分析这个关键点,将图像辅助流式 细胞仪引入鱼类血细胞分析,利用其独有的同步图像信息进 行辅助分群,建立了一种较为优化并且具有一定实用性的自 动分析方法。该方法采用微创采血,仅需不到 10 μL 全血的 细胞量即可获得具有重要参考价值的诊断信息;另一方面, 该方法操作非常简便,采血后直接固定 30 min 即可上样分 析,每个样品仅需1 min 即可采集数万细胞样点,因此对于批 量制备的样品,可实现每小时数十个样品的检测速度。由于 每个样品的检测通量可以达数万细胞,而且高质量的测量模 块可以确保每个样品的测量和判定标准保持高度一致,为能 早期发现血细胞种类和数量在统计学上的细微差异提供了 重要的技术保证,也有望为疾病早期预警提供参考。

参考文献

- ELLIS A E. The leucocytes of fish: A review [J]. Journal of fish biology, 1977,11(5):453-491.
- [2] 唐银.养殖花斑裸鲤外周血液生理指标及血细胞形态参数的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2015.
- [3] 周贤君,代应贵,王开功,等.低等脊椎动物血细胞研究概况[J].水利

渔业,2008,28(2):9-12.

- [4] 周玉,郭文场,杨振国.鱼类血细胞的研究进展[J].动物学杂志,2001, 36(6):55-57.
- [5] 田囡囡. 几类水产动物血细胞免疫研究现状[J]. 科技经济市场,2006 (11):66.
- [6] CLAVER J A, QUAGLIA A I E. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates [J]. Journal of Exotic Pet Medicine, 2009, 18(2):87 – 97.
- [7] 赵凤岐,曹谨玲.硬骨鱼血细胞发生的研究进展及经济前景分析[J]. 中国渔业经济,2007(3):30-33.
- [8] 周永灿,邢玉娜,冯全英. 鱼类血细胞研究进展[J]. 海南大学学报(自然科学版),2003,21(2):171-176.
- [9] 李超,陈明,王瑞,等.罗非鱼外周血白细胞分离与血细胞指数研究 [J].大连海洋大学学报,2009,24(S1):10-14.
- [10] 袁仕取,张永安,姚卫建,等. 鳜鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报,1998,22(1):39-47.
- [11] 周玉,郭文场,杨振国,等.欧洲鳗鲡外周血细胞的显微和超微结构 [J].动物学报,2002,48(3):393-401.
- [12] 任培丽,张迎梅,耿广琴,等. 污染水域鲫鱼外周血细胞形态和数量的 变化[J]. 动物学杂志,2008,43(2):37-42.
- [13] SHIGDAR S, HARFORD A, WARD A C. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell)[J]. Fish & shellfish immunology, 2009, 26(5):731 – 736.
- [14] GAO Z X, WANG W M, YI Y, et al. Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. Fish physiology & biochemistry, 2007, 33(3):213 – 222.
- [15] 杨淞,杨世勇,肖拉,等.养殖齐口裂腹鱼外周血细胞显微观察[J].四 川园物,2011,30(2):202-206.
- [16] INOUE T, MORITOMO T, TAMURA Y, et al. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry [J]. Fish & shellfish immunology, 2002, 13(5):379 – 390.
- [17] PAN Y W,KAATZ L. Use of image-based flow cytometry in bacterial viability analysis using fluorescent probes [J]. Current protocols in microbiology, 2012,27(1):1-11.
- [18] CHAN L L,SHEN D, WILKINSON A R, et al. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells [J]. Autophagy, 2012,8(9):1371-1382.
- [19] 杨兴棋. 鱼类的采血技术[J]. 淡水渔业, 1979(Z1): 43-44, 11.
- [20] 杨丽华,方展强,郑文彪.重金属对鲫鱼的急性毒性及安全浓度评价 [J].华南师范大学学报(自然科学版),2003(2):101-106.
- [21] 赵泓,刘凡.流式细胞仪[J].安徽农学通报,2006(12):39-41,80.
- [22] 冼健安,王安利,孙敬锋. 流式细胞术在水产动物研究中的应用[J]. 水产科学,2009,28(5):290-294.
- [23] 刘涛,张巍,王凤阳,等. 流式细胞仪在免疫学研究中的应用[J]. 动物 医学进展,2008,29(3):102-105.
- [24] 赵书涛,武晓东,王策,等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现 代生物医学进展,2011,11(22):4378-4381.
- [25] 林光华,张丰旺. 革胡子鲶血液常数值的周年变化[J]. 动物学报,1991 (3):341-342.
- [26] 傅莉娟,高平,严绍颐.金鱼成熟红血细胞的超微结构研究[J].科学 通报,1988,33(15):1178-1181.
- [27] 杨严鸥,余文斌,姚峰,等.5 种鲤科鱼类血细胞数量、大小及血清生化成分的比较[J].长江大学学报(自然科学版),2006,3(2):159-160, 164.
- [28] 徐永江. 几种重金属离子对半滑舌鳎生理生态学影响的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2005.
- [29] 史增奎. 重金属离子对鱼类血液指标影响的研究[J]. 渔业经济研究, 2006(6):45-48.
- [30] 王丽. 分子和细胞水平上研究 Ni²⁺ 的毒性作用[D]. 济南:山东大学, 2011.
- [31] MCFARLIN B K, GARY M A. Flow cytometry what you see matters: Enhanced clinical detection using image-based flow cytometry[J]. Methods, 2017,112:1-8.
- [32] 陈军浩.流式细胞术在临床及科研中的应用[J].临床检验杂志,2012, 30(10):861-864.