DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.039

意义。为了达到诊断上的准确性，常需用特殊染色方法把基底膜清楚地显示出来。六胺银染色依靠1,2乙醇基团氧化，产生游离醛这一化学反应，进而醛再还原银溶液，在肾小球毛细血管和肾小管的基底膜上产生银沉淀物。我们用六胺银染色时，常遇到染色时间、染色温度、染液浓度等不好掌握，染出来的切片常有染色浅淡或过染，更因为肾小管基底膜着色比肾小球毛细血管丛基底膜着色要早，出现小球内基底膜着色浅或不着色，而肾小管和球囊壁的基底膜色深或过染等现象。本实验通过对六胺银显示肾组织基底膜病理改变方法的研究发现，将胺银原液稀释后，在60 ℃烤箱中染1.5 h和50 ℃中染2~3 h之切片，肾小球毛细血管丛和肾小管基底膜结构层次清晰，染色均匀无深浅不一现象，染色效果好。胺银原液稀释后使用，更利于镜下控制，即使染色时间稍长也不会出现过染现象。这说明只要染液浓度、染色温度和时间掌握得当，能很好地显示肾基底膜病理改变。本方法克服了传统方法中因胺银原液浓度高造成的必须镜下控制染色，且稍不注意就会出现过染以及肾小球毛细血管丛基底膜不易着色的缺点[1,2]。我们虽降低了胺银原液在染液中的浓度，但并不影响基底膜的着色，且不需镜下控制染色即可使肾小球毛细血管丛基底膜着色更清晰，同时也能免除一旦过染又需重染的麻烦。在实际工作中可根据自己的工作日程从时间和温度上灵活选择，既可选择60 ℃烤箱中染1.5 h，也可选择50 ℃温箱中染2~3 h。本法简便易行，染色效果佳，值得推广应用。

关键词：肾；基底膜；银染
中图法分类号：R446 文献标识码：B

参考文献：

[1] 龚志锦，詹熔洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海：上海科学技术出版社，1994. 360—361.
[2] 张 哲，陈 辉. 实用病理组织染色技术[M]. 沈阳：辽宁科学技术出版社，1988. 183.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2000)12-1211-02

技术方法

一种适用于流式细胞术的简便红细胞裂解法

A simple method of erythrocyte fragmentation for flow cytometer examination

汪志文，王 华，周学武 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所分子生物学中心，重庆 400042）

提 要：目的 探讨一种简便、快捷的红细胞列解法，以适宜应用流式细胞仪对白细胞亚群进行检测和分选。方法 采用常规试剂配置不同浓度应用液，按步骤完成红细胞裂解过程，上机检测。同时采用密度梯度离心法提取单核细胞和粒细胞，比较两者上机检测的结果。结果 在流式细胞仪检测的细胞点图上，可见采用红细胞裂解法处理的标本白细胞成簇分布，淋巴细胞、单核细胞、粒细胞群清晰可辨，通过测定各群细胞上标记的特异性荧光，可进一步分离出淋巴、单核和粒细胞的亚群，细胞纯化程度高。采用密度梯度离心法纯化的粒细胞或单核细胞，在细胞点图上可见细胞散在分布，不成群，纯化程度低。其原因可能是该方法中长时间离心、改变血液渗透压、反复离心洗涤等步骤影响了白细胞的形态结构有关。结论 本实验介绍的红细胞裂解法满足了白细胞流式细胞仪检测分选要求，价格低廉，是一种简便快捷、经济实用的白细胞纯化分选方法。

作者简介：汪志文(1963—)，女，贵州省贵阳市人，实验师，主要从事生化实验方面的研究，发表论文6篇。电话：(023)68757465

收稿日期：2000-05-15；修回日期：2000-10-10

用流式细胞技术检测白细胞亚群中某一特定抗原的方法，已越来越多地被科研工作者采用。目前大多数科研人员均采用梯度离心法，纯化某一亚群白细胞，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

再标记荧光抗体进行流式细胞术检测。由于反复改变密度，反复离心，造成细胞形态改变大，细胞破碎、丢失多，分离细胞的数量和纯度均较低，对流式细胞术检测也有诸多弊端。笔者在使用流式细胞技术进行白细胞亚群特定抗原检测时，摸索出一种简便、快捷的红细胞裂解法。

