

• 论 著 •

探讨预固定对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果的影响

黄丽琼¹, 肖辉建^{2△}, 王秋菊²

(1. 龙岩人民医院检验科, 福建龙岩 364000; 2. 解放军第 180 医院检验科, 福建泉州 362000)

摘要:目的 探讨预固定对中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)的阳性率和积分产生的影响。方法 随机抽取 182 例来某三甲综合医院血液科住院患者的新鲜静脉血, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)真空管抗凝, 制备 3 份血涂片, 第 1 份(A)在 1 h 内进行 NAP 染色, 第 2 份(B)预先进行固定, 1 d 后进行 NAP 染色, 第 3 份(C)不做任何处理, 1 d 后进行 NAP 染色; 同时在其做骨穿时取其新鲜末梢血, 制备血涂片, 在 1 h 内进行 NAP 染色; 将上述血涂片用 NAP 染色液进行 NAP 细胞组化染色, 用显微镜在油镜视野下观察 100 个中性杆状、分叶核粒细胞, 以阳性率和积分记录其检测结果。结果 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片 A 的 NAP 阳性率和积分与新鲜末梢血相比差异无统计学意义($P>0.05$); EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片 B 的 NAP 阳性率和积分与新鲜末梢血相比略低, 但差异仍无统计学意义($P>0.05$); EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片 C 的 NAP 阳性率和积分与新鲜末梢血相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 经过预固定的 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片放置 1 d 后, 其 NAP 染色的结果依然可靠, 不经过固定的 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片放置 1 d 后, 其 NAP 染色的结果显著降低。

关键词:中性粒细胞碱性磷酸酶; 预固定; 影响

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)08-1064-03

Introduction to the influence of fixed in advance of NAP dyeing

HUANG Liqiong¹, XIAO Huijian^{2△}, WANG Qiujun²

(1. Department of Clinical Laboratory, Longyan People's Hospital, Longyan, Fujian 364000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, PLA 180th Hospital, Quanzhou, Fujian 362000, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of fixed in advance on the positive rate and integral of neutrophilic alkaline phosphatase (NAP) dyeing. **Methods** Totally 182 cases of fresh venous blood from inpatients in the top three hospital department of hematology were randomly selected and anticoagulated in the EDTA-K₂ vacuum tube. Three blood smears from which were prepared as follows: the first blood smear (Named A) NAP dyeing completed within an hour; the second one (Named B) were fixed in advance and NAP dyeing after one day; the third one (Named C) didn't do any processing and NAP dyeing after one day. At the same time, the blood samples were taken from the fresh blood, and the blood smears were prepared and stained with NAP in an hour. NAP dyeing were performed by NAP dyeing for the blood smears, and 100 neutral rods, nucleus granulocyte were observed under microscope in the oil mirror vision, the test results record by positive rate and integral. **Results** No significant difference of NAP positive rate and integral was found in EDTA-K₂ anticoagulation venous blood smear A when compared with fresh peripheral blood ($P>0.05$). The NAP positive rate and integral of EDTA-K₂ anticoagulation venous blood smear B was slightly lower than that from fresh peripheral blood, but no significant difference was found ($P>0.05$). However, the NAP positive rate and integral in EDTA-K₂ anticoagulant venous blood smear C has a significant difference from fresh peripheral blood ($P<0.05$). **Conclusion** The NAP dyeing results of EDTA-K₂ anticoagulation venous blood smear fixed and placed one days are still reliable, while the NAP dyeing results was significantly reduced in the unfixed EDTA-K₂ anticoagulation venous blood smear placed after one day.

Key words: NAP; fixed in advance; influence

中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)是一种细胞内水解酶,它在 pH=9.2~9.8 时,将底物 β -甘油磷酸钠水解,产生磷酸钠,磷酸钠与钙离子发生反应,形成不溶性磷酸钙,再与硝酸钴发生反应,形成磷酸钴,最后与硫化铵发生反应,形成不溶性棕色硫化钴沉淀,定位于酶活性之处^[1]。测定 NAP 活性对于某些血液病的诊断、鉴别诊断和疗效观察有重要的参考价值^[2]。据报道,抗凝剂^[3]、试剂的 pH、标本保存温度与时间、温浴时间^[4]等均为影响 NAP 染色结果的重要因素。由于 NAP 染色时间较长,而本科室存在临近下班时间或班外时间送检 NAP 检查的实际情况,为使实验结果客观、准确,笔者对可能影响 NAP 细胞组化染色测定结果的抗凝剂使用、标本保存的时间、预先固定等因素进行了实验观察。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2015 年 5 月至 2016 年 3 月龙岩人民医院血

