

• 综 述 •

瑞氏染色法检测人附红细胞体出现假阳性的原因分析*

柴 珂 综述, 白苏日娜, 陈 瑶[△] 审校

(内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010110)

关键词: 瑞氏染色; 人附红细胞体; 假阳性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.057 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)08-1191-03

附红细胞体又称嗜血支原体, 是一类黏附在宿主红细胞膜表面上、嗜血液寄生、缺乏细胞壁、多形态的条件致病微生物。通过感染机体寄生于人和动物的红细胞表面、血浆及骨髓等部位, 引发了附红细胞体病, 是一种人畜共患病。1986 年首次报道了人附红细胞体, 1991 年在国内首次报道在内蒙古地区发现人附红细胞体病。瑞氏染色法是检测和诊断人附红细胞体病的主要实验室方法。具有折光性是附红细胞体的重要特征。通过显微镜可以看到人附红细胞体有折光性, 形状各不相同。由于血涂片制备不精及染色不良, 导致附红细胞体阳性率被夸大或高估, 而此时受检人群并未出现显著的临床症状。即使出现贫血、发热、体质量下降等症状也可能是其他疾病引起, 在这种情况下极易将人附红细胞体与海因茨小体、豪-焦小体、帕彭海默氏小体、卡式环、棘形红细胞等红细胞内的其他物质相混淆, 导致误诊甚至试验失败。故本综述就瑞氏染色检测人附红细胞体出现假阳性原因进行具体分析并提出相应解决方法, 以提高检测的准确性, 降低假阳性率, 使得瑞氏染色法这一检测人附红细胞体病的基本手段充分发挥其作用。

1 血涂片的制备

1.1 制备环境 适宜的温度和湿度、洁净的工作环境是制备血涂片的重要保障。不同的温度和湿度会对红细胞形态产生重要影响。若温度过低会导致红细胞膜上的 Na^+ 、 K^+ 、ATP 酶活性发生改变, 使红细胞在低渗溶液中维持细胞内外 Na^+ - K^+ 平衡能力降低而易导致红细胞膜的改变^[1]。高温环境会增大血液各成分间的空间, 降低彼此间的作用力, 同样也使由纤维蛋白原和球蛋白促成的串钱状红细胞聚集在重力作用下加速沉降。同理, 温度升高、湿度过高或过低也会如此。空气中的灰尘、微粒在制片过程中不慎落在血膜中, 也会造成不必要的假阳性。因此, 在制片的准备过程中一定要在适宜温度、整洁的环境中进行。尽量不要开空调、开门窗, 要保持室内空气平稳流动。

1.2 制备材料 未清洗的载玻片表面仍有较多残留污垢和碱性物质, 染色后用油镜镜检会在视野内发现较多杂质, 这些杂质极易与染液中的沉渣结合。通过显微镜微调会发现这些微小颗粒也会发光, 在瑞氏染色下使人将其误认为人附红细胞体, 对计算人附红细胞体阳性率造成较大干扰。另外, 用于推片的载玻片一端若参差不齐会在血膜上留下波浪状或刷状的痕迹, 使得血膜不完整, 染色不均。载玻片常常由于密封、湿度

等保存方面的原因而使其表面附着有菌丝, 如直接使用会严重影响镜检观察^[2]。因此, 在制片之前要用重铬酸钾酸性清洁液法或者洗洁精清洁法等方法清洗干净, 随后需在 95% 乙醇浸泡 0.5~1.0 h, 然后绸布擦干备用^[3]。

1.3 制备方法 涂片染色镜检操作简单, 但技术性较强, 要求制作者必须严格无菌操作, 以免不必要的杂质落到血膜上造成假阳性。按照“角度适宜、速度适宜、力度适宜”三大原则进行制备。使用玻片时只能手持玻片边缘, 切勿触及玻片表面, 要保持血滴接触的边沿平整光滑^[4], 玻片清洁、干燥。其次, 由于手指表面上的油脂对玻片表面会造成污染, 操作者应于操作前戴无菌手套。力度过大时, 血片的局部区域可能出现某些锯齿状红细胞和畸形红细胞等^[5], 通过来回旋转显微镜的精调旋钮会观察到这些锯齿形红细胞的边沿“闪闪发光”, 类似附红细胞体的折光性, 易使人误以为是多个人附红细胞体嵌在红细胞表面, 此时检测出的阳性率较高, 有时甚至达到 100%。

