

高维流式细胞术在血液学中的技术进展与应用综述

周一丹 梁星光*

(浙江大学医学院附属第一医院中心实验室, 杭州 310000)

摘要 流式细胞术是一种能够对细胞群体中单个细胞或生物颗粒进行多参数检测、快速定量分析及物理分选的技术。传统流式细胞术因可检测的荧光参数相对有限、易受荧光串扰干扰且分析维度单一, 难以满足日益增长的复杂生物样本解析需求。尤其是在血液学领域, 细胞免疫表型的精准解析是揭示血液疾病发病机制的核心环节, 在很大程度上依赖于流式细胞术的发展与革新。为此, 光谱流式细胞术、质谱流式细胞术及成像流式细胞术三类高维流式细胞术应运而生, 共同推动了流式细胞术体系的革命性突破。其中, 光谱流式细胞术通过特定算法解析荧光染料的完整发射光谱, 有效提升重叠荧光信号的分辨能力, 可实现50色以上荧光信号的高精准检测; 质谱流式细胞术采用重金属同位素标记抗体替代传统荧光染料, 可消除光谱串扰问题; 成像流式细胞术则在保留高通量分析优势的同时融合显微成像功能, 同步获取细胞荧光强度、散射光信号及形态学信息, 实现可视化的多维分析。该文系统阐述上述三种高维流式细胞术的基本原理与核心参数, 并重点介绍其在血液学中的前沿应用进展, 旨在为不同研究场景下流式细胞术的合理选型提供理论支撑与实践参考。

关键词 光谱流式细胞术; 质谱流式细胞术; 成像流式细胞术; 血液相关疾病; 应用总结

A Review of Technical Advances and Applications of High-Dimensional Flow Cytometry in Hematology

ZHOU Yidan, LIANG Xingguang*

(Central Laboratory, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

Abstract Flow cytometry is a technique for multi-parameter detection, rapid quantitative analysis and physical sorting of single cells or biological particles in cell populations. Accurate characterization of cellular immunophenotypes, which largely depends on the technical evolution and innovation of flow cytometry, is the core prerequisite for deciphering the pathogenesis of hematological diseases. Conventional flow cytometry has inherent drawbacks, including a limited number of detectable fluorescence channels, severe spectral overlap and low analytical dimensionality, rendering it insufficient for the analysis of highly complex biological specimens. Against this background, three high-dimensional flow cytometry platforms, namely spectral flow cytometry, mass cytometry and imaging flow cytometry, have emerged, bringing revolutionary advances to the field of flow cytometry. Spectral flow cytometry deconvolves the full emission spectra of fluorescent dyes through dedicated algorithms, which effectively enhances the resolution of overlapping fluorescent signals and enables high-precision detection of over 50 fluorescence parameters. Mass cytometry replaces conventional fluorescent dyes with heavy metal isotope-conjugated antibodies, completely avoiding spectral overlap artifacts. Imaging flow cytometry combines high-

收稿日期: 2026-07-10

接受日期: 2026-09-08

浙江省自然科学基金探索类项目(批准号: LY21H090012)资助的课题

*通信作者。Tel: 0576-87232223, E-mail: lrvin@zju.edu.cn

Received: July 10, 2026

Accepted: September 8, 2026

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Exploration Project) (Grant No. LY21H090012)

*Corresponding author. Tel: +86-576-87232223, E-mail: lrvin@zju.edu.cn

throughput cell profiling with microscopic imaging. It simultaneously acquires cellular fluorescence intensity, light scatter signals and morphological features to achieve visualized multi-dimensional single-cell analysis. This review systematically elaborates the basic principles and core performance indicators of the above three high-dimensional flow cytometry modalities, focusing on their state-of-the-art applications in hematological disorders. It aims to offer objective technical references for researchers to select appropriate high-dimensional flow cytometry platforms for different experimental and clinical contexts.

Keywords spectral flow cytometry; mass cytometry; imaging flow cytometry; hematology-related diseases; application summary

流式细胞术是生物医学研究和临床检测中应用广泛的核心技术之一。该技术基于流体动力学聚焦原理,通过鞘液高速裹挟样本悬液,将其压缩为轴心处直径狭窄、流速恒定的单细胞流,保证细胞或颗粒逐个有序地通过激光检测区,实现高通量逐粒分析。当细胞/颗粒经过检测区时,光学系统同步采集三类信号:前向散射光强度与细胞相对大小呈正相关,侧向散射光强弱反映胞内结构复杂度(如细胞器丰度及核形态等颗粒度特征),荧光信号则用于表征特异性标记的细胞表型或分子表达水平。上述光信号经检测器转换为电信号,由软件整合处理,最终实现对混合细胞群体中单细胞目标的高通量分类与精准解析。

凭借独特的技术特色,流式细胞术已在血液学、细胞生物学、免疫学、肿瘤学等诸多生物医学领域中应用普遍,成为基础研究与临床检测不可或缺的重要工具。尤其是在血液学领域,因其涉及氧合、凝血、免疫防御等重要生理过程,与病理学、免疫学、细胞遗传学等学科深度交叉,对血液系统疾病机制等的阐释,均高度依赖于使用流式细胞术解析的免疫表型精准分析^[1]。然而,传统流式细胞术通常依赖二色镜、带通滤光片等光学元件及光电倍增管等点探测器,针对预设的光谱波段进行信号采集,适用于检测特定荧光团。因此,该方法可用的荧光通道数量有限,易产生光谱重叠,在多色流式分析中表现不足^[2],此外,传统流式细胞术无法提供细胞形态学信息,也可能导致对细胞状态的误判。

为突破上述限制,近年来,研究者相继开发出多种高维流式细胞术。其中,光谱流式细胞术采用数量多于荧光染料的探测器,通过采集荧光染料的完整发射光谱,并借助算法对全部探测器数据进行解析,能够更精确地分离重叠荧光信号,从而实现对细胞群体更细致的区分与鉴定^[3]。质谱流式细胞术

则融合了传统流式细胞术的高通量优势与飞行时间质谱的高灵敏度和高特异性,利用稳定金属同位素标记抗体,可对单个细胞同时检测多达50种以上的参数,为深入评估临床免疫应答的复杂性与异质性提供了新途径^[4-5]。成像流式细胞术(imaging flow cytometry, IFC)作为高通量成像平台,兼得流式细胞术的统计通量与细胞图像的形态信息,可在获取蛋白质、核酸及细胞器空间分布的同时,精准捕获细胞形态,便于研究者依据亚细胞定位区分细胞类型与功能状态,深入解析单细胞内在特征^[6]。上述三种技术分别从“光谱解析”、“质谱信号”、“图像融合”三个维度,突破了传统流式细胞术在参数数量、信号分辨率和分析维度上的瓶颈,显著提升了对复杂生物体系内细胞异质性、功能状态的解析能力,同时支持细胞可视化观察。

本文系统综述三种高维流式细胞术的基本原理与核心参数,并着重总结其在血液系统疾病中的最新应用进展,以期为不同研究场景下的流式细胞术选型提供理论支撑与实践参考。

1 高维流式细胞术基本原理

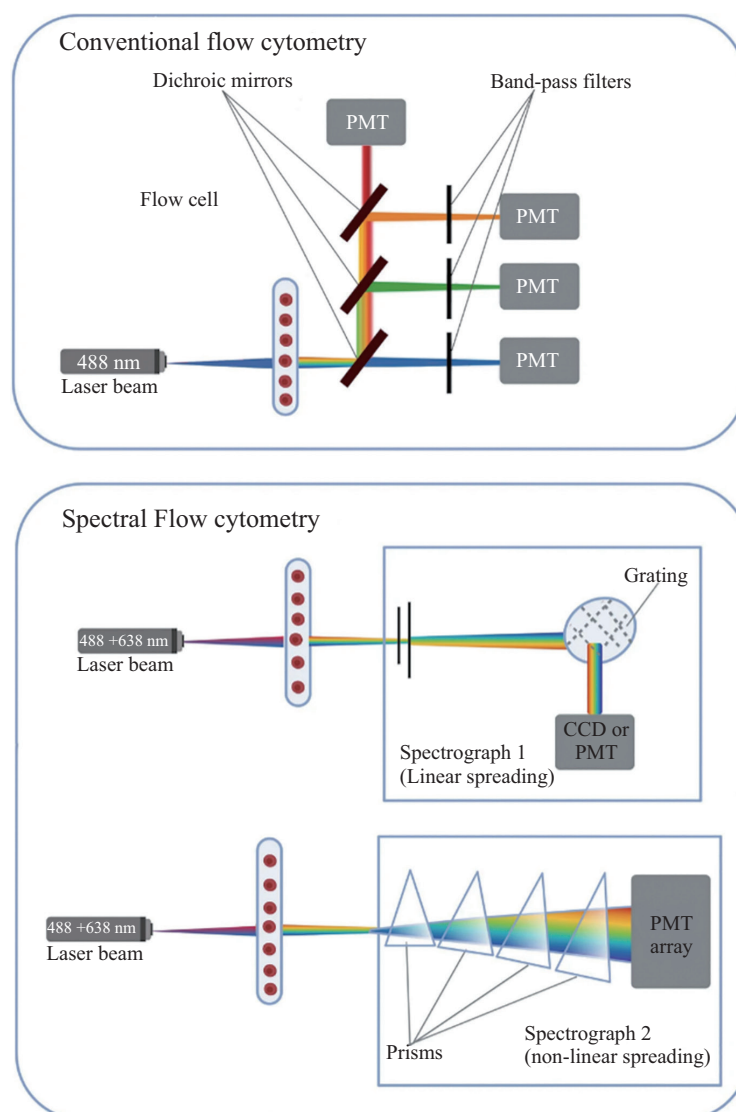
1.1 光谱流式细胞术

1979年,Wade等^[7]首次将光导摄像管引入传统流式细胞仪中,实现了对流动中单个细胞完整发射光谱的实时获取,标志着光谱流式细胞术研究的开端。然而,该技术在发展初期面临诸多技术瓶颈,包括信号信噪比低^[8]、可检测光谱波长范围受限、无法解析单个标记细胞的独立光谱^[9],以及近红外波段灵敏度不足^[10]等问题。直至21世纪初,普渡大学研制出一台光电检测器为滨松32通道多阳极光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)线性阵列的流式细胞仪,可在5 μ s内完成细胞光谱信息的采集,首次实现单细胞的高速全光谱流式检测^[11]。这一进展被视

为现代光谱流式细胞术从概念验证迈向实用系统的里程碑。2012年底, Sony公司获得相关专利授权, 推出首款商用光谱流式细胞仪Sony SP6800。此后, 随着硬件、探测器及计算机分析算法的持续改进, 商用光谱流式细胞术逐步走向成熟, 并在多个领域展现出广泛的应用潜力。

如图1所示, 光谱流式细胞术在光路设计上与传统方法存在显著区别。传统流式依赖带通、短通及长通滤光片, 通过特定的激光器-检测器组合仅能采集预设波段的荧光信号; 而光谱流式细胞术则先

利用棱镜或光栅对发射荧光进行色散, 继而同步采集每种荧光染料在完整激光激发波长范围内的全发射光谱^[12]。其核心原理在于, 借助棱镜阵列、衍射光栅、二向色阵列及多路光束分裂组件等光学结构, 将发射光分解为连续的光谱组分, 并由高性能检测器[如光电倍增管、雪崩光电二极管 (avalanche photodiode, APD) 或硅光电倍增管 (silicon photomultiplier, SiPM)]进行高精度探测。采用光谱反卷积或光谱解混算法对采集到的光谱数据进行解析, 可有效校正不同荧光染料间的光谱串扰^[13], 从而实现



传统: 光学——二向色镜及带通滤光片; 光收集——反射、透射、阻挡; 探测器——光电倍增管。光谱: 光学——光栅或棱镜; 光收集——色散; 探测器——多阳极光电倍增管或电荷耦合器件。

Traditional: optics—dichroic mirrors and bandpass filters; light collection—reflection, transmission, blocking; detector—PMT. Spectral: optics—gratings or prisms; light collection—spectral dispersion; detector—multi-anode PMT or charge-coupled device.

