

往由于检验水平有限,诊断不明确导致误诊或延误治疗。探索弯曲菌的快速检测方法以及对不同来源的菌株进行亲缘性分析,识别爆发流行,为疾病的诊断、控制以及弯曲菌病分子流行病学研究具有十分重要的意义。各国(特别是发展中国家)建立和完善对弯曲菌的监测系统,加强各国之间的技术交流与合作也迫在眉睫。

#### 参考文献

- [1] 朱冬梅,刘书亮,彭珍,等.肉鸡源弯曲菌的分离、多重 PCR 鉴定及其耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2014,30(4):390-396.
- [2] 侯水平,陈守义.胎儿弯曲菌的感染现状、检测方法和分子分型的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2014,30(1):85-88.
- [3] 倪语星,尚红.临床微生物学检验[M].5版.北京:人民卫生出版社,2013:178-180.
- [4] 吴蜀豫,张立实,冉陆.弯曲菌及弯曲菌病的流行现状[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):58-61.
- [5] 黄金林,许海燕,张弓,等.江苏奶牛空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行状况及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2007,23(10):1016-1020.
- [6] 阳成波,蒋原,黄克和,等.PCR法和培养法调查食品和水中空肠弯曲菌的比较研究[J].中国人兽共患病杂志,2003,19(1):91-94.
- [7] 林玫,周凌云,王鸣柳,等.广西空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行病学调查[J].中国人兽共患病学报,2012,28(11):1143-1147.
- [8] 吴忠亮.空肠弯曲杆菌感染分布研究[D].上海:上海交通大学,2007.
- [9] 许海燕,黄金林,包广宇,等.扬州市区腹泻人群空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行状况及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2008,24(1):58-62.
- [10] 侯凤琴,沈宝铨,孙新婷.200株弯曲菌对抗生素敏感性研究[J].中华医学感染杂志,2001,11(6):406-408.
- [11] 龚俊,刘树林.空肠弯曲菌与大肠弯曲菌基因分型研究进展[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(5):414-418.

(收稿日期:2015-03-15 修回日期:2015-05-20)

## 人外周血淋巴细胞染色体标本的制备研究

徐本锦,刘玲(山西医科大学汾阳学院,山西汾阳 032200)

【关键词】 外周血淋巴细胞; 染色体; 分裂相; 秋水仙素

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.070 文献标志码: B 文章编号:1672-9455(2015)15-2296-03

1960年, Moorhead等建立了一套比较完整的外周血体外培养和染色体制备方法,该技术能够清晰的显示染色体数目和结构上的变化,对于常见遗传性疾病的快速诊断,提高人口素质具有十分重要的作用,对我国优生优育工作意义重大<sup>[1]</sup>。但该技术对细胞的培养时间较长,使得实验易受温度、pH、溶血和凝血等因素影响而导致失败<sup>[2]</sup>。为了临床上能高效、快速、准确地诊断遗传性疾病,有学者已经报道了该技术的一些心得体会<sup>[3-5]</sup>。本研究立足于获得高质量的人外周血染色体标本和提高实验教学的可操作性,对该技术的4个影响因素进行了优化,现将研究结果报道如下。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取8名健康男性和8名健康女性进行外周血采集,使用肝素抗凝。

1.2 仪器与试剂 培养箱,光学显微镜,香柏油,乙醇灯,离心机,恒温培养箱,人外周血淋巴细胞培养液(湖南湘雅基因技术有限公司),秋水仙素(20 μg/mL),低渗液(0.075 mol/L 氯化钾溶液),固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),Giemsa染液,500 U/mL肝素。

### 1.3 方法

1.3.1 实验方法 采血:采用10 mL一次性注射器吸取少量肝素润湿针管,将多余肝素排出。接种:在无菌条件下,用注射器针头刺透培养瓶橡皮塞,向培养瓶内注入成年男子全血26滴,或成年女子全血28滴,轻轻摇匀。培养:将培养瓶放入37℃恒温培养箱内培养72 h<sup>[6]</sup>。细胞同步化:外周血淋巴细胞培养68~70 h后,用5 mL注射器针头加入5滴20 μg/mL秋水仙素,然后接着培养3~4 h<sup>[6]</sup>。细胞收集:从培养箱拿出

