RDW 均增大,属不均一性大细胞贫血,红细胞巨幼样变。红细胞指标 MCV、MCH、HCHC 的测定是进行形态学分类的依据,过去把贫血分为大细胞、正细胞正色素、小细胞低色素、单纯小细胞 4 个类型,此法忽视了红细胞体积的异质性对指标准确性的影响,不能全面反映红细胞的病理变化。

笔者认为,MCV 及 RDW 测定结合了红细胞形态学分类,可得到较可靠的初步诊断意见,进而做特殊检查可明确诊断。MCV、RDW 对缺铁性贫血与巨幼红细胞性贫血有较好的诊断价值,可作为一种快速、简单、方便、准确的筛选方法。

参考文献

[1] 丛玉隆.今日临床检验学[M].北京:中国科学技术出版社,1997:9.

(收稿日期:2010-12-16)

·经验交流·

外周血淋巴细胞培养及染色体制备的几点体会

马　强,刘青松,蔡　燕,邢　艳,张国元△
(川北医学院附属医院检验科,四川南充 637000)

摘　要:目的　总结该室外周血淋巴细胞培养及染色体制备的成功经验,供同行参考与借鉴。**方法**　采用外周血淋巴细胞培养基接种外周全血,按照常规方法制作染色体标本,进行镜检。**结果**　该室培养的淋巴细胞数量稳定,染色体核型质量佳。**结论**　该室制作的染色体标本质量能满足临床染色体核型分析需要。

关键词:染色体;　外周血;　淋巴细胞
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.061　　**文献标识码:**B　　**文章编号:**1673-4130(2011)14-1641-02

染色体检查作为干预出生缺陷、提高人口素质的一个重要内容和措施,对优生优育工作有着重大意义[1]。然而,染色体制备过程缺乏有效的质量控制,经验在染色体标本制备过程中占有重要的地位。为了获得良好的制片,在笔者及同事的摸索下,本室制作的染色体标本质量稳定,基本满足临床分析需要。笔者就这一过程中的要点与大家分享,以供同行参考。

1　淋巴细胞培养

1.1　外周血采集　一般情况下,在采集外周血时,采用 5 mL 空针吸取 0.5 mL 左右无菌肝素作为抗凝剂,再采集患者外周静脉血。然而,在当今复杂的医疗环境下,这样的操作可能会给患者带来不符合操作规范的感觉。为了避免不必要的医疗纠纷,本室采用动脉血气针(BD 公司生产)抽取 2～3 mL 外周静脉血,备用。在操作过程中要始终保持无菌观念,用碘酒和乙醇消毒皮肤,自肘静脉采血,然后要把注射器内的血液充分轻轻混匀,以防止血液凝固,影响细胞培养质量[2]。

1.2　接种　培养基的质量在影响染色体质量方面最为关键,从营养不良的培养基中获得的细胞所制备的染色体质量差,不利于染色体核型分析。本室采用湖南湘雅基因技术有限公司生产的成品外周血淋巴细胞培养基(5 mL),只需将采集的外周血接种适量在培养基中,摇匀后置入 CO_2 孵箱中培养即可。接种时,若血液过少,获得的淋巴细胞少;而接种过多,淋巴细胞增殖不良,染色体稀少。经过摸索,发现成年人接种血气针采集的血液 20～25 滴为宜,4 岁以下儿童接种 15～20 滴为宜,新生儿则只需 8～10 滴。

1.3　细胞培养　细胞培养阶段也是极为关键的一步,细胞的旺盛生长与培养时间、温度、CO_2 浓度等条件。

1.3.1　培养时间　经过试验,分别取培养 24、(48±2)、(72±2)、(96±2)h 的培养物分离淋巴细胞,制片,核型分析后发现:培养 24 h 者几乎见不到分裂象;培养(48±2)h 者,每张制片上可见中期分裂象小于 10 个,且染色体质量差;培养(72±2)h 者,每张制片上分裂象大于 200 个,染色体质量佳;而培养 96 h 者,其质量与培养(48±2)h 者相差无几。因此,本室培养细胞的时间控制在 72 h 左右,制作出的染色体核型佳,有利于分析。