图1 传统流式细胞术与光谱流式细胞术在光学及探测器部分的异同(复制自参考文献[12], 图片已得到授权)

Fig.1 Differences in optical and detector components between traditional flow cytometry and spectral flow cytometry (reproduced from reference [12], with permission for the image)

蛋白表达水平及细胞生理状态的精准评估。这一技术改进使传统流式细胞术中因带通滤光片限制而丢失的部分染料信号得以被识别,目前该技术已可满足多达50色以上的多参数研究需求。

1.2 质谱流式细胞术

2009年, Bandura等^[14]首次将飞行时间质谱与传统流式细胞术相结合,创立了质谱流式细胞术,为免疫学、肿瘤学等领域的单细胞深度解析提供了全新工具。该技术的核心原理在于,利用金属同位素标记的特异性抗体结合细胞内、外靶标,所得单细胞悬液经雾化处理后进入氩离子等离子体中汽化并电离,形成的离子流随后进入飞行时间检测室进行分离与检测。检测器记录各离子到达的飞行时间,生成对应的金属同位素信号峰,最终通过软件将质谱数据转化为流式细胞术可识别的单细胞参数格式^[15-16]。

如图2所示,与传统流式采用荧光标记不同,质谱流式细胞术采用稳定重金属同位素(以镧系元素为主)标记抗体,这些同位素在生物体内天然不存在,每个同位素信号可特异性地对应一种抗体探针,从而准确反映单细胞表面或内部的抗原表达水平^[17]。该技术的主要优势包括:①采用镧系金属标签,可在单细胞水平同时检测40个以上靶标,且显著提高信号分辨率;②有效排除传统流式中荧光串色及自发荧光的干扰,将背景信号降至最低;③金属标签抗体

稳定性高,对细胞固定、破膜等处理兼容性强,可同时检测细胞表面和功能性胞内靶标。目前,质谱流式细胞术已成为高维单细胞分析的重要工具,广泛应用于免疫细胞群体的精细分群与功能表征^[18-20]。

1.3 成像流式细胞术

成像流式细胞术源于将传统流式细胞术的高通量检测能力与细胞形态学及亚细胞定位所提供的空间信息相结合的技术构想^[21]。21世纪初,首款商用成像流式细胞仪ImageStream的问世,实现了对流动状态下低荧光强度细胞的多通道成像^[22]。其基本结构涵盖四大系统:流体系统负责以适宜的速率和稳定性输送细胞样本;光学系统通过激光和滤光片激发散射光及荧光信号;成像系统依赖物镜和电荷耦合器件(charge-coupled device, CCD)相机完成图像捕获;电子系统则负责将光信号转换为可处理的电信号。该技术在传统流式基础上融合高分辨率成像,已发展成为前沿的细胞分析工具^[23]。

然而,早期基于CCD相机的成像系统在科研和临床应用中成本高昂,且数据传输流程复杂,难以与实时高通量分析系统实现无缝衔接。为此,采用相对经济的互补金属氧化物半导体(complementary metal oxide semiconductor, CMOS)相机进行明场成像,已成为目前更具商业可行性的替代方案。

在功能层面, IFC通过捕获细胞图像,可提供细

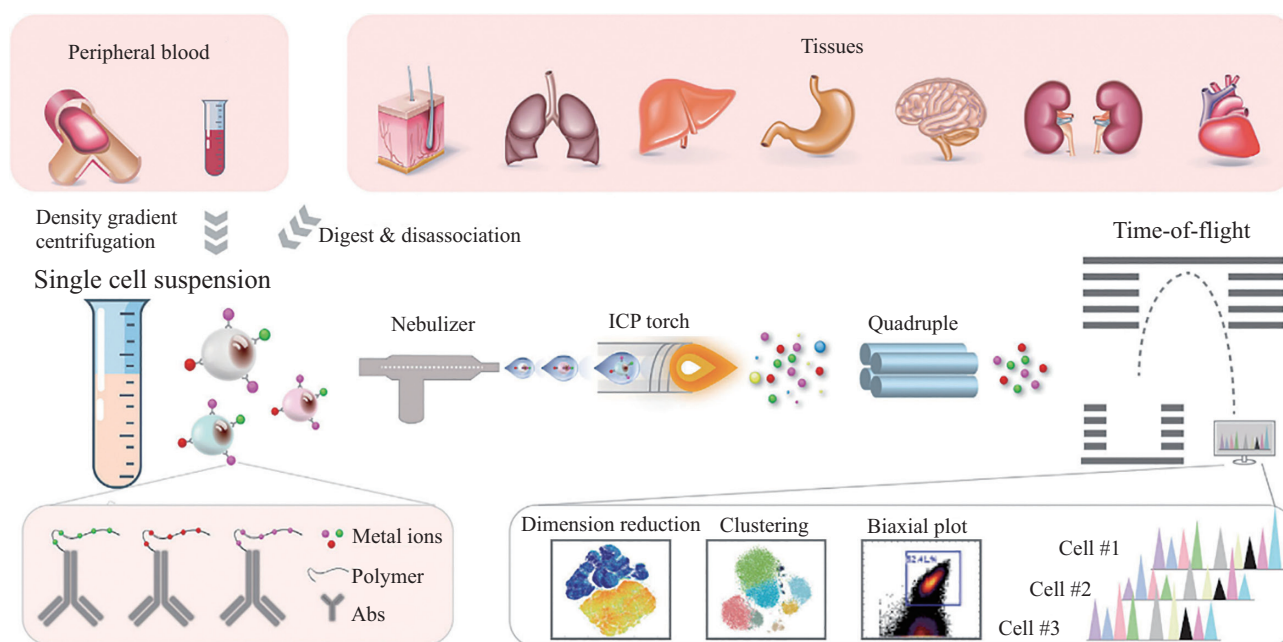


图2 质谱流式细胞术分析概述(复制自参考文献[17], 图片已得到授权)

Fig.2 Overview of mass cytometry analysis (reproduced from reference [17], with permission for the image)

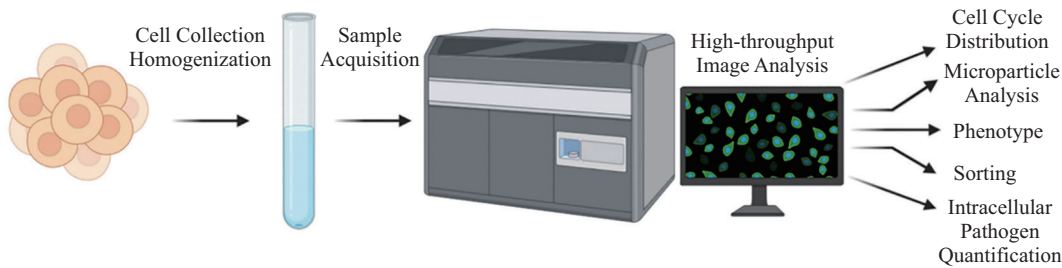


图3 成像流式细胞术的工作流程(复制自参考文献[24], 图片已得到授权)

Fig.3 Workflow of imaging flow cytometry (reproduced from reference [24], with permission for the image)

表1 传统流式与三种高维流式细胞术的主要参数对比

Table 1 Comparison of key parameters between traditional flow cytometry and three types of high-dimensional flow cytometry					
参数 Parameter	传统流式细胞术 Traditional flow cytometry	光谱流式细胞术 Spectral flow cytometry	质谱流式细胞术 Mass cytometry	成像流式细胞术 Imaging flow cytometry	参考文献 References
Labeling	Fluorochrome dyes	Fluorochrome dyes	Metal tags	Fluorochrome dyes	[4,15,25]
Detector	PMT	PMT, APD, SiPM	TOF	CCD, CMOS, PMT	[13,22,26-28]
Number of markers	<18	40+	40+	5-10	[25]
Sensitivity	High	Relatively high	High	Moderate	[15,25,29]
Background fluorescence	High	Low	Very low	Moderate	[15,30-31]
Cell throughput	High	Relatively high	Low	Relatively low	[15,26-27]
Cost	Relatively low	Relatively high	High	Relatively high	[15,24]
Data analysis	Mature software (e.g. FlowJo)	Spectral unmixing algorithm	Mass cytometry data analysis software	Image analysis algorithm	[12,15,23]
Core advantages	Simple operation, excellent weak-signal detection	Strong multicolor capability, autofluorescence identification, reusable spectral library	No spectral spillover, high parameter count, low background	Combines high-throughput flow cytometry with morphological/spatial information from microscopy	[24-26]

胞大小、形状、内部结构及特定标记物分布等详尽的形态与结构特征信息。研究者不仅可借此验证荧光数据的可靠性,还能对异质性细胞群体进行精准表征。图3展示了IFC的核心原理及主要应用场景^[24]。其标准工作流程如下:首先对样本进行采集与均质化处理,制备成以单细胞为主的稳定悬液;随后将细胞悬液注入成像流式细胞仪,使单个细胞被分离并有序排列,同步完成荧光与明场图像的采集。凭借高通量与精细成像的双重优势,IFC为细胞生物学、免疫学及相关交叉学科的前沿研究提供了强有力的技术支撑。