培养瓶,摇匀之后直接倒入10 mL刻度离心管,以2 000 r/min离心10 min。低渗:弃上清,用注射器加入8 mL 37℃水浴的低渗液,混匀后37℃恒温水浴30 min<sup>[6]</sup>。预固定:低渗结束后,立即加入1 mL固定液,混匀之后以2 000 r/min离心10 min。固定:弃上清,加入8 mL固定液,混匀后室温固定30 min,然后以2 000 r/min离心10 min,弃上清。再固定:加入8 mL固定液,用吸管吹打,充分混匀后室温静置30 min或过夜。滴片:再次以2 000 r/min离心10 min,弃上清,然后每个离心管里加入5~6滴新鲜配制的固定液,吹打混匀制成细胞悬液。将细胞悬液3滴,滴到冰冻的载玻片上,滴片高度30 cm,随即吹开,酒精灯上烘干,贴标签。染色:用1:10 Giemsa染液37℃条件下染色10 min,自来水冲洗,晾干后镜检<sup>[6]</sup>。

1.3.2 实验原理 培养:人外周血淋巴细胞在体外培养72 h,大部分淋巴细胞处于增殖周期内。同步化:培养期间,利用秋水仙素对细胞进行同步化处理,使大部分细胞都停滞在有丝分裂的中期。低渗:淋巴细胞经低渗液处理,会吸水而胀破,释放出染色体。固定:利用低渗液对染色体进行固定,有助于维持其完整的形态。染色:利用Giemsa染液对染色体进行着色,便于显微镜下观察。

1.3.3 关键因素优化 通过文献资料和笔者长期的实验经验,本研究选取了4个影响实验结果的关键因素进行条件优化,分别对秋水仙素加入时间、低渗时间、固定时间和染色时间设定梯度,其他条件保持不变,通过多次尝试和反复摸索,找到最佳时间组合,确定最优实验条件。具体时间梯度如表1所示。

### 2 结果

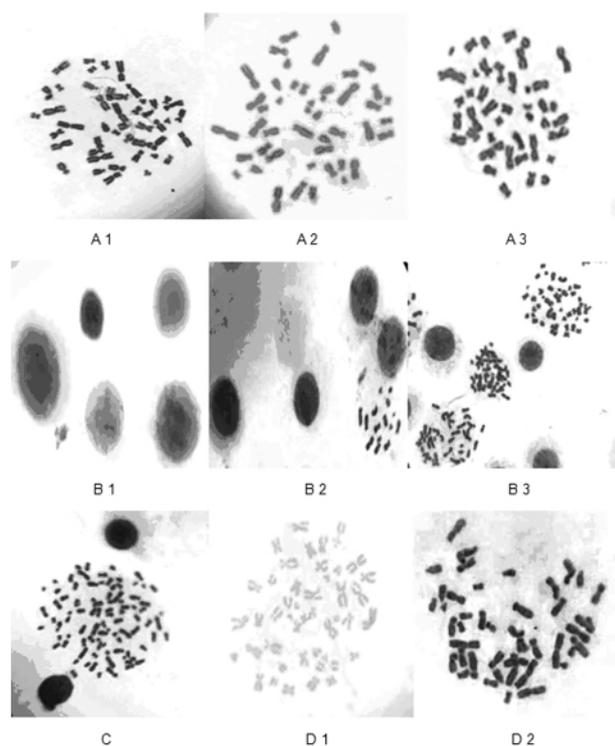
通过对秋水仙素加入时间、低渗时间、固定时间和染色时

间进行优化,找到这 4 个影响因素的最佳作用时间分别为 2.5 h、20 min、25 min 和 20 min。具体结果如图 1 所示。

表 1 4 个关键因素的时间梯度

秋水仙素作用时间(h)	低渗时间(min)	固定时间(min)	染色时间(min)
1.5	10	10	10
2.0	15	15	15
2.5	20	20	20
3.0	25	25	25
4.0	30	30	—

