

3 讨论

3.1 文献报道^[4]实验证明,薄层层析斑点分离清晰、重现性好,可作为复方野葛根胶囊制剂的有效鉴别方法。

3.2 复方野葛根胶囊为野葛根等多种中药的复方制剂,葛根素为野葛根的主要成分,具有改善高粘血症、改善微循环、扩张冠状动脉和脑血管等功效,所以在本试验中选用葛根素为监测指标,并且利用专属性强、灵敏度高的 HPLC 法对其进行含量测定,具有一定的代表性。

3.3 利用高效液相色谱法对医院中药制剂进行主药成分含量测定,并作为质量控制标准,这在医院中药制剂研究方面是一个创新。本实验采用高效液相色谱法测定复方野葛根胶囊中葛根素的含量,被测组分的分离较好,胶囊中的其他成分不形成干扰,而且方法操作简便、结果准确、重现性好。

3.4 在留样观察 12 个月内,我们定期对所留样品监测了含量、定性鉴别及性状,结果表明该制剂质量稳定,所制备工艺能够保证样品的稳定性。

3.5 稳定性实验表明,本制剂在储存其间外观、性状、定性等均未发生改变,含量变化也在标准规定的范围之内。下一步我们将结合高温试验和加速试验的结果来确定该制剂的有效期。

参考文献

- 1 杨嘉珍,潘洪平,危华玲.复方野葛根胶囊的药效学研究[J].河南中医学院学报,2008,23(5):20-23.
- 2 杨嘉珍,黄进,危华玲,等.复方野葛根胶囊治疗高血脂症 50 例的疗效观察[J].广西医学,2008,30(7):1042-1043.
- 3 危华玲,黄廷,卢文胜.复方野葛根胶囊制剂成型工艺的研究[J].时珍国医国药,2008,19(8):1886-1888.
- 4 刘卉,李华.麝香接骨胶囊薄层鉴别研究[J].时珍国医国药,2008,19(2):372-373.

[收稿日期 2008-12-30][本文编辑 宋卓孙 黄晓红]

论 著

自配试剂在 Coulter 流式细胞仪检测急性白血病免疫分型中的应用

李若林, 秦雪, 莫武宁, 林发全, 黄军强, 李山

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院临床医学实验部,广西医科大学检验系

作者简介:李若林(1982-),女,硕士研究生,研究方向:临床免疫学。E-mail: ruolin8297@163.com。

通信作者:李山,男,博士,教授,检验科主任,硕士研究生导师,研究方向:细胞免疫学研究。E-mail: lish8858@163.com。

[摘要] 目的 分析自配 Coulter 流式细胞仪试剂在检测急性白血病免疫分型中的应用效果。方法 将自配全血溶解试剂和鞘液及清洗液的理化性质、准确度和精密度以及对检测急性白血病免疫表型抗原的应用效果与原装试剂进行比较分析。结果 自配试剂与原装试剂理化性质基本一致;两种试剂分别测定同一白血病免疫分型标本 20 次,结果各胞膜抗原批内 CV 值均 $<2\%$;检测急性白血病免疫分型胞膜和胞浆多种抗原,分别与原装试剂比较,两者差异均无统计学意义($P>0.05$),且检测胞浆抗原 cMPO 和 cCD79a 结果均呈高度正相关($r>0.970$)。结论 自配 Coulter 流式细胞仪试剂对白血病免疫分型的检测效果好,可代替原装试剂进行应用并推广。

[关键词] 自配试剂; 流式细胞仪; 急性白血病; 免疫分型

[中图分类号] R 466.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)03-0229-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.03.006

Application of Coulter flow cytometry with self-mix reagents for immunophenotyping of acute leukemia LI Ruolin, QIN Xue, MO Wu-ning, et al. Clinic Laboratory Department, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Medicine Laboratory Department of Guangxi Medical University, Nanning 530021 China;

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of Coulter flow cytometry with self-mix reagents on immunophenotyping of acute leukemia. **Methods** The physical and chemical properties, accuracy, precision and the application effect on testing immunophenotyping of acute leukemia antigens between the original and the self-mix reagents of the hemolysis reagent, sheath fluid and cleaning fluid, were compared respectively. **Results** The physical and chemical properties were basically the same in two reagents; The within-run CV were less than 2% by testing several cell membrane antigens of acute leukemia with two reagents, every for 20 times; there were no statistics significance in detective results of membrane and cytoplasmic antigens between two reagents ($P > 0.05$), and the correlation coefficient of intracellular antigen cMPO and cCD79a were bigger than 0.970. **Conclusion** The application effect of self-mix reagents is good, and the original reagents could be replaced by them when flow cytometry is applied to immunophenotyping of acute leukemia.