2 染色

2.1 瑞氏染液 瑞氏染液是由瑞氏染粉溶于甲醇而制成。其中, 瑞氏染粉中的伊红和美兰发挥着最主要作用。伊红是带负电荷的酸性染料, 美兰是带正电荷的碱性染料, 当瑞氏染粉溶解在甲醇中后, 两者重新分离, 成为带负电荷的伊红离子和带正电荷的美兰离子, 分别吸附带不同电荷的蛋白质。血细胞内含有不同等电点的蛋白质, 在 pH 值为 6.98 的缓冲液中, 血液中大多数蛋白质均达到或接近各自的等电点, 因而能较好地吸附相应染料而着色^[6]。伊红又称四溴荧光素, 有研究证明, 曙红体系的共振光散射主要是共振荧光^[7-8], 美兰亦如此^[9]。由此可知, 通过微调, 瑞氏染料也会出现折光, 造成假阳性。通常在镜下会看到某些游离的“附红细胞体”漂浮在血膜上, 根据活力的大小及移动手轮造成的惯性, 漂浮一段时间后会停留在血浆中或红细胞上, 呈圆形、月牙状、环形、杆形等。其实这些“附红细胞体”实为染料沉渣, 必然存在折光性。由于染液下层含杂质颗粒多, 因此吸取染液时要取中间层, 这样可以减少假阳性的发生。另外, 配制染料要选用优质甲醇, 以便更好地溶解染粉。

2.2 染色和冲洗 由于瑞氏染粉在油镜下会发生折光现象, 因此, 染色时要避免残渣留在载玻片上。可水平放置血涂片, 将蒸馏水从血涂片中间加入, 让染液从玻片四周溢出, 减少杂质的沉淀^[10]。采用打气的方法有助于染色, 即加入等量缓冲

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260414)。

[△] 通信作者, E-mail: chyao-1212@163.com。

液后,用洗耳球不断往血涂片打气^[11]。这样不仅可使染液与血膜充分接触,还可防止杂质沉降,从而避免血涂片中产生较多沉淀。在染色过程中,滴加染液要充分,以减少挥发。冲洗时,需用中性水或蒸馏水,让水流将染液冲去,否则染料渣滓易残留附着在涂片表面。固定不佳时,某些红细胞易被误认为破碎红细胞、棘形红细胞及靶形红细胞等,严重者会导致有核细胞溶解^[12],影响对人附红细胞体阳性率的正确判断。

3 其他易混因素

3.1 海因茨小体 海因茨小体是红细胞内变性珠蛋白的包涵体,由德国物理学家 Robert Heinz 于 1890 年发现并命名。光镜下可见红细胞内 1~2 μm 大小颗粒状折光小体,分布于胞膜上,瑞氏染色下不易与人附红细胞体辨别。它是由于血红蛋白的血红素部分丢失后,分子变得不稳定而形成的沉淀,后其与红细胞膜上的羟基结合,使红细胞的渗透脆性增加,同时使膜的硬度增加,加之海因小体很难通过狭窄的脾窦,会被脾破坏而发生溶血,可以在部分脾栓死患者外周血中可发现大量海因茨小体^[13]。尽管在某些脾功能下降或经脾切除患者的血液中会看到海因茨小体,但是通过迈格吉染色不会出现在健康人中^[13]。有学者用羟基产生体系氧化健康人红细胞,发现受氧化损伤可导致红细胞海因茨小体产生增加。其常见于慢性溶血性贫血,该贫血类型具有红细胞内包涵体和暗褐色尿的特征,故又称“具有色素尿的包含体贫血”或“遗传性亨氏小体贫血”。此外,应用海因茨小体还可检测 α -珠蛋白生成障碍性贫血^[14]。贫血是人附红细胞体病的主要临床症状,而两者发生贫血的机制有哪些异同有待进一步研究。其次,结晶紫法是其主要检测方法^[15]。Palasuwan 等^[16]发现,印防己、铁槐、毛鱼藤等草本药物能通过抗氧化抑制海因茨小体的形成。