1 材料与方法

1.1 红细胞裂解法

1.1.1 试剂配制 原液1号：10 g葡萄糖＋0.6 g磷酸二氢钾＋3.58 g磷酸氢二钠($7H_2O$)＋20 ml 5 g/L酚红溶液，加双蒸水定容至1 000 ml。原液2号：1.86 g氯化钙($2H_2O$)＋4.0 g氯化钾＋80 g氯化钠＋1.04 g氯化镁＋2.0 g硫酸镁($7H_2O$)，加双蒸水定容至1 000 ml。应用液有3种，1#：10 ml原液1号＋10 ml原液2号，加双蒸水定容至100 ml。2#：20 ml原液1号＋20 ml原液2号，加双蒸水定容至100 ml。3#：1 ml原液1号＋1 ml原液2号，加双蒸水定容至100 ml。

1.1.2 红细胞裂解 取100 μl抗凝全血，加2 ml应用液3#，混匀15～20 s；加2 ml应用液2#，混匀15～20 s；加4 ml应用液1#，混匀15～20 s；300× g离心2 min，弃上清；收集沉淀，加PBS缓冲液，制成白细胞悬液，备用。

1.1.3 荧光标记 采用法国Immunotech公司生产的CD11a荧光抗体，该抗体可与人粒细胞亚群中特异性的CD11a受体结合，而不能标记粒细胞中其它亚群的细胞。取白细胞悬液100 μl，加荧光抗体20 μl，混匀，室温放置15 min；加pH 7.4磷酸缓冲液500 μl，混匀，室温放置10 min；待上机检测。

1.1.4 检测 采用Elite ESP型流式细胞仪(美国Coulter公司)进行白细胞检测，根据90°和180°折光率、大小、表面光滑度及荧光标记差异区分淋巴细胞(A)、单核细胞(C)、粒细胞(B)群及相应亚群中特异性荧光标记细胞含量。

1.2 密度梯度离心法[1]

1.2.1 试剂配置 分层液：用双蒸水将600 g/L泛影葡胺稀释浓度至340 g/L，其密度为1.200；用双蒸水将聚蔗糖(MW400000)配成90 g/L溶液，密度为1.020；将340 g/L泛影葡胺和90 g/L聚蔗糖溶液按10∶24份混合，测定并调整其密度为1.077，置4 ℃保存。另备Hanks液，肝素。

1.2.2 操作步骤 取肝素抗凝全血加等量Hanks液，混匀；加分层液于另一试管中，其量约为血量的1/2，用吸管将血沿试管壁缓慢加于分层液面上；置于水平离心机中400× g离心25～30 min，可看到细胞已分层，从上到下依次为血浆层、单个核细胞层、分层液、粒细胞、红细胞，单个核细胞层和粒细胞层呈白膜状，用尖吸管小心吸取单个核细胞层或粒细胞层，置于另一试管中，加入适量含有10%小牛血清的Hanks液，混匀，150× g离心10 min，弃上清；重新加入同样的Hanks液，将沉淀细胞悬浮后再次离心，同法洗涤2次；收集沉淀细胞，加入PBS缓冲液，制成白细胞悬液，备用。

1.2.3 荧光标记及检测同红细胞裂解法。

2 结果

在流式细胞仪检测的细胞点图上，可见采用红细胞裂解法处理的标本白细胞成群分布，见图1。$CD11_a$荧光标记B群细胞，根据细胞上标记的特异性荧光，还可分选出相应的亚群细胞和含量计算，细胞纯化程度高。采用密度梯度离心法纯化的粒细胞或单核细胞，在细胞点图上可见细胞散在分布，不成群，无明显分界，不便于分选和亚群细胞含量计算，纯化程度较低。进口红细胞裂解液(Immunotech公司)处理的细胞，白细胞亚群成簇分布，清晰可辨，与本实验结果无差别(目测法)。

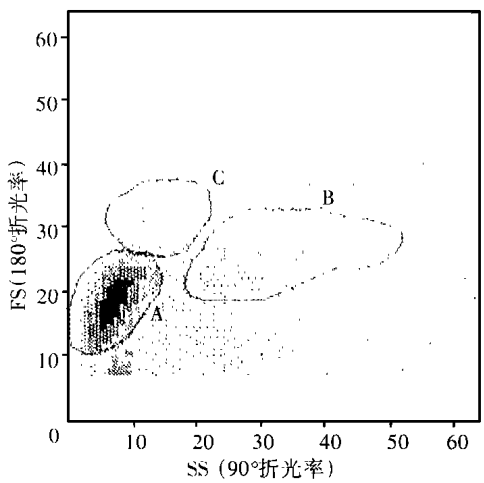


图1 白细胞的流式细胞仪测定图(红细胞裂解法)