[Key words] Flow cytometry; Self-mix reagents; Acute leukemia; Immunophenotyping

目前,流式细胞术(FCM)免疫表型分析已成为急性白血病诊断、分型的重要工具。由于该仪器对试剂要求较严格,如用量较大的鞘液等均使用进口的原装配套试剂,为了使该试剂国产化以节省成本,更好应用于临床,本科室采用自配全血溶解试剂、鞘液及清洗液对急性白血病免疫分型的胞膜及胞浆中多种抗原进行检测,并与原装试剂检测效果进行比较,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 美国 Beckman-Coulter Epics XL 型流式细胞仪及标本处理仪;美国 Advanced 3900 型全自动渗透压分析仪。

1.2 试剂 (1)单克隆抗体包括荧光素异硫氰酸荧光素(FITC)/藻红蛋白(PE)/PE-花青素(PE-Cy5)标记的抗体。其中 FITC 标记的单抗为 IgG1、CD5、CD13、HLA-DR、CD20、CD64、cMPO, PE 标记的单抗为 IgG1、CD19、CD10、CD33、CD7、CD34、CD79a, PE-Cy5 标记的 CD45, 以上试剂购于苏州生物基因有限公司。(2)IntraPrep (Immunotech) 透膜试剂盒:主要含有 5.5% (v/v) 多聚甲醛和皂甙(saponin)。(3)标准荧光微球,配套的清洗液、鞘液、全血溶解试剂,均购自美国 Beckman-Coulter 公司。(4)自配鞘液、清洗液、全血溶解试剂,均用 0.2 μm 的滤膜过滤分装后使用。

1.3 方法

1.3.1 标本制备 取 EDTA 抗凝骨髓标本 1~2 mL,过滤,计数有核细胞数后,取适量样本分别用自配和原装的 PBS(鞘液)调整细胞浓度约为 $5 \times 10^9/\text{L}$ 备用。染色方法:(1)胞膜:对各标有不同荧光色素

的单抗配对(三色分析),每管加备用细胞 100 μL 、CD45-Cy5 试剂 10 μL 与两种单抗各 20 μL ,混匀后室温避光孵育 30 min,分别对应地采用自配和原装全血溶解试剂进行溶血,上机检测。(2)胞浆:胞浆内抗原的检测方法按试剂盒操作步骤,改变细胞膜渗透性。备用细胞 50 μL 与 10 μL CD45-Cy5 混匀后,室温避光孵育 15 min;加 IntraPrep Reagent 1(固定液)100 μL 混匀,室温避光 15 min 后,分别对应地加自配和原装 PBS 3 mL,离心 1500 rpm $\times$ 5 min,弃去上清,混匀沉淀物;加 IntraPrep Reagent 2(透膜剂)100 μL ,室温避光孵育 5 min 后,将每管均分成两管,即样本管和对照管;每管加相应的同型对照及荧光标记单抗,室温避光孵育 15 min 后,PBS 洗涤 2 次,离心 1500 rpm $\times$ 5 min,弃去上清,加 500 μL PBS 上机检测。

1.3.2 流式细胞仪测定 打开流式细胞仪及氩离子激光光源(480 nm),预热 20 min,仪器自动初始化,用标准荧光微球进行光路与流路校准,所有荧光信号的变异系数(CV)均需 $< 2\%$ 。通过 CD45/SSC 双参数散点图设门圈定细胞群,选择白血病细胞为分析对象并排除细胞碎片及血小板,用同型对照确定荧光阴性范围及 PMT 电压校准,再分析计算该圈定群内各白血病相关抗原表达。每次测定 3000~5000 个细胞,结果判断以各抗原阳性细胞数 $\geq 20\%$ (除 cMPO $\geq 10\%$) 为有意义。全部数据用流式细胞仪和软件 SYSTEM II 获取和分析。