3.2 豪-焦小体 豪-焦小体是美国生理学家 Howell 于 1890 年首次发现,1907 年法国组织学家 Jolly 又对其做了进一步研究,现在人们将残存在成熟红细胞或幼红细胞细胞质内 1~5 μm 暗紫红色圆形小体称为豪-焦小体。其常见于恶性贫血、脾切除后及红白血病等患者的红细胞中。它与海因茨小体同为红细胞中的特殊废物,因此,在脾切除后的患者中易找到豪-焦小体。如无其他特殊情况,豪-焦小体作为血象中异常众多的存在,可作为先天无脾的诊断线索。脾功能减退时,外周血涂片可见到豪-焦小体,与脾功能减退呈正相关^[17]。在以往研究附红细胞体过程中不乏脾切除的动物实验,瑞氏染色法下观察到的是附红细胞体还是豪-焦小体有待进一步研究。不言而喻,若将豪-焦小体误以为是附红细胞体,则阳性率会显著升高,正确辨别两者并降低瑞氏染色下假阳性率的发生需要结合其他检测手段及临床表现等。Bain^[18]于 1989 年首次在化疗和免疫抑制剂治疗患者的白细胞中发现了类似豪-焦小体的聚集物,这些聚集物意味着凋亡细胞的细胞核结构与变形红细胞中幼红细胞里观察到的豪-焦小体类似^[19]。

3.3 帕彭海默氏小体 Solis 等^[20]认为,脾切除后患者的红细胞中不仅有豪-焦小体,还有帕彭海默氏小体和嗜碱性颗粒、棘形红细胞等。1945 年学者通过对 3 例脾切除患者血液进行吉姆萨和瑞氏染色发现了红细胞中的内涵物。其为紫红色,类球形,黏附在红细胞膜上,含有 Fe^{3+} 和酸性磷酸酶、次溶菌酶。众多学者认为其为铁离子附着而所致。之后,学者将其命名为

帕彭海默氏小体,他们认为其可出现在脾切除患者的有核红细胞中,也可出现于骨髓和血浆中。通过微调显微镜的精调旋钮,这些小粒子会表现出折光特征,不易与人附红细胞体分辨,且脾切除后血液中的铁离子沉着急剧增加,而骨髓中含有铁颗粒的红细胞并没有增多。有学者认为脾在不破坏含有铁颗粒红细胞的情况下有可能清除帕彭海默氏小体。大量的帕彭海默氏小体可见于溶血的脾切除患者中,但在这样的患者中也会发现豪-焦小体和有核红细胞。帕彭海默氏小体常发生于铁粒幼红细胞贫血、溶血性贫血、镰刀状细胞贫血患者中,其大小为 0.5~0.7 μm 。嗜碱性含铁颗粒见于各类红细胞内,有脾功能低下的迹象,红细胞有铁代谢异常时会被瑞氏染料染成蓝色。

3.4 卡式环 卡氏环是在嗜多色性或碱性点彩红细胞的细胞质中出现的紫红色细线圈状结构,呈环形或 8 字形,见于白血病、巨幼细胞贫血、增生性贫血、铅中毒或脾切除后。其可存在于外周血或骨髓中,也可出现在有核红细胞或无核红细胞中。在瑞氏染色条件下,环可以是由一条“红色的绳”串接嗜酸或嗜碱点彩颗粒而形成“项链”状,有时呈“8”字形^[21]。它们与海因茨小体相似但有区别:光谱分析中,卡氏环呈洋红色而海因小体呈蓝色。其常见于极其严重的贫血,特别是恶性贫血和铅中毒。人附红细胞体病发生时,人附红细胞体有时会链状式地黏附在红细胞表面,易与卡氏环混淆,导致阳性率“升高”。其本质和成因至今仍存在广泛争议,需进一步探索。