2 高维流式细胞术技术参数对比

基于前述各技术的原理与特点,表1汇总了传统流式细胞术及三种高维流式细胞术的关键技术参数,以直观对比各技术间的核心优势与性能差异,为技术选型提供参考依据。

3 高维流式细胞术在血液学及相关疾病中的应用

3.1 光谱流式细胞术

3.1.1 血液学研究方案设计与优化 光谱流式细胞术通过采集完整的荧光光谱信息,结合高灵敏度检测器及自发荧光提取技术,显著提升了低丰度标志物的信号分辨能力。基于其高参数多指标的检测面板,能够实现深度、全面的免疫表型解析。同时,该技术适用于骨髓穿刺标本、活检样本等细胞数量有限的稀缺样本,弥补了传统流式细胞术在弱信号分辨和微量样本分析方面的不足^[32]。

在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)微小残留病检测方面,Chen等^[33]开发了一套24色全光谱方案,通过FlowJo软件对比正常与异常样本,发现CD96和CD200有望作为AML辅助诊断、预后评估及治疗指导的潜在生物标志物。此外,对于肥大细胞、嗜碱性粒细胞、髓系树突状细胞及浆细

胞样树突状细胞等传统流式难以精确界定的稀有或表型相近的细胞亚群,借助光谱流式细胞术的全光谱信号解析能力,现在都能够实现更为精准的识别与区分。Matthes等^[34]则针对骨髓中造血干细胞及祖细胞群体,设计了一套基于3激光20色的全光谱方案,结合 t 分布邻域嵌入(t -distributed stochastic neighbor embedding, t -SNE)降维分析,有效区分了恶性细胞与正常细胞,在AML微小残留病检测中展现出重要价值。2025年,Zhang等^[35]进一步优化,成功建立了一套基于4激光29色的检测方案。该方案首次将白血病干细胞的评估整合至常规的微小残留病检测单管中,实现了二者同步分析,免除了以往需要额外设置检测管的繁琐流程,同时提供了对血液稀释程度的实时评估功能,有望提升微小残留病检测结果的可靠性与操作流程的简便性。

在免疫表型与细胞亚群分析领域,Hammerich等^[36]设计了一套31色方案,适用于激光器配置有限的全光谱流式仪,可用于人外周血白细胞的免疫监测。Park等^[37]则设计了如图4所示的45色全光谱方案,可在单管中同时解析 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的激活状态、耗竭水平、记忆分化阶段及功能极化特征,从而清晰呈现T细胞记忆反应的复杂表型,实现对人外周血主要细胞亚群更为深入的免疫表型解析。2026年,Hamed等^[38]开发了一套38色方案,能够同时识别血液、脾脏及骨髓中的 $\gamma\delta$ T细胞亚群,并同步解析传统 $\alpha\beta$ T细胞、NK细胞及B细胞等,实现了对血液和淋巴组织的综合性免疫表型分析。

3.1.2 血液相关疾病应用案例 光谱流式细胞术在血液恶性肿瘤的临床研究与免疫治疗评估中展现出广泛应用价值,相关研究主要围绕AML及慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的免疫监测、预后评估与新型疗法验证等方面展开。

在AML领域,WT1作为白血病细胞中关键致癌基因的转录激活因子,成为免疫治疗的重要靶点。Kreutmair等^[39]针对缓解期老年AML患者开展了I/II期临床试验,评估基于WT1蛋白的疫苗治疗效果与安全性。通过全光谱流式细胞术分析发现,该疫苗可通过T细胞浸润骨髓,重塑患者免疫微环境,为WT1疫苗的临床疗效提供初步证据。如图5所示,Yassouf等^[40]利用光谱流式细胞术检测AML不同阶段骨髓系与淋巴群体的动态变化,发现初诊及复发阶段以白血病性 $CD34^+/CD123^+$ 细胞扩增为特征,而

缓解期则以单核细胞及 $CD45^+$ 低表达群体回升为特征。该发现为AML潜在治疗靶点的筛选提供了实验依据。

在CLL及相关免疫治疗方面,Solman等^[41]利用全光谱流式细胞术评估了31名CLL患者及20名健康对照者的24种免疫亚群,以探讨长期使用依鲁替尼对机体免疫系统的影响。此外,Ruckstuhl等^[42]采用26色全光谱流式细胞术方案,辅助评估了靶向酪氨酸激酶样孤儿受体1的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)在难治性CLL、三阴性乳腺癌及非小细胞肺癌患者中的安全性与抗肿瘤活性。该研究首次在同抗原背景下比较了CAR-T疗法对血液恶性肿瘤与实体瘤的疗效差异,为后续跨疾病类型的治疗策略优化提供了重要参考。

3.1.3 小结 近年来,光谱流式细胞术凭借全光谱采集与光谱解混算法,有效突破了传统流式细胞术在荧光信号溢漏及检测通道数量受限的固有瓶颈,使悬浮细胞的高维参数分析成为了可能,在血液学领域展现出了广阔的应用前景^[25,43]。与质谱流式细胞术相比,光谱流式细胞术能够保持细胞完整性,支持目的细胞的分选,且具备检测通量高、周期短等优势,但其可同时检测的标志物数量上限仍不及质谱流式细胞术。与IFC相比,光谱流式细胞术虽具备更强的多指标并行分析能力,但无法获取单细胞的形态学信息、胞内抗原定位的精确空间定位及细胞间相互作用,也难以仅凭借信号强度有效区分细胞碎片、稀有造血原始细胞等。尽管存在上述局限,但光谱流式细胞术凭借其强大的高参数分析能力,已在血液系统疾病的免疫状态监测、潜在治疗靶点筛选及临床疗效评估中发挥着不可替代的重要作用。

3.2 质谱流式细胞术

3.2.1 血液学研究方案设计与优化 质谱流式细胞术在血液学及相关免疫研究中的应用日益广泛,相关研究主要围绕疾病机制解析、信号通路检测及方法学优化等方向展开。

在疾病机制与信号通路解析方面,Fernandez等^[44]建立了21色质谱流式细胞术方案,用于检测外周血单个核细胞在多种细胞因子刺激下的磷酸化信号通路激活状态;2022年,该团队进一步优化设计出了34色全血磷酸化检测方案,实现了对免疫细胞信号响应的高通量、多参数评估^[45]。上述两种方案均