2 结果

2.1 理化性质测定 原装清洗液、鞘液以及全血溶解试剂与自配试剂的主要理化性质见表 1。检测结

果显示,两者理化指标基本一致。

表 1 原装试剂与自配试剂的理化指标比较

试 剂	pH	电导率(ms/cm)	渗透压(mosm)
原装清洗液	8.5	16.4	563
原装鞘液	6.8	15.2	316
原装全血溶解剂			
A	2.8	2.0	40
B	10.7	54.1	1055
C	8.5	2.1	300
自配清洗液	8.7	16.5	564
自配鞘液	7.0	15.5	322
自配全血溶解剂			
A	2.8	2.0	40
B	10.6	54.1	1057
C	8.4	2.1	301

2.2 准确度和精密度 连续 10 d 用自配试剂测定标

表 2 自配与原装试剂检测 43 例白血病免疫分型—胞膜抗原结果比较

	CD5	CD19	CD13	CD10	HLA-DR	CD33	CD20	CD7	CD64	CD34
<i>t</i>	1.853	1.739	1.579	0.504	1.832	0.993	1.441	0.897	1.114	1.88
<i>P</i>	0.079*	0.098*	0.131*	0.620*	0.083*	0.333*	0.166*	0.381*	0.279*	0.076*

注: **P*>0.05

2.3.2 检测急性白血病免疫分型—胞浆抗原 43 例急性白血病患者,其中急性髓系白血病占 21 例, B 淋巴细胞系占 20 例。一般情况下,急性髓系白血病的阳性胞浆抗原主要表达在 cMPO, B 淋巴细胞系主要表达在 cCD79a^[1]。在相同条件下,分别用自配和原装试剂检测急性髓系白血病胞浆抗原 cMPO 以及 B 淋巴细胞系白血病胞浆抗原 cCD79a,结果见表 3、图 1。可见,两种试剂检测胞浆抗原 cMPO、cCD79a 结果基本一致,直方图相似,两者差异均无统计学意义(*P*>0.05);相关系数均>0.970,说明两种试剂均呈高度相关性。

表 3 自配与原装试剂测定白血病免疫分型—胞浆抗原结果比较($\bar{x} \pm s$)

项 目	cMPO	cCD79a
原装试剂	76.3±22.5	69.6±28.4
自配试剂	74.8±23.1	68.7±25.0
<i>r</i>	0.987	0.976
<i>P</i>	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05

3 讨论

3.1 白血病是一组造血干细胞克隆性的恶性疾病,呈高度异质性。白血病细胞因增殖与分化间的平衡破坏,致使细胞阻滞在分化或成熟过程中的某一特殊阶段。所以也就往往导致白血病细胞停留在细胞分化的某一抗原表达阶段。因此,利用代表不同阶段的单克隆抗体检测相应白细胞表面抗原或胞质内的分化抗原,可以较精确地识别表达不同分化抗原的细胞,明确地划分出细胞的发育阶段及类型,为临床治疗方案的选择及预后提供重要的依据^[2]。

准荧光球,进行光路与流路校准,结果 Flow Check 的 FS 及荧光 FL₁—FL₄ 的 HPCV 值均<2%;取制备好的白血病免疫分型标本,采用自配和原装试剂分别测定 20 次,结果各胞膜抗原的批内 CV 值均<2%。

2.3 应用效果比较

2.3.1 检测急性白血病免疫分型—胞膜抗原 在相同条件下,分别采用自配和原装试剂检测了 43 例急性白血病患者骨髓样本免疫表型,结果经配对 *t* 检验,*P* 均>0.05。见表 2。说明两种试剂在检测白血病免疫分型胞膜抗原 CD5、CD19、CD13、CD10、HLA-DR、CD33、CD20、CD7、CD64、CD34 时,差异均无统计学意义。

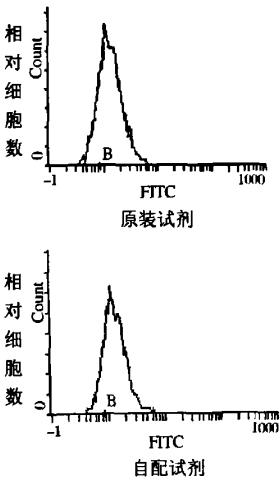


图 1 两种试剂对胞膜抗原 cMPO 测定的直方图

目前,采用流式细胞术定量检测单个细胞膜和胞浆中抗原的技术已成为急性白血病诊断和分型的重要工具。赵丽等^[3]报道应用多参数 FCM 对 114 例 AL 患者进行分型,结果 AML 患者主要表达 CD13 (100%),CD117 (77.5%), HLA-DR (70%);B 系 ALL 中 CD19、CD22、CD10 表达率高,其中 CD19 达 100%,其次为 CD10 (81.8%);T 系 ALL 中 CD7 表达率达 100%。李璐璐等^[4]运用流式细胞术分析胞浆抗原表达情况,结果 AML 患者的胞浆抗原 cMPO 表达率为 70%,cCD79a 及 cCD3 在 AML 中未见表达;6 例 ALL 中有 2 例 B-ALL,其 cCD79a 表达均为阳性,3 例 T-ALL 中 cCD3 表达均为阳性。可见,应用流式细胞术对急性白血病进行胞膜