注:—表示无数据。



注:A1~A3 表示优化后的染色体核型;B1~B2 表示低渗时间小于或等于 15 min;B3 表示低渗时间等于 20 min;C 表示固定时间小于或等于 20 min;D1 表示染色时间小于或等于 15 min;D2 表示染色时间大于或等于 25 min。

图 1 各类条件下的实验结果(100×10)

### 3 讨 论

人外周血染色体分析技术在遗传性疾病的诊断中发挥着十分重要的作用,在一些医院的生殖医学科,该专门技术得到了广泛的应用。随着一些新的遗传性疾病的报道及产前产后诊断的日益广泛,诊断的高效率和准确结果的保障是该技术应用过程中亟待解决的问题。因此,有必要对影响实验结果的关键因素进行优化,使其更好地服务于教学实验或临床。

该技术对细胞进行同步化、低渗和固定处理,从而获得大量形态清晰、数目完整的优质分裂相。通过查阅文献和笔者长期的实验经验,本研究选取了 4 个影响实验结果的关键因素进行条件优化,分别是秋水仙素的加入时间、低渗时间、固定时间和染色时间。

秋水仙素是一种有丝分裂阻断剂,通过抑制纺锤体的形成来阻止细胞分裂,可使细胞分裂停留在中期,从而得到大量的中期细胞<sup>[7]</sup>。若秋水仙素作用超时,一方面会对细胞产生毒性,影响细胞分裂,使分裂指数减少;另一方面,会使染色体缩短变粗,最终使染色体丢失而导致实验失败。因此,确定好秋

水仙素的作用时间非常重要。通常认为,在终止培养前 3~4 h 内加入秋水仙素。实验期间发现,秋水仙素的作用时间在 1.5~4.0 h 时,虽能在显微镜下找到理想的分裂相,但是,当时间小于等于 2.0 h 时,停滞在中期的细胞数目会减少,并且有相当数量的细胞处于其他分裂时期,这与谢志威等<sup>[8]</sup>报道的秋水仙素加入太少或处理时间偏短,可导致染色体形态偏长或无中期分裂相一致。当秋水仙素加入时间大于等于 3.0 h 时发现,大部分细胞处于分裂中期,但染色体变得又粗又短,不利于观察。而当作用时间为 2.5 h 时,可获得数目多、浓缩适中的染色体。

低渗处理的目的是诱导淋巴细胞吸水胀破,有助于染色体从细胞分散出来。低渗时间过长(45~60 min),会导致染色体长度增加,黏度增大,影响分散程度,也不利于后续的显带。Henegariu 等<sup>[9]</sup>认为低渗处理 10 min 就可以得到理想的结果。因此,低渗时间是本实验成败的一个关键。研究中发现,当低渗时间不超过 15 min 时,绝大部分细胞没有破裂,形态完整,未能释放出核内的染色体(图 B1),偶尔也能看到几条染色体,但数目不够,有的染色体还被细胞膜或细胞质包裹,形态不清,这也许是细胞破裂不充分导致的(图 B2),主要原因是低渗时间不够,大部分细胞没能充分与低渗液相互作用。若低渗时间超过 25 min,则会使细胞过早破裂,导致染色体丢失。当低渗时间调整为 20 min 时,发现很多细胞破裂并释放出染色体,达到了实验要求(图 B3)。

染色体释放出来之后,为了维持其形态,得到一个分散良好的分裂相,需要使用固定液对染色体进行固定操作。通过五个时间梯度的实验发现,固定时间不超过 20 min 时,有的染色体散的太开,不利于观察,或者相邻 2 个细胞的染色体混在了一起(图 C),无法辨别,不利于计数,也加大了后续核型分析的难度。当固定时间为 25 min 时,染色体分散良好,有很多完整的分裂相,且质量较高(图 B3)。