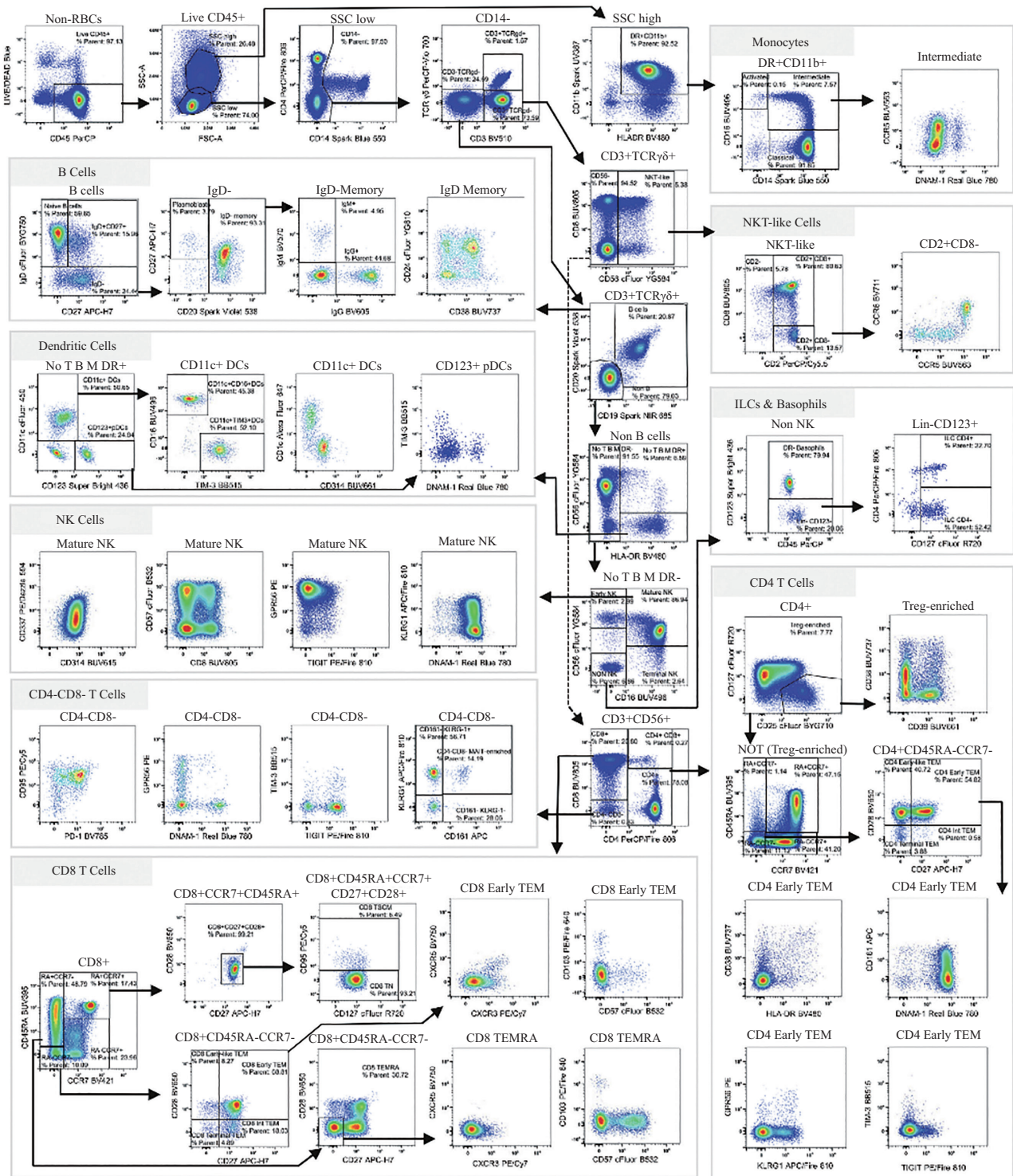


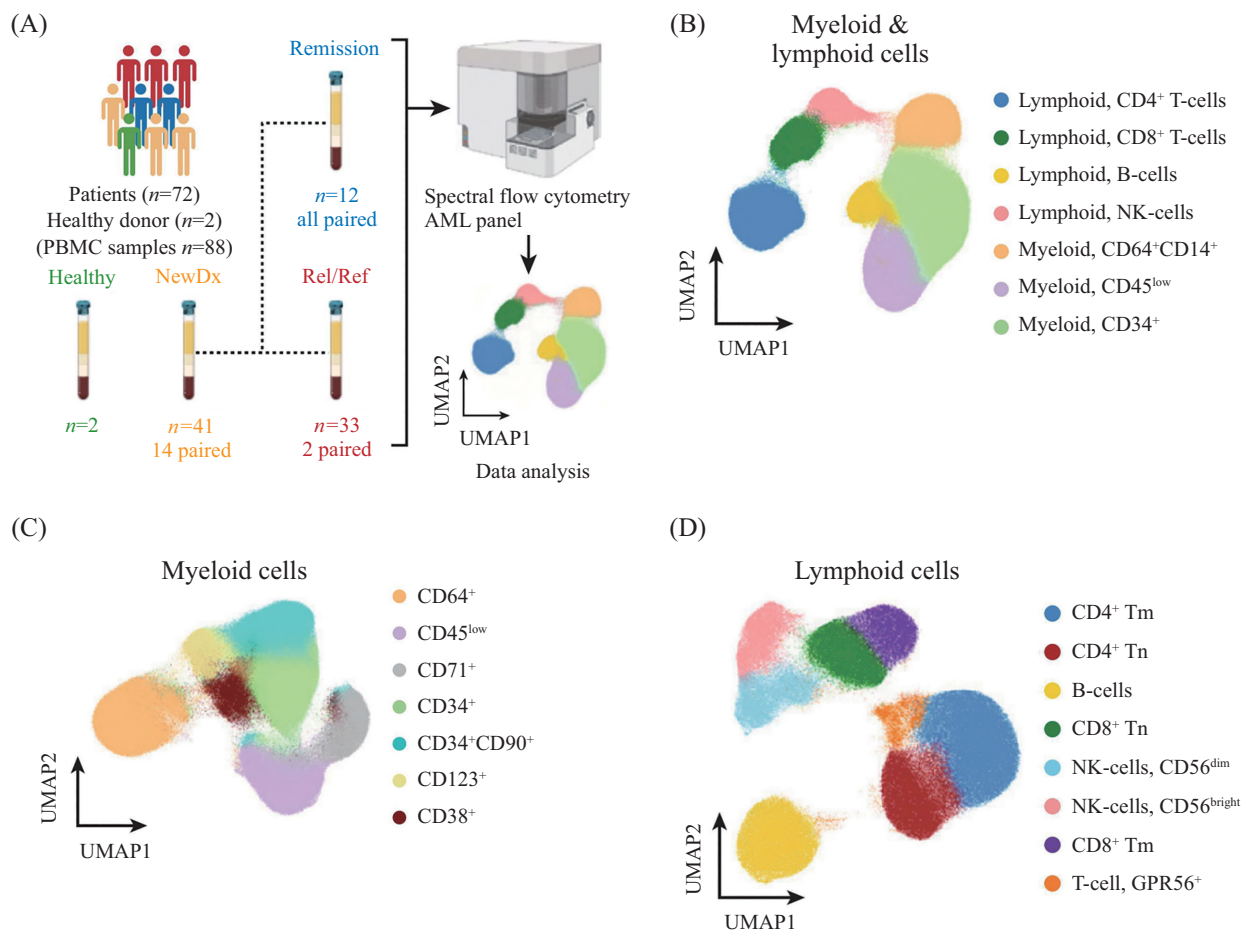
图4 45色全光谱流式细胞术方案分析人类外周血细胞亚群免疫表型(复制自参考文献[37], 图片已得到授权)

Fig.4 Immunophenotypic analysis of human peripheral blood cell subsets using a 45-color full-spectrum flow cytometry panel (reproduced from reference [37], with permission for the image)

适用于免疫功能研究和疾病状态监测。

在方法学探索与体系优化方面, van der Pan等^[46]分别设计了24色光谱流式细胞术方案与33色质谱流式细胞术方案, 用于人外周血先天髓系细胞群体的

性能比较(图6和表2)。结果显示两者结果高度一致, 其中光谱流式细胞术更适用于临床快速检测, 而质谱流式细胞术在高维方案设计上更具灵活性。为降低技术门槛, Iyer等^[47]为具备传统流式经验但质谱流



A: 研究对象外周血单个核细胞样本染色示意图; B: 主要髓系和淋巴系簇的均匀流形逼近与投影(UMAP)非线性降维可视化图; C: 基于图B重新聚类得到的髓系细胞群的均匀流形逼近与投影非线性降维可视化图; D: 基于图B重新聚类得到的淋巴系细胞群的均匀流形逼近与投影非线性降维可视化图。

A: schematic staining diagram of peripheral blood mononuclear cell samples from research subjects; B: UMAP (uniform manifold approximation and projection) plot showing major myeloid and lymphoid clusters; C: UMAP plot of re-clustered myeloid cell populations derived from panel B; D: UMAP plot of re-clustered lymphoid cell populations derived from panel B.

图5 利用光谱流式细胞术检测急性髓系白血病中髓系及淋巴系细胞群标志物的表达(根据参考文献[40]修改)

Fig.5 Detection of myeloid and lymphoid lineage marker expression in acute myeloid leukemia patients via spectral flow cytometry (modified from reference [40])

式细胞术专业知识有限的研究人员制定了系统性使用指南, 内容涵盖实验设计、抗体结合、样本染色、数据采集及预处理(如光谱解混、质控)等关键环节, 有助于研究者高效获取高质量的高维单细胞数据。Smith等^[48]则设计了52色全血质谱流式细胞术方案, 首次将偏远地区社区纳入高参数免疫表型研究。该方案简化了样本制备流程, 在资源有限环境下仍能保证数据质量, 为精准医学在分散资源场景中的推广应用提供了关键方法学基础。

3.2.2 血液相关疾病应用案例 在CAR-T细胞治疗相关研究中, Good等^[49]利用质谱流式细胞术, 对接受CD19-CAR-T治疗的大B细胞淋巴瘤患者的循

环CAR-T细胞进行单细胞蛋白质组学分析, 发现CAR-T细胞输注后第7天出现的CD4⁺Helios⁺ CAR-Treg细胞亚群与疾病进展及较轻的神经毒性相关, 提示该亚群可能同时反映治疗抵抗与较低的毒性风险。Vieira等^[50]则利用质谱流式细胞术对多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者接受CAR-T治疗前后外周血免疫细胞进行纵向监测, 分析主要免疫群体动态变化, 提出CAR-T治疗与宿主免疫的协同作用是推动功能性治愈的关键因素。

在血液肿瘤免疫微环境与预后评估方面, Llaó-Cid等^[51]结合质谱流式细胞术与多组学技术, 系统分析了CLL患者淋巴结、骨髓和外周血中T细胞异质

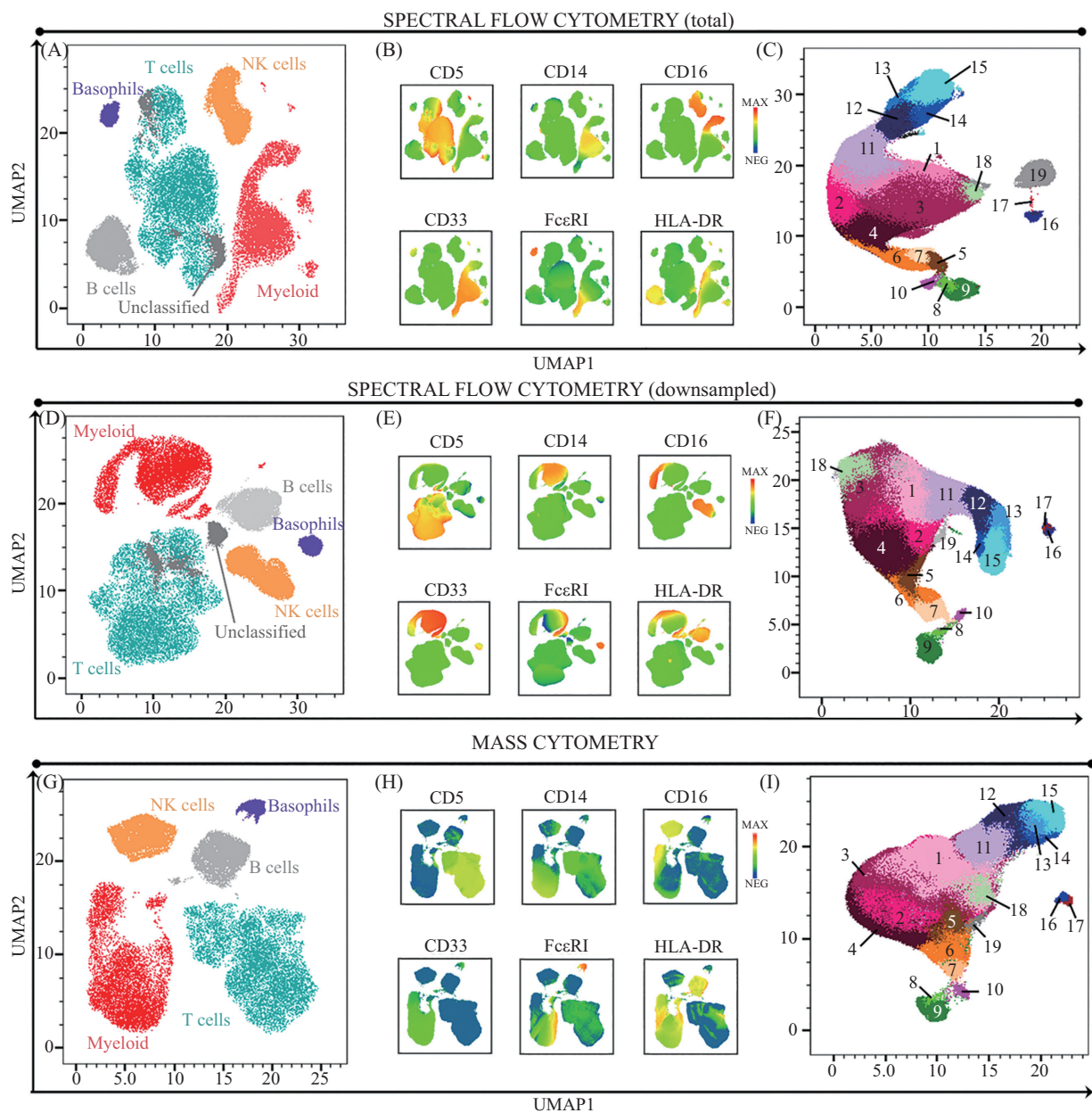


图6 光谱流式细胞术和质谱流式细胞术分析外周血单个核细胞配对样本的高维二维图(复制自参考文献[46], 图片已得到授权)
Fig.6 High-dimensional two-dimensional plots of paired peripheral blood mononuclear cell samples analyzed by spectral flow cytometry and mass cytometry (reproduced from reference [46], with permission for the image)