液科住院患者 182 例,男 112 例,女 70 例,年龄 20~75 岁;其中慢性髓细胞白血病患者 110 例,细菌性感染患者 30 例,真性红细胞增多症的患者 28 例,血小板增多症的患者 14 例。抽取患者的新鲜静脉血,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)真空管抗凝,制备 A、B、C 3 份血涂片, A 在 1 h 内进行 NAP 染色, B 在 1 h 内预先进行固定, 1 d 后进行 NAP 染色, C 不做任何处理, 1 d 后进行 NAP 染色;骨穿同时取新鲜末梢血,制备血涂片,在 1 h 内进行 NAP 染色并计算其阳性率和积分。

1.2 试剂与设备 试剂为珠海贝索生物技术有限公司生产的 NAP 染色液,包含:(1)固定剂(A液);(2)偶氮溶液(B液);(3)亚硝酸钠溶液(C液);(4)磷酸萘酚 AS-BI 溶液(D液);(5)核固红溶液(E液)。均在有效期内使用,操作按其说明书进行。光学显微镜:Olympus 公司,型号 CX21。

1.3 标本染色及积分判定 将新鲜末梢血及 EDTA-K₂ 真空

管抗凝血涂片 A 在 1 h 内按试剂说明书进行 NAP 染色;EDTA-K₂ 真空管抗凝血涂片 B 用试剂固定液 A 液先行固定,24 h 后按试剂说明书进行 NAP 染色;EDTA-K₂ 真空管抗凝血涂片 C 不做任何处理于 24 h 后按试剂说明书进行 NAP 染色。阳性率:油镜下连续观察 100 个中性粒细胞(包括中性杆状核和分叶核粒细胞),记录阳性反应细胞所占百分率,即为阳性率,并对每个阳性反应细胞反应的强度进行-/+~++++的分级。一:细胞质内无阳性颗粒;+:细胞质内有少量阳性颗粒,约占细胞质面积 1/4;++:细胞质内有中等数量阳性颗粒,约占细胞质面积 1/2;+++ :细胞质内有大量颗粒,有少量间隙,约占细胞质面积 3/4;++++:细胞质内充满颗粒,没有间隙^[5]。各级所占百分率乘以级数,即为积分值。

1.4 统计学处理 使用 SPSS22.0 统计软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组标本在不同疾病中的 NAP 阳性率 各组疾病 EDTA-K₂ 抗凝血涂片 A、B 分别与新鲜末梢血的 NAP 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),各组疾病 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片 C 与新鲜末梢血的 NAP 阳性率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组标本在不同疾病中的 NAP 阳性率($\bar{x} \pm s, \%$)				
标本类型	慢性髓细胞 白血病	细菌感染	真性红细胞 增多症	血小板 增多症
新鲜末梢血	6.8±2.1	94.7±4.5	73.8±13.6	67.8±14.2
血涂片 A	6.7±1.9	94.0±3.9	73.0±12.5	67.5±14.0
血涂片 B	6.5±2.3	93.8±3.6	72.2±11.9	66.8±13.7
血涂片 C	2.8±0.8*	48.7±6.9*	33.8±8.5*	31.2±7.5*

注:与新鲜末梢血比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 4 组标本在不同疾病中的 NAP 积分 各组疾病 EDTA-K₂ 抗凝血涂片 A、B 分别与新鲜末梢血的 NAP 积分差异无统计学意义($P > 0.05$),各组疾病 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片 C 与新鲜末梢血的 NAP 阳性率差异具有统计意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组标本在不同疾病中的 NAP 积分($\bar{x} \pm s, 分$)				
标本类型	慢性髓细胞 白血病	细菌感染	真性红细胞 增多症	血小板 增多症
新鲜末梢血	8.2±2.4	234.9±46.4	146.3±23.5	115.6±25.1
血涂片 A	8.0±2.1	232.5±45.8	145.8±23.1	115.1±24.9
血涂片 B	7.9±2.5	231.3±45.5	145.1±22.9	114.6±24.2
血涂片 C	3.2±0.9*	112.5±20.7*	66.3±13.4*	58.1±16.8*