1.3.2　培养温度与气体　淋巴细胞培养的适宜温度为(36.5±0.5)℃,偏离这一温度范围,细胞的正常代谢会受到影响,甚至死亡。如果温度高于 37 ℃,细胞的生长速度减慢;如果温度高于 40 ℃,细胞受损,超过 43 ℃,则导致细胞死亡。气体是人体细胞培养生存必需条件之一,所需气体主要有 O_2、CO_2。CO_2 既是细胞代谢产物,也是细胞生长繁殖所需成分,它在细胞培养中的主要作用在于维持培养基的 pH 值。大多数细胞的适宜 pH 为 7.2～7.4,培养基的 pH 值也应调整到 7.2～7.4,偏离这一范围对细胞培养将产生有害的影响。偏酸性时细胞发育不良,偏碱性时细胞会出现轻度固缩[3]。培养箱的温度和 CO_2 浓度应严格控制在(37±0.5)℃、5%以获得良好的中期分裂象。

2　细胞收获

2.1　秋水仙素与作用时间　秋水仙素作为细胞培养中的纺锤体阻断剂,可使分裂象细胞停留在分裂中期而获得大量分裂中期染色体以便于核型分析。加入秋水仙素的剂量、作用时间与处于分裂中期细胞数量、染色体长短密切相关。加入的秋水仙素过量、作用时间过长,染色体浓缩,不利于分析;若加入的秋水仙素量不足、作用时间过短,则染色体细长或无染色体,同样不利于核型分析。只有适量的秋水仙素与适量的作用时间,才能获得较好的分裂象。本室加入秋水仙素使最终浓度为0.025%,作用 1～1.5 h 可获得数量多、浓缩程度适中的染色体。

2.2　离心力　将培养物收集到 15 mL 的离心管中,通过离心获得需要的细胞。整个过程中,离心力的大小很关键。离心力过大会导致细胞之间粘连过紧,低渗时细胞不能被充分混匀,影响低渗效果。这一步本室选择 1 900 r/min 离心 10 min。而低渗过后预固定与固定过程中,去除固定液时由于细胞少,过小的离心力不能将细胞充分沉淀。为了尽可能的获得多的细胞,本室采用 2 500～3 000 r/min 离心 10 min。此外,在去除上清液的时候不要将上清液吸尽,以免造成细胞丢失。

2.3　低渗　低渗的目的是让水分进入细胞,使细胞肿胀、破裂,是染色体制备过程中的关键环节之一。低渗液渗透压过

△　通讯作者,E-mail:zhangguoyuan9826@sina.com。

低、低渗时间过长会使核膜破裂，染色体提前释放，这不仅会使分裂中期细胞减少，散在的染色体也会在滴片过程中随机分布在载玻片上，影响其他细胞的染色体计数，降低制片质量；低渗时间过短，一部分细胞的细胞膜未破裂，导致染色体释放障碍，同样不利于核型分析。本室采用常规的 0.075 mol/L KCl 溶液 8 mL，低渗(30±5)min，可获得足够数量的分裂中期细胞。

3　固　　定

收集细胞过程中加入固定剂的目的是维持染色体的形态。一般实验室使用的都是按甲醇∶冰乙酸＝3∶1 比例配制的混合液。一方面，固定剂可以使细胞脱水、蛋白质变性而使染色体变得粗大并适中；另一方面，有机溶液可以让红细胞破裂，通过离心可以获得比较纯净的淋巴细胞。固定液需新鲜配制，主要是由于固定液所含的水分和固定效果有关。另外，可以适当增加冰乙酸的比例来达到良好的效果[4]。

4　制片与烤片

4.1　细胞悬液配制　经过低渗、预固定、固定，即获得淋巴细胞。此时的细胞非常脆弱，在配制细胞悬液时要轻轻地吹打混匀，吹打方式或者力量不当，都会使核膜破裂，造成染色体释放。此外，细胞悬液的浊度也要适中，悬液浊度太小，制片后载玻片上细胞数量少；浊度太大也不利于染色体分散，染色体交叉，均不利于分析。

4.2　滴片　滴片质量的好坏也是染色体制作的关键步骤之一。在制片时，载玻片的清洁度将直接影响细胞的贴附能力。因此，在制片前，载玻片要经泡酸处理，以清除载玻片上的阴阳离子与杂质。适当的滴片高度也是获得高质量染色体的必然要求。高度过高，染色体分散范围过大，甚至造成染色体丢失；高度过低，则染色体分散不良。经过探索，本室滴片的高度保持在 8～15 cm，能获得比较好的分裂象。