表2 图6中编号聚类对应的细胞群(修改自参考文献[46])
Table 2 Cell populations corresponding to the numbered clusters in Fig.6
(modified from reference [46])

编号 Number	细胞群 Cell population	编号 Number	细胞群 Cell population	编号 Number	细胞群 Cell population	编号 Number	细胞群 Cell population
1	CD62L ⁻ FcεRI ⁻ cMo	6	CD14 ⁻ CD5 ⁻ CD1c ⁺ myDC	11	iMo	13	HPC (CD34 ⁺)
2	CD62L ⁻ FcεRI ⁺ cMo	7	CD14 ⁻ CD5 ⁺ CD1c ⁺ myDC	12	CD141 ⁺ myDC	14	preDC
3	CD62L ⁺ FcεRI ⁻ cMo	8	Axl ⁺ DC	13	iMo	15	M-MDSC
4	CD62L ⁺ FcεRI ⁺ cMo	9	pDC	14	CD36 ⁺ Slan ⁻ ncMo	19	Unclassified leukocyte
5	CD14 ^{low} CD1c ⁺ myDC	10	CD141 ⁺ myDC	15	CD36 ⁺ Slan ⁺ ncMo		

性,发现了靶向半乳糖凝集素-9的抗体治疗可显著降低TIM3⁺ T细胞比例并延缓疾病进展,为CLL联合免疫治疗提供了新策略。如图7所示,Wu等^[52]利用质谱流式细胞术描绘了AML不同供者群体的免疫细胞图谱,识别出了与不良移植预后相关的特定衰老T细胞亚群,从单细胞水平揭示了供者年龄及白细胞端粒长度(leukocyte telomere length, LTL)影响AML移植结局的潜在免疫机制。Wu等^[53]通过质谱流式细胞术结合高通量测序,对接受有效免疫治疗的再生障碍性贫血患者骨髓样本进行单细胞分辨率解析,结果表明造血功能恢复主要依赖造血祖细胞,且效应T细胞克隆动态与治疗响应密切相关,为精准靶向T细胞克隆的治疗策略提供依据。Shasha等^[54]通过质谱流式细胞术及单细胞多组学技术,对MM患者从诊断至治疗全过程中的CD8⁺ T细胞表型与功能状态进行解析,为理解MM免疫逃逸机制提供新视角。

在骨髓造血微环境研究方面,Severe等^[55]利用质谱流式细胞术的单细胞蛋白质分析技术,系统绘制了稳态及应激条件下小鼠骨髓基质细胞亚群图谱,阐明了各类基质群体在临床相关应激条件下的动态重塑规律,并证实了CD73⁺NGFR⁺基质细胞亚群在极端细胞毒性应激期间可作为微环境的关键组分。针对人类骨髓衰竭疾病,Guo等^[56]整合单细胞测序与质谱流式细胞术等技术,构建了再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)患者骨髓免疫微环境的高维图谱。借助质谱流式细胞术的高通量多蛋白检测优势,该研究在蛋白水平验证了新型KIR⁺CD8⁺调节性T细胞亚群在AA患者骨髓中真实存在;同时揭示初诊重型AA患者骨髓中的造血干/祖细胞数量显著减少,而细胞毒性免疫亚群则呈现异常扩增。上述发现为阐明AA的免疫病理损伤机制提供了直接的蛋白水平实验依据。

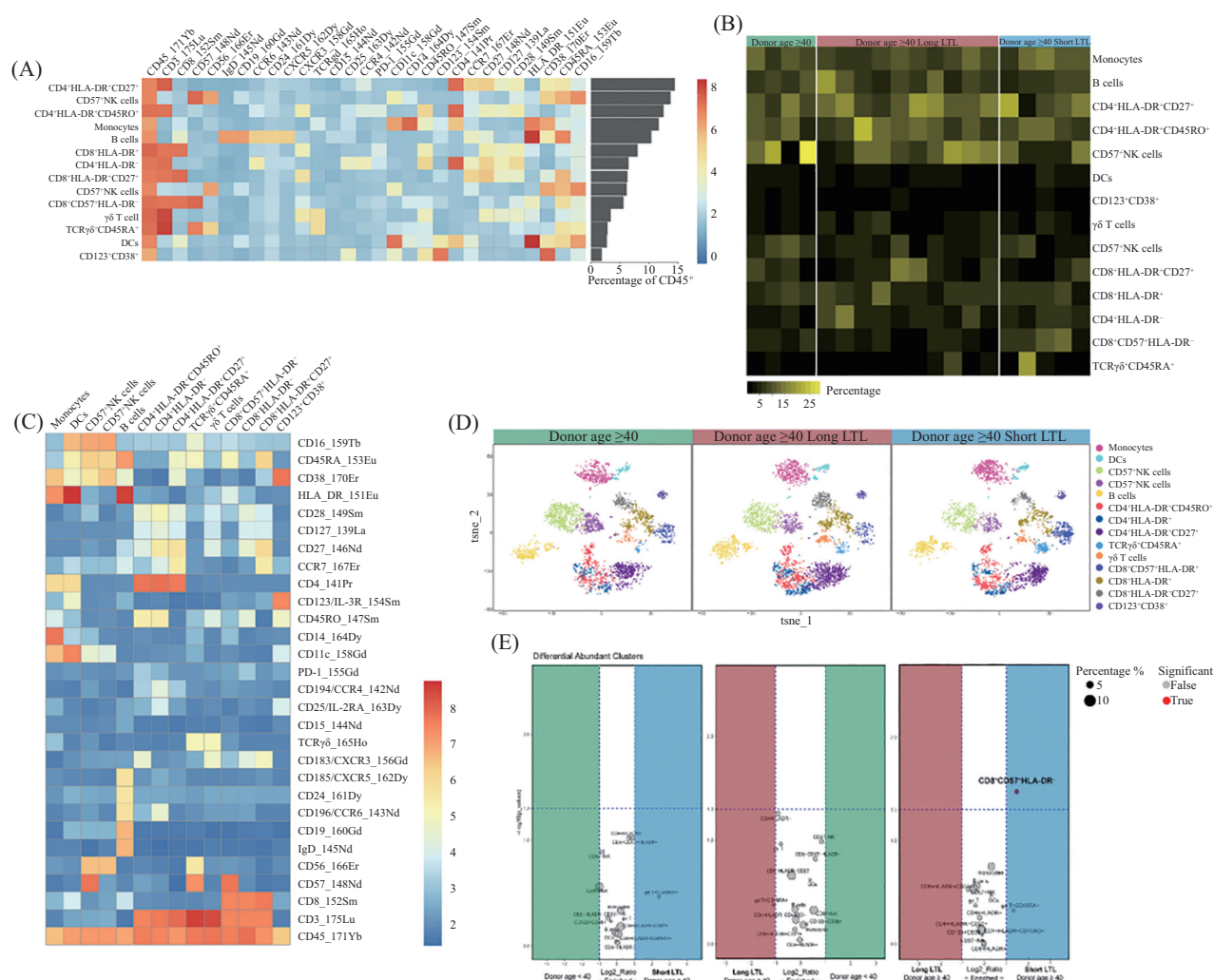
在技术验证与拓展应用方面,Villegas-Valverde等^[57]分别采用传统流式与质谱流式细胞术对MM及非霍奇金淋巴瘤患者单采造血干细胞中的CD45^{dim}/CD34⁺干细胞进行免疫表型分析,验证了两者在细胞计数与分型上的一致性。Lima等^[58]则利用质谱流式细胞术证实了严重脓毒症诱导的中性粒细胞多维异质性,并首次发现在常规抗生素治疗背景下,中性粒细胞亚群动态变化与维生素C疗效存在关联,为脓毒症精准治疗提供了新可能。

3.2.3 小结 质谱流式细胞术是一项具有突破性的单细胞分析技术。与传统流式细胞术相比,其核心创新在于采用金属同位素替代传统荧光染料标记抗体,从原理上消除了荧光光谱重叠的干扰,从而显著提升了单细胞水平的参数检测通量。在技术性能对比方面,相较于光谱流式细胞术,质谱流式细胞术摆脱了荧光素光谱重叠对检测通道的制约,高维分析潜力更具优势;但其代价是检测过程中细胞会被电离破坏,无法实现目的细胞分选,且检测通量较低、试剂成本较高。与IFC相比,质谱流式细胞术仅能获取单细胞蛋白表达丰度,无法关联细胞形态特征与空间表型信息,在白血病原始细胞形态异常识别及细胞聚集状态分析等应用场景中存在短板。综合以上分析,质谱流式细胞术不仅在基础研究中展现出强大的高维分析能力,而且在方法学标准化与适用性拓展方面具备显著优势。其高参数、高分辨率的技术特点,正持续推动研究者对疾病发生机制、治疗响应及预后评估的精准认知。

3.3 成像流式细胞术

3.3.1 血液学研究方案设计与优化 IFC通过与多种分析及人工智能方法的深度融合,在血液学相关研究中不断拓展其应用边界。传统流式细胞术在解析复杂生物系统异质性时,由于缺乏形态学图像信息,可能会将细胞碎片、聚集体或形态异常细胞误判为目的细胞群体,影响结果的准确性与可靠性。而IFC整合了实时图像采集功能,可同步获取细胞表型定量数据与形态学特征,为解决上述问题提供了关键技术路径^[59]。基于这一优势,Tay等^[60]利用9通道成像流式细胞术系统,首次建立了一种可直接可视化并定量检测骨髓中红细胞岛的方法。该方法能够有效区分骨髓样本中游离细胞与巨噬-幼红细胞形成的细胞聚集体,为红细胞造血微环境的原位研究提供了新的分析工具。

在染色体异常检测与微小残留病评估方面,Lam等^[61]发表了一种将IFC、免疫表型分析与荧光原位杂交技术相结合的方法学指南,可快速确定白血病中携带异常染色体的细胞比例,并实现对微小残留病的检测,从而在单细胞水平上完成高通量、自动化的染色体异常分析。在人工智能辅助的形态学分析方面,Poschkamp等^[62]将IFC与卷积神经网络(convolutional neural network, CNN)相结合,建立了可直接在单细胞水平上定量分析全血中微量血小



A: 所有供体组中不同细胞亚群的丰度; B: 各组细胞亚群占比; C: 各细胞亚群标志物表达谱; D: *t*-SNE图展示各组细胞亚群分布; E: 组间细胞亚群丰度差异。

A: abundance of different clusters across all donor groups; B: cluster percentages across groups; C: marker profiles for each cluster; D: *t*-SNE plots showing the distribution of clusters across groups; E: differences in cluster abundance between groups.