染色是本实验的最后一步,通过 4 个染色时间的尝试,结果显示,染色时间不超过 15 min 时,染色体着色很淡,亮度不够,甚至看不清楚(图 D1),也不美观。当染色时间大于等于 25 min 时,染色体又着色太深,形态不清晰,还会使玻片的背景过深,且不易冲洗,同样对结果有很大影响(图 D2)。最终发现,当这 4 个时间分别为 2.5 h、20 min、25 min 和 20 min 时,能够得到高质量的染色体(图 A1、A2 和 A3)。同时,在满足上述条件的前提下,还应注意以下几点:(1)淋巴细胞培养期间,要经常摇动培养瓶,避免培养基与细胞分层,影响细胞增殖。(2)为了获得分裂指数较多,形态清晰,长短适中,分散良好的染色体,培养时间需在 70~72 h。(3)收集细胞时,要摇匀培养液,然后将细胞和培养液全部转入离心管,否则会造成细胞数量的减少。(4)离心后需弃去上清液的,应尽快除去上清液,否则会引起沉淀溶解,造成细胞丢失。(5)低渗液加入后,必须混匀完全,让细胞与其充分接触,否则会影响染色体的释放。(6)滴片时必须使用冰冻的载玻片,且滴片高度在 30 cm 左右,否则会影响染色体的分散程度<sup>[10]</sup>。

综上所述,经过反复摸索,本研究得到了高质量的中期染色体,这不仅有助于后续的显带和核型分析,也有助于实验教学的顺利开展。然而,外周血染色体制备技术目前还没有统一的质量控制体系,该技术所用试剂的浓度、生产厂家,以及实验室条件和设备等诸多因素参差不齐,再加上人为因素等,均会对染色体的质量产生影响。因此,无论是科技工作者还是医务人员,都应本着相互学习的态度,取长补短,以获得高质量的染

染色体标本。

参考文献

[1] 药泽榕,魏魏,苗聪秀. 外周血淋巴细胞培养制备染色体改良方法的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 1993, 1(2): 45-46.

[2] 赵小平,陈绍坤,黄燕,等. 外周血淋巴细胞培养及染色体制备过程中的问题分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(11): 2108-2112.

[3] 马强,刘青松,蔡燕,等. 外周血淋巴细胞培养及染色体制备的几点体会[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1641-1642.

[4] 任莉萍,李娟,潘亚丽,等. 人的外周血淋巴细胞培养及染色体制作技术[J]. 生物学通报, 2011, 46(3): 54-55.

[5] 徐文瑜,陈彦明,黄月娇. 外周血染色体制备成功方法的

探讨[J]. 中国社区医师, 2013, 15(8): 222-223.

[6] 钟慧军,陆宏. 细胞生物学实验教学指导[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2009: 36-38.

[7] 刘爱生,朱春燕. 外周血淋巴细胞培养及染色体高分辨标本制备方法[J]. 中国优生优育, 2013, 19(2): 82-85.

[8] 谢志威,张晶,李卫凯. 外周血染色体制备改良方法的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 82-83.

[9] Henegariu O, Heerema NA, Wright LL, et al. Improvements in cytogenetic slide preparation; controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing[J]. Cytometry, 2001, 43(2): 101-109.

[10] 侯艳香. 人外周血淋巴细胞培养染色体制备及影响因素[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(7): 874-875.

(收稿日期:2015-03-18 修回日期:2015-05-20)

# 经肛门结肠注气寻找结肠粪性穿孔隐匿性破口 1 例

舒 东,钟兴玲(重庆市忠县中医院普外科 404300)

【关键词】 结肠粪性穿孔; 手术; 技巧

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.071 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2015)15-2298-02

结肠粪性穿孔(SP)是指因粪石或粪块压迫引起肠壁缺血、形成溃疡,继而发生的结肠穿孔<sup>[1-2]</sup>。SP的临床发生率低,但病死率却很高。近年来,关于SP的研究主要集中于SP的诊断与治疗方式。腹部CT检查已经成为公认比较好的检查手段,手术成为了治疗SP的主要方式。通过提高对SP的认识,缩短发病到接受手术治疗的时间,这类患者最终常常是可以治愈的。然而,也有存在极少数SP破口位置比较隐匿的情况,术中常规探查很难发现,常让术者束手无策。盲目手术探查对患者创伤大,故需运用相应技巧。忠县中医院成功在术中使用生理盐水浸泡结肠加尿管经肛门结肠注气的方法,发现SP隐匿破口病例1例,现将病例报道如下。