A：淋巴细胞；B：粒细胞；C：单核细胞

3 讨论

流式细胞仪借助细胞形态结构、大小、表面电荷、折光率的差异将白细胞区分为淋巴细胞、单核细胞和粒细胞，它具有简单、快捷和分离纯度高等优点[2,3]。待检样品细胞悬液的制备是影响流式细胞仪检测结果的关键，本研究结果显示，采用红细胞裂解法获取的白细胞样本在流式细胞仪上识别率高，不同细胞成群簇状分布，与进口红细胞裂解液处理的样本无差别(目测法)，操作人员将细胞群用门设定方式确定，所需的细胞群即可依据这群细胞所标记的特异性荧光实现百分

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

率检测和分选，分选细胞纯度高，细胞碎片等杂质较少。

密度梯度离心法获取的白细胞在流式细胞仪上的识别结果较差，最后纯化出的细胞在流式细胞仪上检测不到聚集的细胞群，特异荧光细胞的检测就会出现较大误差。

目前市售进口的红细胞裂解液（如法国 Immunotech 公司生产的红细胞裂解液），价格昂贵，大部分科研工作者难以承受，故仍用密度梯度离心法。本实验介绍的红细胞裂解法满足了白细胞检测分选要求，流式细胞仪细胞点图上白细胞分群清晰，与我们以前使用的法国 Immunotech 公司裂解试剂所得结果相似。本方法使用的试剂均为普通常用试剂，其价格远远低于进口成品，不失为一种简便快捷、经济实用的白细胞纯化分选方法。

关键词：流式细胞术；红细胞；裂解
中图法分类号：R446.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 郑德先，吴克复，诸建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1999. 5—24.
[2] 汪 谦. 现代医学实验方法[M]. 北京：人民卫生出版社，1997. 887—898.
[3] Peng L M, Liu J J. A novel method for quantitative analysis of apoptosis[J]. Lab Invest, 1997, 77(4): 547—555.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2000)12-1213-02

技术方法

磁共振动态扫描方法改进

Study on the improvement of dynamic MR scanning

王玉锦，王文献，张 冬 （第三军医大学附属新桥医院放射科，重庆 400037）

提 要：目的 在 GE Signa Contour 0.5T 扫描仪上建立磁共振动态扫描方法，并探讨其可行性。方法 根据脑肿瘤的特点及文献复习选择扫描序列和参数，建立扫描方法，并应用于 20 例脑肿瘤患者。结果 成功地对 20 例脑肿瘤病人进行了 MRI 单层动态扫描。而且发现不同肿瘤其曲线形态不一样。结论 本方法简单可行，而且 MRI 动态扫描有助于脑肿瘤的定性诊断。

MRI 动态扫描是近几年一种新兴的扫描方法，不同厂家、不同场强的 MRI 仪，其动态扫描方法不完全相同。近 2 年来，我们对脑肿瘤的 MRI 单层动态扫描作了一些工作，在没有固有软件的情况下，总结出了一套比较切实可行的扫描方案，现报告如下。

1 材料与方法

头颅常规 MRI 轴位扫描，根据病变的具体情况，个别病例辅以冠状位或矢状位扫描。

根据常规扫描图像，选取病变实体的中心层面，并设置 MRI 单层动态扫描程序。序列设置：二维快速毁损梯度回波序列（2D, FSPGR）。打开“Imaging Option”，点亮“Fast、Sequential、Multi-phase、Variable-Bandwidth”按钮，接收。随后打开 Multi-phase，设置单层每次扫描次数，我们通常设置为 5。其它参数设置：层厚 8 mm，视野 22 cm，矩阵 256×192，采集次数为 1，翻转角 80°，TE/TR=Minum/12.3。改变 Bandwidth（带宽），调整单层 5 次扫描的时间，如带宽为 6.94，扫描时间为 8 s；带宽为 4.17，则扫描时间为 10 s。我们将此 5 层的扫描时间称为扫描周期。为便于计算，带宽通常设置为 4.17，扫描周期时间为 10 s。

先预扫描，然后扫描 1 个扫描周期，获取未增强的图像，形成时间-信号强度或对比增强率-时间曲线的基线，见图 1。

作者简介：王玉锦（1951—），女，副主任技师，主要从事投照技术及神经影像学方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：(023) 68755000-74676

收稿日期：2000-04-20；修回日期：2000-07-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net