图7 采用高维单细胞质谱流式细胞术对不同供体来源的外周血免疫细胞进行分析(复制自参考文献[52], 图片已得到授权)

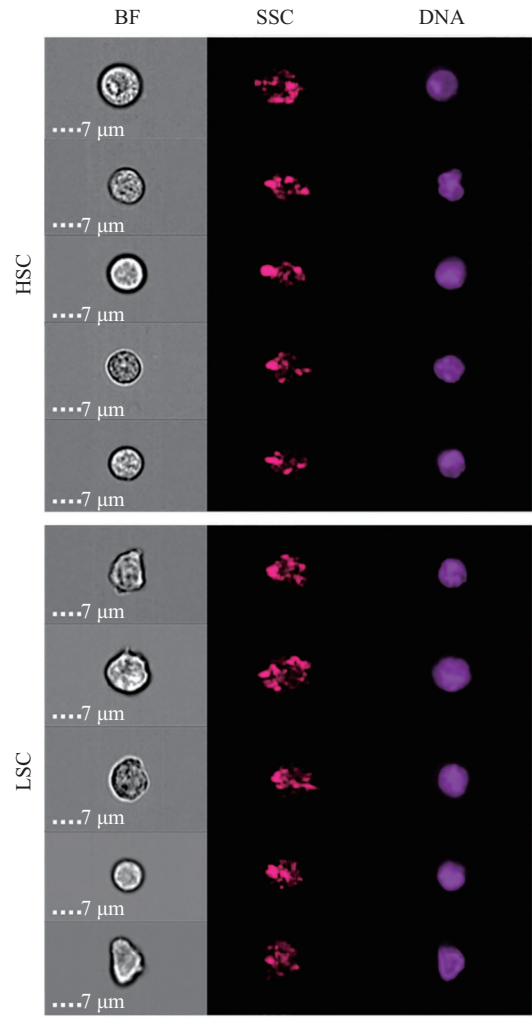
Fig.7 Analysis of peripheral blood immune cells from different donors using high-dimensional single-cell mass cytometry (reproduced from reference [52], with permission for the image)

板聚集体的方法,为血小板相关疾病的精准诊疗提供了新工具。如图8所示,Hybel等^[63]进一步将IFC与CNN相结合,成功以93%的准确率从形态学层面区分AML中的白血病干细胞(leukemic stem cell, LSC)与正常造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC),建立了一种不依赖特定免疫表型、仅基于细胞形态的人工智能驱动型AML监测新策略。

3.3.2 血液相关疾病应用案例 在白血病诊断与微小残留病检测方面, Grimwade等^[64]系统总结了IFC在急性白血病诊断、分型及微小残留病检测中的应用潜力, 为该技术优化临床诊疗流程提供了系统性参考。Rosenberg等^[65]利用传统流式与IFC同步

检测T细胞急性淋巴细胞白血病中原始细胞标志物TdT⁺及TdT⁻亚群,发现了IFC可直接对细胞进行可视化与形态测量,有效避免了TdT⁻细胞被误判为碎片或死亡细胞的现象,显著提升了血液肿瘤诊断的可靠性。

在红细胞生成与微环境研究领域, Li等^[66]借助IFC在骨髓中直接观察并确认了F4/80⁺Epor-Egfp⁺巨噬细胞的存在, 证实了该细胞是体内功能性红系造血岛的核心构建成分, 可能承担部分供铁功能, 为红细胞生成障碍性疾病中该类巨噬细胞的功能研究提供了新思路。Violidaki等^[67]则利用IFC首次系统观察了骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,



HSC: 造血干细胞; LSC: 白血病干细胞; BF: 明场成像; SSC: 侧向散射光; DNA: DNA 荧光染色。

HSC: hematopoietic stem cell; LSC: leukemic stem cell; BF: bright Field; SSC: side scatter; DNA: DNA fluorescent staining.

图8 通过成像流式细胞术检测后的造血干细胞和白血病干细胞代表性图像(复制自参考文献[63], 图片已得到授权)

Fig.8 Representative images of hematopoietic stem cells and leukemic stem cells detected by imaging flow cytometry (reproduced from reference [63], with permission for the image)

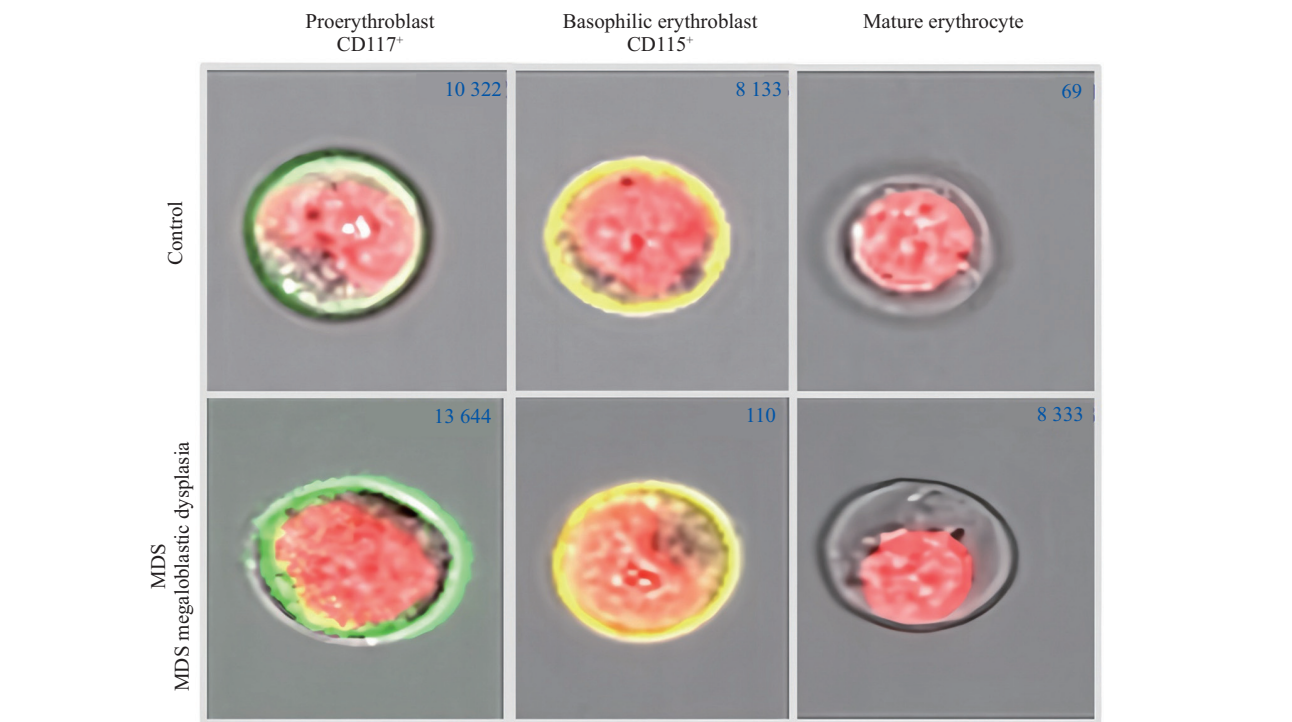
MDS)中红细胞生成异常时的关键形态变化,包括胞质内复杂度增加及非增殖性双核幼红细胞的出现(图9),为理解MDS的病理机制提供了全新视角。

成像流式细胞术兼具单细胞表型定量分析与原位形态学成像的双重功能,在干细胞生物学研究中展现出独特优势。Benam等^[68]利用该优势,首次证实人肺上皮来源的外泌体能够特异性结合造血干细胞并调控其生物学行为。通过同步获取荧光信号与高分辨率形态图像,该研究直观呈现了外泌体与靶细胞相互作用的动态过程,从而揭示了远端器官参与造血微环境调控的全新机制。

在人工智能辅助形态学分析方面,Rosenberg团队^[69]将IFC与CNN相结合,实现了对MDS患者骨髓样

本中异常细胞形态的可视化分析,能够识别传统方法易漏检的双核红细胞,有望提高MDS诊断的精确性。

3.3.3 小结 相较于传统流式细胞术及光谱流式细胞术、质谱流式细胞术两类高维技术,IFC兼具高通量成像与单细胞形态可视化功能,可在获取定量表型数据的同时保留细胞形态学信息。然而,受限于光学通道数量,其可同时检测的标志物数量远低于光谱流式细胞术及质谱流式细胞术。在白血病分型及微小残留病检测等应用场景中,IFC常与前两者形成互补,可有效排除细胞碎片、粘连细胞等所导致的假阳性判读,提升检测结果的准确性。目前,从机制探索到诊断优化,该技术



右上角蓝色字体标注的数值代表细胞面积(μm^2)。
 The values in blue font in the right upper corner represent the cell area (μm^2).

图9 IFC观察到骨髓增生异常综合征患者总体红细胞生成及三个不同阶段的平均红细胞大小(根据参考文献[67]修改)
 Fig.9 Global erythropoiesis and mean erythrocyte size at three distinct developmental stages in MDS patients detected by IFC
 (modified from reference [67])

已在多场景应用中展现出广阔前景。未来,IFC与分子遗传学技术及深度学习算法的深度融合,有望在基础研究与临床应用之间搭建桥梁。

3.4 光谱流式细胞术、质谱流式细胞术与成像流式细胞术的性能对比与应用选择

基于上述文献调研与技术原理分析,表3系统总结了光谱流式细胞术、质谱流式细胞术及成像流式细胞术三种高维流式细胞术在血液学及相关疾病研究中的主要适用场景、性能优势与局限性,旨在为研究者在不同临床及基础研究需求下的技术选型提供直观、实用的参考依据。

总体而言,光谱流式细胞术、质谱流式细胞术与成像流式细胞术三者并非相互替代,而是功能定位各异、优势互补的技术平台。光谱流式细胞术凭借其全光谱信号采集与高效拆混能力,在临床免疫监测、白血病微小残留病检测及多色方案快速部署中展现出突出的实用价值^[70];质谱流式细胞术因金属标签通道数高且无光谱重叠干扰,在信号通路检测、稀有亚群深度解析及多参数方案设计中具有不可替代的优势;成像流式细胞术则通过整合高

通量流式检测与形态学图像采集,在人工智能辅助形态学判别、红系造血岛解析及白血病干细胞与正常干细胞的形态鉴别中发挥独特作用^[71]。在实际应用中,研究者可依据样本属性、研究目标和标志物通量,灵活选取单一技术或联合多平台开展系统分析。

4 总结与展望

流式细胞术作为单细胞分析领域中最通用且高通量的方法之一^[72],在血液病诊断与监测、移植与免疫治疗评估、新药研发及基础研究中均发挥着关键作用。光谱流式细胞术、质谱流式细胞术与成像流式细胞术作为近年来新发展的三种代表性高维流式细胞术,进一步突破了传统流式的技术局限,为深入揭示血液疾病机制、发现新型治疗靶点及实现精准诊疗提供了强有力的支撑。