4.3　烤片　烤片温度的高低和时间的长短会影响显带标本的质量，掌握好适宜的烤片温度和时间，才能制备高质量的显带标本[5]。烤片温度过高、时间过长，胰酶对标本的消化时间也随之增加，这既影响工作效率，也影响标本的显带质量，使显带达不到最佳效果。烤片温度过低、时间过短，标本的老化程度不够，不能很好地把握胰酶消化的时间，导致消化不足或过度。所以，适当的烤片时间和温度也是获得高质量染色体的必然要求。本室采用 72 ℃烤片 1.5～2 h，可获得质量优良的标本。

5　消化与染色

5.1　消化　G 显带标本是临床上运用最多的显带技术。无论细胞培养、制片、烤片过程做得多么完美，如果没有很好地把握消化与染色过程，也不能获得显带清晰的染色体。消化过程是去除染色体上的蛋白质(包括组蛋白和非组蛋白)而获得良好的显带标本，通常用的消化酶为 0.025％的胰蛋白酶。然而，消化时间根据胰酶的浓度、质量不同而定，不同的实验室消化时间不一，即使同一实验室不同时间消化所需的时间也不同。这就要求实验人员在每次批量消化之前都要进行条件摸索，以获得最佳的实验条件。

5.2　染色　G 显带用的染液为姬母萨染液，既可以自己配制，也可以购买商品化的试剂。染色体制作本身是一个受多因素的影响过程，染液的质量也会影响染色体的着色。本室购买的湖南湘雅基因技术有限公司的商品化的姬姆萨染液，具有方便、质量稳定的优点。由于放置过久的姬姆萨染液有效成分会下沉，用之前需摇匀，才能获得质量良好的制片。另外，姬姆萨染液对稀释液的 pH 值也有一定的要求，本室采用 pH7.4 的 PBS 作为稀释液，即可获得清晰的染色体图像。

目前，染色体制作过程没有统一的质量控制，试剂生产厂家多，且质量也参差不齐，各实验室制作的染色体质量与实验环境、试剂质量、人员素质均有很大的关系。为了尽可能的获得稳定的染色体标本，各实验室应该参考其他实验室的成功经验，根据自己实验室条件进行摸索，以获得质量尽可能高的染色体标本。

参考文献

[1]　朱丽萍，施东华. 出生缺陷与产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志，2002，10(1)：12-15.

[2]　曹海涛. 染色体外周血淋巴细胞培养中的几点体会[J]. 现代中西医结合杂志，2007，16(30)：4485.

[3]　董烁，谢振兴. 浅谈人体外周血淋巴细胞染色体的制备[J]. 食品工程，2008(2)：25-27.

[4]　慕明涛，霍满鹏，蒲力群，等. 人外周血染色体标本制备失败的影响因素分析[J]. 延安大学学报：医学科学版，2007，5(4)：3-4.

[5]　赵小平，余红，黄燕，等. 烤片对染色体 G 显带标本质量的影响分析[J]. 现代医药卫生，2009，25(3)：393.

(收稿日期：2011-01-27)

· 经验交流 ·

白细胞计数正常的脑脊液中检出肿瘤细胞病例回顾性分析

万均成，文　芳，肖　玲

(武汉大学人民医院神经精神病研究所　430060)

摘　要：目的　回顾并探讨白细胞计数正常的脑脊液(CSF)在分类计数中检出肿瘤细胞及其对脑膜癌的诊断价值。**方法**　用血球计数板计数 CSF 中的白细胞数，再用玻片离心法收集细胞，瑞-姬染色，镜检。**结果**　9 例患者 CSF 白细胞计数均小于 10 个/微升。分类计数单核细胞比例超过 70％者有 6 例；淋巴细胞比例低于 30％者有 6 例；中性粒细胞 0％～8％；可见转化型淋巴细胞，所有病例均可见肿瘤细胞。发现肿瘤细胞的 9 例患者中有 8 例找到了原发灶。**结论**　检验者对白细胞计数小于 10 个/微升的 CSF 要足够重视，不能免去分类环节，通过观察全片，部分患者可找到具有诊断价值的细胞，特别是具有确诊价值的肿瘤细胞。

关键词：脑脊髓液；　细胞系，肿瘤；　细胞计数；　脑膜癌病；　脑脊液细胞学

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.062　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1673-4130(2011)14-1642-02

随着脑脊液(CSF)细胞玻片离心法的不断推广应用，CSF 细胞学检查对神经系统疾病诊断的帮助越来越大，特别是对中枢神经系统感染性疾病和脑膜癌的诊断具有其他检查不可取代的优势[1-3]。在临床检验学教材中把白细胞计数小于 10 个/