## 1 临床资料

1.1 一般资料 患者,男,65岁,因“突发左下腹疼痛约8h”入院。约8h前患者用力排大便时突感左下腹剧痛,后呈持续性疼痛,渐进性加重。伴有恶心,未呕吐,无腹胀。既往史有慢性便秘史。入院查体:患者腹平,腹肌紧张,压痛,以左下腹为主,反跳痛不明显。腹部X线透视:腹腔未见游离气体。B超:膀胱直肠陷凹少量积液。血常规:白细胞和粒细胞百分比(N%)正常。入院诊断为急腹症:弥漫性腹膜炎?胃肠穿孔?结肠肿瘤?予以静脉常规输液、扩容、抗感染治疗,完善急诊术前准备。

1.2 治疗方法 将患者送入手术室,在持续硬膜外麻醉下行下腹正中切口予以腹腔探查。术中见:下腹部少许浑浊积液,肠祥间有一5mm×4mm×3mm大小粪粒。吸尽积液,常规探查腹腔脏器未发现异常,小肠、结肠、直肠无局部炎性水肿,未发现破口。手术停顿约5min后,术者嘱台下护理人员用一小号尿管插入患者肛门,术者将温生理盐水2000mL倒入患者腹腔,肠管浸泡于生理盐水中,台下护理人员用50mL空针经尿管持续向肠管注气,术者观察浸泡在生理盐水中的肠管发现在乙状结肠一肠脂垂下有气泡冒出,分离开肠脂垂见肠壁有一小破口,直径约4mm,破口边缘无明显水肿及硬结,邻

近肠断无病变。拔出注气尿管,吸尽腹腔液体,予以穿孔段乙状结肠外置造口,关腹,结束手术。术后予以强效抗生素联合应用,补液,持续胃肠减压,以及营养支持治疗。术后患者恢复良好,术后3月再次行二期肠切除肠吻合术。

## 2 讨 论

2.1 概况与发病机理 SP是一种少见的急腹症,多见于老年人。该病常无临床特异性表现,易漏诊、误诊,延误治疗,病死率极高<sup>[3-4]</sup>。其病因主要与慢性便秘有关,腹内压突然升高可能是其发生的诱因。有学者认为避免SP发生的最好的方式是早期识别与治疗老年人便秘<sup>[5]</sup>。另外,一些基础疾病、使用一些药物和不当的生活习惯可能是该病发生的危险因素<sup>[6-8]</sup>。因为这类患者常有慢性习惯性便秘史,慢性便秘可能是粪性溃疡的主要致病因素。其发病机制概括起来,主要在于干结粪块直接机械压迫、粪块淤积导致肠内压升高的直接和间接作用引起了肠黏膜缺血、溃疡和穿孔。SP好发于乙状结肠和直肠乙状结肠交界处,因为此处易形成粪块,且结肠远端血供较差,且乙状结肠和直肠乙状结肠管腔最窄,肠腔压力高<sup>[9]</sup>。

2.2 诊断与治疗 SP治疗的关键在于尽可能缩短术前准备时间,尽早手术<sup>[10]</sup>。然而其术前诊断常常是临床上的一道难题,误诊及延误治疗的情况时有发生。主要原因可能在于该病临床不多见,临床表现不特异,临床医生缺乏对SP的认识和重视程度不够<sup>[11-12]</sup>。近年来,影像学检查方法的发展在SP诊断上的运用,在一定程度上提高了SP的阳性诊断率<sup>[13-15]</sup>。结合既往史、诱因、临床表现和影像学检查辅助快速诊断SP,但事实上其术前确诊率仍然很低,最终诊断大多数在术中才能确定。

当临床上高度怀疑SP后,早期手术和彻底清洗腹腔对于患者来说尤为关键。因为SP发生后,可能出现肠内容物外漏污染腹腔,引起继发性腹膜炎、全身感染、感染性休克,甚至继发多器官功能障碍综合征导致死亡,这也是SP高病死率的重要原因之一<sup>[16]</sup>。而手术是目前最直接有效的去除(下转封3)