这三种新兴高维流式细胞术虽均以实现单细胞水平的高参数分析为核心目标,却在技术路径与应用定位上各具特色,形成互补^[32]。三者共同推动了血液学研究从群体平均分析走向单细胞多维刻画

表3 三种高维流式细胞术适用场景、性能优势与局限性总结
Table 3 Summary of applicable scenarios, performance advantages and limitations
of three high-dimensional flow cytometry technologies

评价参数 Evaluation parameters	光谱流式细胞术 Spectral flow cytometry	质谱流式细胞术 Mass cytometry	成像流式细胞术 Imaging flow cytometry
Biomarker detection throughput	Moderate	Highest	Relatively low
Single-cell morphological information	Unavailable	Unavailable	Available; bright-field and fluorescence images can be captured to analyze cell morphology
Viable cell sorting	Available	Unavailable	Limited sorting is supported on partial instruments
Sample consumption	Low	Moderate	Moderate
Cell-loss level	Low	Highest	Moderate
Sample compatibility	Compatible with fresh and cryopreserved samples	Fresh live cells are preferred	Fresh samples perform best; cell morphology tends to be impaired after cryopreservation
Advantageous hematological scenarios	Leukemia immunophenotyping; dynamic monitoring of minimal residual disease; clinical cohort follow-up; mechanistic research requiring single-cell sorting	Hematopoietic immune mapping; deep subpopulation clustering within the bone marrow microenvironment; exploration of hematopoietic cell developmental subsets	Morphological identification of blasts; discrimination of cell aggregates/doublets; intracellular signal localization;
Main limitations	Still interfered by cellular autofluorescence and spectral spillover	Low throughput; long assay duration; unavailable sorting; high barriers for clinical translation	Insufficient capacity for simultaneous multi-marker detection; unsuitable for ultra-high-dimensional phenotypic analysis

的研究范式转变, 鉴于其适用场景存在差异, 研究者需要综合权衡检测参数需求、样本性质、时效要求及下游实验规划等多重因素进行技术选型。

然而, 高维流式细胞术在实际应用中仍面临诸多挑战。就光谱流式细胞术而言, 核心难点包括: ①对于共表达标记物, 仍需要避免使用光谱高度相似的荧光染料, 并严格进行抗体滴定, 以防信号丢失或假阳性^[36]; ②光谱库中参考谱图需要定期更新, 尤其是串联染料的光谱特性可能随时间和批次变化^[73]; ③多色实验中抗体混合物稳定性较差, 需要现配现用并尽快上机检测。质谱流式细胞术则受限于仅具备单个离子检测器, 无法独立调节各通道检测灵敏度, 且检测器寿命较短(通常12~18个月就需要更换)^[16]; 此外, 其要求细胞固定后检测, 无法用于活细胞分选^[17]; 采集速度较慢, 数据分析需要依赖前向和侧向散射光的替代指标, 流程相对复杂^[74]。成像流式细胞术同样存在明显短板: 单位时间处理的细胞数量相对传统流式有限, 数据量庞大、存储要求高, 且依赖特定算法进行数据分析; 目前仍主要应用于科研领域, 尚

未实现临床普及。

展望未来, 高维流式细胞术在血液学及相关疾病研究中的发展将呈现以下几个重要趋势。其一, 多技术融合与平台整合, 将成为突破单技术瓶颈的关键路径, 例如将成像流式细胞术的高内涵形态信息与光谱或质谱流式细胞术的多参数表型数据进行联合分析, 有望实现对细胞功能状态更全面的单细胞综合表征。其二, 人工智能与机器学习算法的深度嵌入, 将贯穿从方案设计、光谱解混、数据降维到异常细胞自动识别的全流程, 尤其是基于深度学习的形态学判别模型, 有望大幅提升微小残留病检测及骨髓病态造血评估的灵敏度与特异性^[67]。其三, 时空维度信息的整合, 如将质谱流式细胞术的时间动态监测与成像流式细胞术的空间定位能力相结合, 将助力研究者从系统生物学层面深入解析肿瘤微环境演变、免疫治疗响应机制及克隆造血演化轨迹。可以预见, 随着硬件性能提升、试剂体系完善及计算生物学工具迭代, 高维流式细胞术将在血液恶性肿瘤精准分型、个体化免疫监测及新型靶向疗

法伴随诊断中发挥日益关键的作用, 并为其在实体瘤及更广泛疾病领域中的转化应用奠定方法论基础。

不仅如此, 随着多组学技术的蓬勃发展, 高维流式细胞术所产出的单细胞数据正逐步与单细胞空间转录组测序等技术融合, 形成多模态联合分析体系。例如Oetjen等^[75]在血液学领域率先建立了健康成人骨髓单细胞多组学参考数据集, 其研究提示, 在复杂造血组织中进行精确细胞分型与功能解析, 仅依赖转录组数据可能在特定免疫细胞的定量分析上存在偏差, 而将质谱流式细胞术与单细胞测序相结合, 通过多组学交叉验证, 可获得更为全面准确的生物学结论。此外, Su等^[76]系统评估了质谱流式细胞术与单细胞RNA测序技术在解析人外周血免疫细胞分型中的一致性与偏差, 同样展现了蛋白质组与转录组信息在血液免疫监控中的互补价值。上述研究表明, 多组学整合策略已成为深度解析免疫系统异质性的重要方法论方向。

此外, 流式细胞术领域正经历一场技术革新。除上述高维技术外, 幽灵流式细胞术不依赖传统分子标记, 通过捕捉细胞整体形态的“幽灵”般独特轮廓, 结合人工智能实现快速识别与分选^[77]。成像流式细胞术与线性阵列点激发技术结合, 实现了高分辨率、高通量及实时图像重建, 可在细胞大小、形状及内部复杂度等方面提供更精准的信息^[78], 有助于更好地区分白血病亚型。光学时间拉伸成像流式细胞术则集成了光学时间拉伸成像、微流控操控及人工智能在线图像处理, 实现了每秒超过100万个细胞的实时检测通量, 空间分辨率达780 nm, 创下目前全球实时细胞检测通量新纪录^[26]。

综上所述, 高维流式细胞术正以多参数、高分辨、高通量、智能化为核心特征持续发展, 在白血病分型、血液肿瘤精准识别及微小残留病监测等场景中不断突破传统技术边界。未来, 进一步与组学、测序及人工智能技术深度融合, 有望为血液学及其他临床疾病的基础研究与临床转化提供更全面的技术支撑, 推动血液疾病从单参数检测向多维度、智能化、临床一体化方向跨越式发展。

参考文献 (References)

[1] Béné M C, Zini G. Research in morphology and flow cytometry is at the heart of hematology [J]. *Haematologica*, 2017, 102(3):

421-422.