或胞浆抗原检测,进而对白血病患者准确诊断,治疗方案选择及预后判断等均有重要价值。

3.2 采用流式细胞术检测白血病免疫表型各抗原,全血溶解试剂是样品制备所需的试剂,鞘液是流式细胞仪检测样品的必备试剂,其质量如何都直接影响到测定结果的准确性。为了节省成本,本科室于2002年成功地配制出美国 Coulter 流式细胞仪全血溶解试剂、鞘液及清洗液^[5],并用于T细胞亚群、HLA-B27、白血病免疫分型等项目检测。本实验将自配试剂与原装试剂进行比较,两者理化指标基本一致,这保证了适合免疫反应的酸碱度与电解度;连续10d用自配试剂测定标准荧光球进行光路与流路校准,结果Flow Check的FS及荧光FL₁-FL₄的HPCV值均<2%。采用自配和原装试剂分别检测急性白血病免疫分型多种胞膜抗原及胞浆抗原cMPO或cCD79a,经统计分析,两种试剂检测结果差异均无统计学意义(P 均>0.05);并且两种试剂检测胞浆抗原cMPO、cCD79a结果基本一致,直方图相似,两种试剂呈高度正相关(r 均>0.970),可见自配试剂对白血病免疫分型检测效果达到原装试剂水平。自配试剂在临床应用过程中,仪器运转正

常,无出现堵孔、管道堵塞现象及其它因试剂使用而导致的故障,实验结果满意。

3.3 自配试剂应用于流式细胞仪检测急性白血病免疫表型相关的胞膜或胞浆抗原中,不仅能达到原装试剂检测效果和保证了实验结果准确性,而且配制方便、成本消耗低、稳质期长,这在很大程度上解决了购买、运输、成本造价等方面问题,具有较好的经济效益与社会效益,值得推广应用。

参考文献

- 1 齐晖,李富荣,王新根,等.检测胞浆抗原用于急性白血病免疫分型[J].中国医学工程,2002,10(6):85-86.
- 2 谭齐贤,张树平,王鸿利,等.临床血液学和血液学检验[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2003:194.
- 3 赵丽,周兰霞.114例白血病三色流式细胞术免疫分型研究[J].中国免疫学杂志,2005,21(9):717-718.
- 4 李璐璐,刘彦虹,戴海滨.细胞表面分化抗原和胞浆内抗原在急性白血病免疫分型中的应用[J].中国实用内科杂志,2005,25(4):249-350.
- 5 秦雪,李山,林发全,等.COULTER流式细胞仪试剂的配制及应用探讨[J].临床检验杂志,2002,20(2):100-101.

[收稿日期 2008-12-30][本文编辑 韦辉德 覃柯滔]

论 著

经内镜内外引流治疗胆道梗阻的效果分析

李蕊仙, 潘小平

作者单位:026000 内蒙古锡盟医院(李蕊仙);014030 包头医学院二附院内蒙古消化病研究所(潘小平)

作者简介:李蕊仙(1975-),女,主治医师,大学学历,研究方向:消化系统疾病诊断和治疗。E-mail:menj1188@sina.com。

通讯作者:潘小平,男,硕士研究生,主治医师。E-mail:pxp74@sina.com.cn

[摘要] 目的 观察比较经内镜内外引流术治疗不同病因、不同性质胆道梗阻的远期疗效和并发症。

方法 总结2003-10~2007-12 506例胆道梗阻施行十二指肠镜下各种胆道引流术的临床资料。结果 506例中481例引流成功,成功率为95.1%,胆道梗阻症状得到缓解(黄疸减退、体温下降、疼痛缓解)。结论 经内镜引流治疗胆道梗阻,具有创伤小、痛苦少、恢复快、住院时间短、疗效肯定等优点;注意引流部位的选择,可进一步提高经内镜胆道引流术的成功率。

[关键词] 内镜; 胆道梗阻; 引流

[中图分类号] R 657.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)03-0232-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.03.007