3.5 棘形红细胞 棘形红细胞的细胞质常向一侧或多侧伸出、突起,如生芽样。其多见于遗传性或获得性 β -脂蛋白缺乏症,也可见于脾切除后、酒精中毒性肝脏疾病等。王会祥^[22]认为,通过对尿中红细胞形态分析和红细胞平均体积(MCV)测定,可协助肾性血尿和非肾性血尿的鉴别诊断。显微镜镜下微调观察棘形红细胞,会发现这些突起也会呈折光性,较难与人附红细胞体相辨别。

关于人附红细胞体的形态学,目前瑞氏染色下常见有环状、杆状、球状、球形、逗点形等,而被黏附的红细胞常呈菠萝状、锋芒状、狼牙棒状等。其中,与上述因素最主要的区别是游离于血浆中的人附红细胞体可做摇摆、扭转、上下翻滚等运动,类似布朗运动。所以,瑞氏染色下有运动性的是人附红细胞体,而海因茨小体、豪-焦小体、卡式环、帕彭海默氏小体、棘形红细胞等无运动性。

4 小 结

总之,作为人附红细胞体检测的重要手段,瑞氏染色镜检由于各种干扰因素难免会产生假阳性,其发生不可避免。条件允许情况下可用 Goodpasture 染色、过碘酸-雪夫氏(PAS)染色等其他染色方法,以提高染色效果,增加结构分辨率。制作血涂片标本是瑞氏染色镜检人附红细胞体最基本的工作,要勤加练习,不但要熟练掌握技术要领,还应该积极排除外界因素的干扰,并认真总结失败经验教训,分析出现假阳性的原因并及时采取相应解决措施。染色是关键环节,配液、滴取、吹打、冲洗、干燥、保存等每个细节都要留心,养成良好的思维习惯和行为习惯。在显微镜下观察人附红细胞体时要仔细辨别与海因茨小体等易混淆因素的差别,提高诊断率。当然,血液标本瑞氏染色镜检只是一种检测人附红细胞体的辅助手段,并不是所谓的“金标准”,须结合临床症状及血常规、酶联免疫吸附检测、

PCR 等, 尽排除假阳性的干扰。作为检测人附红细胞体的基本实验室方法, 若能排除假阳性的干扰或将其降至最小化, 也将为人类和其他动物提供重要的安全保障。

参考文献

- [1] 李霞, 王进, 周锐, 等. 不同抗凝剂和温度对红细胞形态的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3270-3272.
- [2] 郭自力, 李汉全. 血涂片瑞氏染色的影响因素和解决方法[J]. 高等函授学报(自然科学版), 2001, 14(4): 48-49.
- [3] 梁艳清. 瑞氏染色制作血涂片的几点应用体会[J]. 解剖科学进展, 2012, 18(5): 500.
- [4] 李璐. 血涂片染色方法的改良[J]. 华夏医学, 2011, 24(3): 351-352.
- [5] 王也飞, 胡翊群. 红细胞膜蛋白异常与膜骨架相关溶血性贫血的发生[J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(1): 104-107.
- [6] 蒋竞杭, 王铁霞. 缓冲液 pH 值对血涂片 Wright's 染色的影响分析[J]. 卫生职业教育, 2006, 24(6): 29.
- [7] 卢臻, 宋功武. 嗜红 Y 与牛血清蛋白作用的荧光光谱研究及分析应用[J]. 分析测试学报, 2000, 19(5): 48-50.
- [8] 魏永巨, 刘翠格, 赵品, 等. 嗜红 Y 的共振光散射与共振荧光[J]. 化学通报, 2005, 68(8): 628-632.
- [9] 陆萍, 凌冰, 莫琴, 等. 美兰光化学法对红细胞膜的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(3): 169-172.
- [10] 张志梅, 孙辉. 两种血涂片染色方法在教学和临床应用的比较[J]. 中国医药指南, 2010, 8(17): 173-174.
- [11] 魏臻, 刘帮洞, 胥文春. 血涂片染色操作方法调查分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(16): 2423-2424.
- [12] 王霄霞. 外周血涂片的染色方法及染色结果的判断[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2014, 3(2): 635-640.
- [13] Ishikawa T, Kubota T, Horigome R, et al. Prevalence of