注:与新鲜末梢血比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 EDTA-K₂ 抗凝血涂片未做任何处理放置 1 d 后进行 NAP 染色与新鲜末梢血比较 抗凝血涂片未做任何处理于 1 d 后进行 NAP 染色(血涂片 C)与新鲜末梢血的效果比较,可见放置 1 d 后中性粒细胞大部分退化,细胞边缘不整齐,形态模糊不清,细胞质内阳性颗粒明显减少,着色不均匀,严重影响 NAP 阳性率和积分的判断。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

中性粒细胞里含有多种胞质颗粒和小泡,它们在抵御病原

微生物中起着重要的作用。NAP 就是存在于这些胞质颗粒和小泡中,以碱性磷酸酶(ALP)阳性膜包颗粒的形式存在于中性粒细胞胞质内,属于膜蛋白中的一种,经酶羧基末端的磷脂酰肌酶嵌于膜的双脂质层^[6]。细胞内富含 NAP 的囊泡最早是在 1979 年由 Rustin 等^[7]通过组织化学染色的方法观察到的,随后被 Smith 等^[8]从中性粒细胞浆膜中分离出来。

目前国内常用 Ka-plow 偶氮偶联法^[9],其原理为成熟中性粒细胞 NAP 在 pH=9.6 左右的碱性环境下,水解底物磷酸萘酚,生成的萘酚与重氮盐偶联生成不溶性的有色沉淀,定位于细胞酶活性所在之处。其阳性反应为胞质中出现灰色到棕黑色颗粒,反应强度分为 5 级,反应结果以阳性反应细胞的百分率和积分值来表示,据此可反应 NAP 的活性^[10]。

多年来,由于各实验室所用的固定液浓度和固定时间不统一,所用缓冲液及孵育时间不同,因此参考值变化较大,各实验室之间结果差异较大^[11]。本实验新鲜末梢血与 EDTA-K₂ 抗凝血 1 h 内染色 NAP 的阳性率和积分进行了比较,新鲜的抗凝血和新鲜末梢血的 NAP 阳性率和积分差异没有统计学意义($P > 0.05$);国内外报道的大多是末梢血标本,基于 EDTA-K₂ 真空抗凝管的广泛普及和使用,而沈亚文等^[12]报道可以利用 EDTA-K₂ 抗凝血替代新鲜血液标本进行 NAP 染色。说明 EDTA-K₂ 抗凝血对本实验的结果比较无影响。

各医院科室中存在临近下班时间或班外时间送检 NAP 染色的实际情况,EDTA-K₂ 抗凝血可以替代新鲜末梢血液标本进行 NAP 染色,但是对 EDTA-K₂ 抗凝血标本的放置时间对染色结果的影响未做进一步研究,特设定了 EDTA-K₂ 抗凝血 1 h 内染色与 EDTA-K₂ 抗凝血 1 h 内预先固定及不做任何处理于 1 d 后染色 NAP 的阳性率和积分进行了比较,结果显示预固定后的抗凝血涂片与 EDTA-K₂ 抗凝血 1 h 内染色 NAP 的阳性率和积分差异无统计学意义($P > 0.05$);而没有经过预固定的抗凝血涂片与 EDTA-K₂ 抗凝血 1 h 内染色 NAP 的阳性率和积分的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。NAP 染色需要用新鲜标本,因为放置过久,会导致 NAP 活性降低,并引起中性粒细胞溶解,NAP 颗粒退化^[13],不易着色。而固定可以终止细胞中的酶解反应和其他代谢作用,保持细胞原有的结构和状态,故经过预固定的 EDTA-K₂ 抗凝静脉血涂片放置 1 d 后,其 NAP 染色的结果依然可靠。所以基于实际情况的限制,无法立即进行 NAP 染色的标本,可以先用固定液进行固定,1 min 即可完成,从而利于工作的进行。

在临床上不同的疾病其 NAP 活性不同。NAP 积分增高见于化脓性细菌感染(包括类白血病反应)、真性红细胞增多症、骨髓增殖性疾病、再生障碍性贫血、原发性血小板增多症、急性大出血、急性淋巴细胞白血病、恶性淋巴瘤、恶性肿瘤、激素治疗等^[14-15],治疗好转时,积分可降低。NAP 积分降低见于急慢性粒细胞白血病、骨髓增生异常综合征、病毒感染、恶性组织细胞增生症、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、红、白血病,继发性红细胞增多症,急性单核细胞性白血病,慢性淋巴细胞白血病等^[16],当病情缓解时,积分又可上升到正常范围。测定 NAP 活性对某些血液病的诊断、鉴别诊断和疗效观察有重要的参考价值,因此 NAP 结果的准确性对临床至关重要,从本文实验结果可以发现预固定对不能及时染色的 NAP 结果的准确性提供了保证。