- [2] Nolan J P, Condello D. Spectral flow cytometry [M]//*Current Protocols in Cytometry*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013, 27.
- [3] Novo D. A comparison of spectral unmixing to conventional compensation for the calculation of fluorochrome abundances from flow cytometric data [J]. *Cytometry Part A*, 2022, 101(11): 885-891.
- [4] Watson E C R, Baker W, Ahern D, et al. Mass cytometry as a tool in target validation and drug discovery [M]//*Methods in Enzymology*. Cambridge: Academic Press, 2023: 541-574.
- [5] Olsen L R, Leipold M D, Pedersen C B, et al. The anatomy of single cell mass cytometry data [J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(2): 156-172.
- [6] Matsuoka Y. Imaging flow cytometry as a molecular biology tool: from cell morphology to molecular mechanisms [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(19): 9261.
- [7] Wade C G, Steen H B, Stokke T. Spectra of cells in flow cytometry using a vidicon detector [J]. *Cytometry*, 1979, 1(2): 86-90.
- [8] Wade C G, Rhyne R H J, Woodruff W H, et al. Spectra of cells in flow cytometry using a vidicon detector [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1979, 27(6): 1049-1052.
- [9] Gauci M R, Vesey G, Narai J, et al. Observation of single-cell fluorescence spectra in laser flow cytometry [J]. *Cytometry*, 1996, 25(4): 388-393.
- [10] Lawrence W G, Varadi G, Entine G, et al. Enhanced red and near infrared detection in flow cytometry using avalanche photodiodes [J]. *Cytometry Part A*, 2008, 73(8): 767-776.
- [11] Grégori G, Patsek V, Rajwa B, et al. Hyperspectral cytometry at the single-cell level using a 32-channel photodetector [J]. *Cytometry Part A*, 2012, 81(1): 35-44.
- [12] Vorobjev I A, Kussanova A, Barteneva N S. Development of spectral imaging cytometry [M]//*Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2023: 3-22.
- [13] Telford W G. Laser sources for traditional and spectral flow cytometry [M]//*Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2024: 33-6.
- [14] Bandura D R, Baranov V I, Ornatsky O I, et al. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 6813-6822.
- [15] Chattopadhyay P K, Winters A F, Lomas W E, et al. High-parameter single-cell analysis [J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2019, 12(1): 411-430.
- [16] Behbehani G K. Immunophenotyping by mass cytometry [M]//*Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2019: 31-51.
- [17] Zhang T, Warden A R, Li Y, et al. Progress and applications of mass cytometry in sketching immune landscapes [J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2020, 10(6): e206.
- [18] Newell E W, Sigal N, Bendall S C, et al. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8⁺ T cell phenotypes [J]. *Immunity*, 2012, 36(1): 142-152.
- [19] Mingueneau M, Krishnaswamy S, Spitzer M H, et al. Single-cell mass cytometry of TCR signaling: amplification of small initial differences results in low ERK activation in NOD mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America, 2014, 111(46): 16466-16471.
- [20] Horowitz A, Strauss-Albee D M, Leipold M, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(208): 208ra145.
 - [21] Cambier J L, Kay D B, Wheelless L L J. A multidimensional slit-scan flow system [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1979, 27(1): 321-324.
 - [22] Ugawa M, Ota S. Recent technologies on 2D and 3D imaging flow cytometry [J]. *Cells*, 2024, 13(24): 2073.
 - [23] Huang Q, Zhou Z, Lü Q, et al. Imaging flow cytometry: from high-resolution morphological imaging to innovation in high-throughput multidimensional biomedical analysis [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2025, 13: 1580749.
 - [24] Dimitriadis S, Dova L, Kotsianidis I, et al. Imaging flow cytometry: development, present applications, and future challenges [J]. *Methods and Protocols*, 2024, 7(2): 28.
 - [25] Brestoff J R. Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory [J]. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2023, 45(S2): 44-49.
 - [26] Zhou J, Mei L, Yu M, et al. Imaging flow cytometry with a real-time throughput beyond 1,000,000 events per second [J]. *Light: Science & Applications*, 2025, 14(1): 76.
 - [27] Basiji D A, Ortyń W E, Liang L, et al. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry [J]. *Clinical Laboratory Medicine*, 2007, 27(3): 653-670.
 - [28] Voronin D V, Kozlova A A, Verkhovskii R A, et al. Detection of rare objects by flow cytometry: imaging, cell sorting, and deep learning approaches [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2323.
 - [29] Stanley J, Hui H, Erber W, et al. Analysis of human chromosomes by imaging flow cytometry [J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2021, 100(5): 541-553.
 - [30] Godino E, Restrepo Sierra A M, Danelon C. Imaging flow cytometry for high-throughput phenotyping of synthetic cells [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(7): 2015-2028.
 - [31] Blasi T, Hennig H, Summers H D, et al. Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10256.
 - [32] Czechowska K, Bonilla D L, Cotty A, et al. Beyond the limits: how is spectral flow cytometry reshaping the clinical landscape and what is coming next? [J]. *Cells*, 2025, 14(13): 997.
 - [33] Chen M, Fu M, Gong M, et al. Twenty-four-color full spectrum flow cytometry panel for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. *Open Medicine*, 2023, 18(1): 20230745.
 - [34] Matthes T. Phenotypic analysis of hematopoietic stem and progenitor cell populations in acute myeloid leukemia based on spectral flow cytometry, a 20-color panel, and unsupervised learning algorithms [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2847.
 - [35] Zhang Z, Wilhelm M, Sieber I, et al. Development of a 29-color single-tube full spectrum flow cytometry assay for the detection of measurable residual disease and leukemic stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *Cytometry Part A*, 2025, 107(9): 597-613.
 - [36] Hammerich L, Shevchenko Y, Knorr J, et al. Resolving 31 colors on a standard 3-laser full spectrum flow cytometer for immune monitoring of human blood samples [J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2023, 104(5): 367-373.
 - [37] Park L M, Lannigan J, Low Q, et al. OMIP-109: 45-color full spectrum flow cytometry panel for deep immunophenotyping of the major lineages present in human peripheral blood mononuclear cells with emphasis on the T cell memory compartment [J]. *Cytometry Part A*, 2024, 105(11): 807-815.
 - [38] Hamed M, Moreno-Vicencio D, Arsovski D, et al. 38-marker full-spectrum flow cytometry panel for the comprehensive profiling of $\gamma\delta$ T cells in human blood and lymphoid tissues [J]. *European Journal of Immunology*, 2026, 56(3): e70155.
 - [39] Kreutmair S, Pfeifer D, Waterhouse M, et al. First-in-human study of WT1 recombinant protein vaccination in elderly patients with AML in remission: a single-center experience [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2022, 71(12): 2913-2928.
 - [40] Yassouf M Y, Root J L, Desai P N, et al. Comprehensive profiling of AML and T-cell states across disease stages in acute myeloid leukemia using spectral flow cytometry [J]. *Blood Immunology & Cellular Therapy*, 2025, 1(1): 100004.
 - [41] Solman I G, Blum L K, Burger J A, et al. Impact of long-term ibrutinib treatment on circulating immune cells in previously untreated chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2021, 102: 106520.
 - [42] Jaeger-Ruckstuhl C A, Specht J M, Voutsinas J M, et al. Phase I study of ROR1-specific CAR-T cells in advanced hematopoietic and epithelial malignancies [J]. *Clinical Cancer Research*, 2025, 31(3): 503-514.
 - [43] Park L M, Lannigan J, Jaimes M C. OMIP-069: forty-color full spectrum flow cytometry panel for deep immunophenotyping of major cell subsets in human peripheral blood [J]. *Cytometry Part A*, 2020, 97(10): 1044-1051.
 - [44] Fernandez R, Maecker H. Cytokine-stimulated phosphoflow of PBMC using CyTOF mass cytometry [J]. *Bio-Protocol*, 2015, e15(11): e1496.
 - [45] Sigal N, Maecker H T. Mass cytometry assessment of cell phenotypes and signaling states in human whole blood [M]//*Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2022: 113-128.
 - [46] van der Pan K, Khatri I, de Jager A L, et al. Performance of spectral flow cytometry and mass cytometry for the study of innate myeloid cell populations [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1191992.
 - [47] Iyer A, Hamers A A J, Pillai A B. CyTOF® for the masses [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 815828.
 - [48] Smith N J, Cohen M, Tracey L, et al. A mass cytometry-based blood cell phenotyping workflow enabling inclusion of resource-limited and rural sites in immune system studies [J]. *Cytometry Part A*, 2026, 109(3): 210-229.
 - [49] Good Z, Spiegel J Y, Sahaf B, et al. Post-infusion CAR TReg cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy [J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(9): 1860-1871.
 - [50] Vieira Dos Santos J, Melnekoff D T, Aleman A, et al. Long-term remission after cilta-cel in multiple myeloma is linked to diverse T cells and low myeloid suppression [J]. *Blood Advances*, 2026, 10(3): 604-607.
 - [51] Llaó-Cid L, Wong J, Fernandez Botana I, et al. Integrative multi-omics reveals a regulatory and exhausted T-cell landscape in CLL and identifies galectin-9 as an immunotherapy target [J]. *Nature*

- Communications, 2025, 16(1): 7271.
- [52] Wu H W, Yu J, Cao Y, et al. Donor leukocyte telomere length emerges as a prognostic factor for transplantation outcomes [J]. *Innovation*, 2026, 7(3): 101147.
- [53] Wu Z, Gao S, Feng X, et al. Human autoimmunity at single cell resolution in aplastic anemia before and after effective immunotherapy [J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 5048.
- [54] Shasha C, Glass D R, Moelham E, et al. Hallmarks of T-cell exhaustion and antigen experience are absent in multiple myeloma from diagnosis to maintenance therapy [J]. *Blood*, 2025, 145(26): 3113-3123.
- [55] Severe N, Karabacak N M, Gustafsson K, et al. Stress-induced changes in bone marrow stromal cell populations revealed through single-cell protein expression mapping [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 570-583.e577.
- [56] Guo R, Kong J, Tang P, et al. Unbiased single-cell sequencing of hematopoietic and immune cells from aplastic anemia reveals the contributors of hematopoiesis failure and dysfunctional immune regulation [J]. *Advanced Science*, 2024, 11(10): 2304539.
- [57] Villegas-Valverde C A, Bencomo-Hernandez A A, Castillo-Aleman Y M, et al. Application of mass cytometry to characterize hematopoietic stem cells in apheresis products of patients with hematological malignancies [J]. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 2023, 46(S6): S59-S70.
- [58] Lima P D A, Yu C, Hunt M, et al. Mass cytometry reveals complex neutrophil heterogeneity in patients with severe sepsis [J]. *Intensive Care Medicine Experimental*, 2026, 14(1): 72.
- [59] Barteneva N S, Fasler-Kan E, Vorobjev I A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2012, 60(10): 723-733.
- [60] Tay J, Bisht K, McGirr C, et al. Imaging flow cytometry reveals that granulocyte colony-stimulating factor treatment causes loss of erythroblastic islands in the mouse bone marrow [J]. *Experimental Hematology*, 2020, 82: 33-42.
- [61] Lam S J, Hui H Y L, Fuller K A, et al. Assessing chromosomal abnormalities in leukemias by imaging flow cytometry [M]// *Methods in Cell Biology*. Cambridge: Academic Press, 2025: 71-100.
- [62] Poschkamp B, Bekeschus S. Convolutional neuronal network for identifying single-cell-platelet-platelet-aggregates in human whole blood using imaging flow cytometry [J]. *Cytometry Part A*, 2024, 105(5): 356-367.
- [63] Hybel T E, Jensen S H, Rodrigues M A, et al. Imaging flow cytometry and convolutional neural network-based classification enable discrimination of hematopoietic and leukemic stem cells in acute myeloid leukemia [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(12): 6465.
- [64] Grimwade L F, Fuller K A, Erber W N. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia [J]. *Methods*, 2017, 112: 39-45.
- [65] Rosenberg C A, Bill M, Maguire O, et al. Imaging flow cytometry reveals a subset of TdT negative T-ALL blasts with very low forward scatter on conventional flow cytometry [J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2022, 102(2): 107-114.
- [66] Li W, Wang Y, Zhao H, et al. Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages [J]. *Blood*, 2019, 134(5): 480-491.
- [67] Violidaki D V D, Axler O A O, Nilsson L N L, et al. Translation of the morphological hallmarks of dyserythropoiesis to objective morphometric parameters by imaging flow cytometry [J]. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2025, 47(6): 1089-1098.
- [68] Benam S R, Wang X, Maleknia S, et al. Enhanced hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment through human lung exosomal communication [J]. *Molecular Therapy*, 2025, 33(11): 5704-5720.
- [69] Rosenberg C A, Rodrigues M A, Bill M, et al. Comparative analysis of feature-based ML and CNN for binucleated erythroblast quantification in myelodysplastic syndrome patients using imaging flow cytometry data [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 9349.
- [70] Sharma S, Boyer J, Teyton L. A practitioner's view of spectral flow cytometry [J]. *Nature Methods*, 2024, 21(5): 740-743.
- [71] Vorobjev I A, Bekbayev S, Temirgaliyev A, et al. Imaging flow cytometry of multi-nuclearity [M]. *Methods in Molecular Biology*, 2023: 87-101.
- [72] Brummelman J, Haftmann C, Núñez N G, et al. Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(7): 1946-1969.
- [73] Jensen H A, Kim J. iCoreDrop: a robust immune monitoring spectral cytometry assay with six open channels for biomarker flexibility [J]. *Cytometry Part A*, 2023, 103(5): 405-418.
- [74] Astle J M, Huang H. Mass cytometry in hematologic malignancies: research highlights and potential clinical applications [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 704464.
- [75] Oetjen K A, Lindblad K E, Goswami M, et al. Human bone marrow assessment by single-cell RNA sequencing, mass cytometry, and flow cytometry [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(23): 124928.
- [76] Su E Y, Fread K, Goggins S, et al. Direct comparison of mass cytometry and single-cell RNA sequencing of human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Scientific Data*, 2024, 11(1): 559.
- [77] Adachi H, Kawamura Y, Nakagawa K, et al. Use of ghost cytometry to differentiate cells with similar gross morphologic characteristics [J]. *Cytometry Part A*, 2020, 97(4): 415-422.
- [78] Han Y, Zhao J, Chao Z, et al. Imaging flow cytometry using linear array spot excitation [J]. *Device*, 2023, 1(6): 100124.