Howell-Jolly bodies caused by partial splenic embolization for portal hypertension[J]. Internal Med, 2013, 52(16): 1765-1768.

- [14] 周剑英, 谢杏梅, 李东至, 等. 亨氏小体和毛细血管电泳联合筛查对 α -地中海贫血的应用价值[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(12): 1488-1489.
- [15] 黄子轩, 李红, 代龙光, 等. IL-24 抑癌基因联合大蒜素对肺癌细胞的杀伤作用[J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(1): 15-19.
- [16] Palasuwan A, Soogarun S, Lertlum T, et al. Inhibition of Heinz body induction in an invitro model and total antioxidant activity of medicinal Thai plants[J]. Asian Pac J Cancer P, 2005, 6(4): 458.
- [17] 吴鹏韬, 杨娜, 刘梅, 等. 脾功能与冠状动脉病变关系的初步探讨[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(02): 94-97.
- [18] Bain BJ. Blood cells: a practical guide[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014.
- [19] Brichs L. Howell-Jolly body-like inclusions in immunocompromised patients with antiviral treatment[J]. Ann Hematol, 2014, 93(12): 2091-2092.
- [20] Solis M, Perrin J, Guedenet JC, et al. RBCs inclusions after splenectomy: not only Howell-Jolly bodies[C]. Montreux: Ann Bio Clin, 2012.
- [21] 温晓艳, 邓印红, 郑文艺. Cabot 环研究现状[J]. 检验医学, 2005, 20(6): 95-97.
- [22] 王会祥. 尿红细胞形态和 MCV 在判断血尿来源中的应用价值[J]. 检验医学, 2007, 22(1): 77-78.

(收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-01-06)

• 综 述 •

来那度胺在血液系统疾病治疗中的研究进展

周小辉 综述, 唐晓琼[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院血液科 400016)

关键词: 来那度胺; 多发性骨髓瘤; 淋巴瘤; 骨髓增生异常综合征; 白血病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 08. 058 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)08-1193-05

随着血液系统疾病治疗手段的不断丰富, 目前已出现多种新药如蛋白酶体抑制剂、靶向治疗药物、免疫调节剂等。来那度胺是新一代免疫调节剂, 是沙利度胺的衍生物。因其具有更强的血管生成抑制和免疫调节作用, 加之几乎无神经毒和致畸性等优点, 目前广泛用于血液系统疾病的治疗。

1 药物作用机制

1.1 免疫调节 来那度胺除了能抑制肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-12 的产生, 还能上调外周血单核细胞中抗炎性因子 IL-10 的水平。通过 B7-CD28 通路刺激

T 淋巴细胞分泌干扰素(IFN)- γ 和 IL-2, 从而刺激克隆样 T 细胞的增殖和自然杀伤性细胞(NK)的活化; 通过改变 NK 细胞的数目和功能, 增强 NK 细胞介导的抗体依赖细胞所介导的细胞毒作用(ADCC)。

1.2 抗肿瘤细胞血管生成 血管内皮生长因子(VEGF)受体信号系统在肿瘤细胞血管的生长和存活中起重要作用。研究发现, 来那度胺不仅抑制 VEGF 的活性, 还抑制其受体的生成。来那度胺能降低 IL-6 和 VEGF 的表达、阻断 PI3K-Akt 途径的激活、阻止组织内皮细胞迁徙从而抑制血管的生成, 因此

[△] 通信作者, E-mail: tangxiaojiong@126. com.