参考文献

[1] 许文荣. 临床血液学和血液检验实验指导[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006. (下转第 1068 页)

- 炎发生情况及危险因素分析[J]. 社区医学杂志, 2013, 11(6): 22-24.
- [5] 菅凌燕, 何晓静, 于莹. 黄芩苷联合左氧氟沙星对铜绿假单胞菌生物膜的影响及相关机制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(14): 1097-1100.
 - [6] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*; our worst nightmare [J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(5): 634-640.
 - [7] 肖永红, 沈萍, 魏泽庆, 等. Mohnarin 2011 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(22): 4946-4952.
 - [8] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 12(5): 321-329.
 - [9] 李耘, 吕媛, 薛峰, 等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarin)2011—2012 年革兰阴性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 260-277.
 - [10] Gales AC, Castanheira M, Jones RN, et al. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America; results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008—2010) [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2012, 73(4): 354-360.
 - [11] Morrow BJ, Pillar CM, Deane J, et al. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2013, 75(4): 412-416.
 - [12] 施晓群, 孙景勇, 倪语星, 等. 2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(3): 218-221.
 - [13] 朱德妹, 汪复, 郭燕, 等. 2012 年上海地区细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 11(6): 409-419.
 - [14] 张祎博, 倪语星, 孙景勇, 等. 2009 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(6): 436-440.
 - [15] 张祎博, 倪语星, 孙景勇, 等. 2010 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(3): 161-166.
 - [16] 刘晓莉, 黄云昆, 单斌, 等. 2010 年昆明地区细菌耐药性监测及分析[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(2): 113-116.
 - [17] Sader HS, Reis AO, Silbert S, et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(1): 73-76.
 - [18] Shrout JD, Chopp DL, Just CL, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(5): 1264-1277.
 - [19] 侯佳惠, 童郁, 费静娴, 等. 铜绿假单胞菌超广谱 β -内酰胺酶, 质粒介导 AmpC 酶基因分布及流行特征分析[J]. 检验医学, 2012, 27(1): 39-43.
 - [20] Elsolh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(64): 229-238.

(收稿日期: 2016-11-14 修回日期: 2017-01-05)

(上接第 1065 页)

- [2] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997.
- [3] 邓宽国. 三种抗凝方法对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果的分析[J]. 医学检验与临床, 2005, 16(2): 64.
- [4] 张立文, 冉宝春, 王海, 等. 成人中性粒细胞碱性磷酸酶影响因素探讨[J]. 解放军医学院学报, 2004, 25(2): 152-153.
- [5] 王鸿利. 实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [6] Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, et al. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 101(s1): 6-9.
- [7] Rustin GJ, Wilson PD, Peters TJ. Studies on the subcellular localization of human neutrophil alkaline phosphatase [J]. J Cell Sci, 1979, 36(4): 401-412.
- [8] Smith GP, Sharp G, Peters TJ. Isolation and characterization of alkaline phosphatase-containing granules (phosphosomes) from human polymorphonuclear leucocytes [J]. J Cell Sci, 1985, 76(10): 167-178.
- [9] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [10] Iqbal SJ, Davies T, Cole R, et al. Neutrophil alkaline phosphatase (NAP) score in the diagnosis of hypophosphatasia[J]. Clin Chim Acta, 2000, 302(1/2): 49-57.
- [11] 常玉荣, 石峻, 殷华, 等. 血细胞形态学观察对血液系统疾病诊断的意义[J]. 检验医学, 2007, 22(1): 78-80.
- [12] 沈亚文, 王仲泉, 邓宽国. 标本采集方法对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果影响的观察[J]. 临床和实验医学杂志, 2003, 2(2): 126-127.
- [13] 许宏敏, 顾春刚, 周淑芬, 等. 抗凝血对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(12): 1735-1736.
- [14] 郑丽梅, 徐国洁, 葛晓军. rhG-CSF 对急性粒细胞白血病化疗后粒细胞缺乏患者 NAP 活性的影响[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 47-48.
- [15] 余安乐. 骨碱性磷酸酶免疫试剂盒在儿童缺钙检测中的应用[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(6): 683.
- [16] 汤萌, 周义, 田露. 80 例外周血中性粒细胞碱性磷酸酶染色与结果分析[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(3): 311.

(收稿日期: 2016-11-22 修回日期: 2017-01-13)

