DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.039

于动脉血逆向灌入头静脉,血流阻力较大,对心脏的容量负荷影响相对要小。但该法可使手背静脉扩张,对病人心理因素压力较大,加之少部分病人可引起食指及拇指肿胀、瘀血。所以,不宜常规采用,仅限于头静脉近心端闭塞的情况下施行,为了减轻并发症和病人的心理压力,可根据情况随时改为桡动脉近心端与扩张的表浅静脉近心端吻合。

人体可供作动静脉内瘘的血管是非常有限的,细心保护和充分利用头静脉和桡动脉建立动静脉内瘘,对 CRF病人显得十分重要。该法为头静脉近心端闭塞的病人建立动静脉内瘘提供了一种切实可行的方法。

关键词 血液透析;血管通路

中图法分类号 R69.2

参考文献

1 缪兴文,袁发焕,廖立生.钛轮钉吻合建立动静脉内瘘的临床应用体会.第三军医大学学报,1994;16(3):214
2 高 伟.血液透析用血管通路的现状和进展.肾脏病与透析肾移植杂志,1992;1(2):154
3 肖 申.血液透析中的血管通路问题.肾脏病与透析肾移植杂志,1993;2(1):95

(收稿:1997-01-05;修回:1997-10-20)
(编辑 张大春)

分离的鼠肝细胞不等渗培养条件下的容积测定

Determination of isolated liver cell volume under the condition of aniso-osmotic culture

赵利斌* 薛 强** 郝 飞 陈 斌** (第三军医大学附属西南医院传染病中心)重庆,400038

提 要 目的:探讨一种不等渗培养条件下,分离的鼠肝细胞容积测定的简便、实用的方法。方法:用 F-800全自动血细胞计数仪测定肝细胞容积。结果:暴露于高渗和低渗培养基中的鼠肝细胞容积于十几分钟分别发生变化为 61.3± 2.9 fl和 121.4± 2.8 fl,与等渗培养组肝细胞 68.4± 4.2 fl比较差异非常显著($P<0.001$)。结论:F-800仪测定肝细胞容积的方法简便、直观,符合进一步实验的要求。

国外近年研究提示,肝细胞容积(Liver cell volume)改变对细胞的多种代谢功能有着不同程度的影响,而肝细胞容积的测定则是深入研究细胞代谢功能的基础。鉴于目前肝细胞容积测定方法复杂,费用较高,且不能直接反映每个肝细胞的容积,我们尝试了用 F-800全自动血细胞计数仪(简称 F-800仪,日本东亚株式会社制)测定肝细胞的容积,取得了较好的结果。该法简便、直观、准确、实用、费用低,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 鼠肝细胞分离

取 180~ 200 g健康雄性 Wistar大鼠,用我专科中心所建立的鼠肝细胞分离法[1]分离鼠并提取肝细胞,提取后的肝细胞用 1%台盼蓝染色证实其活性在 90%以上培养备用。

1.2 不等渗培养基制备

以美国 RPMI 1640为基本配方,通过加减 NaCl 60 mmol/L,其它成分不变,配制出不同渗透压的培养基,见表 1

表 1 不等渗培养基氯化钠的含量(C_B/mmol·L^{-1})

成分	培养基渗透压(mOsm/L)		
	210	320	450
Na^+	91	142	250
Cl^-	80	128	190

每批标本检测前,培养基渗透压用美国生产的超微量渗量计检测核准。

1.3 原代鼠肝细胞培养

将活性 90%以上的纯鼠肝细胞,以 10^7/ml(0.5 ml/管)接种于等渗的 1640培养基中,置 37℃,5% CO_2培养箱中孵育 16~ 20 h,然后用前述 3种不同渗透压培养液分别洗涤细胞 2次,再分别培养 10~ 15 min,1%台盼蓝染色证实肝细胞活性在 90%以上后,上机检测。

1.4 肝细胞容积的测定

根据鼠肝细胞与人红细胞均是不规则球形细胞,直径比较接近,用 F-800仪测定肝细胞容积。先用 F-800配套进口试剂直接稀释肝细胞标本至(0.6~ 0.8)× 10^{12}/L,立即上机检测,所得

* 赵利斌,女,45岁,副主任医师,现在解放军 161医院传染科 武汉,430000
** 检验科 重庆,400038

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

肝细胞容积为平均值,用 fl表示。由计算机打印出肝细胞容积图像与蜂形。

2 结果

2.1 鼠肝细胞和人红细胞的容积图像与峰形比较

结果发现,鼠肝细胞在(0.6~0.8)×10^{12}/L细胞数范围内,低渗、等渗和高渗状态下所测肝细胞容积的图像和峰形与正常人红细胞十分接近。但低渗培养肝细胞容积图像所占面积最大,高渗面积最小,正常人红细胞面积介于低渗与等渗培养肝细胞之间。

2.2 F-800仪测鼠肝细胞容积稳定性分析

2.2.1 F-800仪测定人血红细胞容积稳定性　用四川省临检中心全血质控物(批号:961126),对人红细胞容积作重复性测试,变异系数为1.2%,平均≤2%,符合精密分析要求,并提示稳定性好。

2.2.2 F-800测鼠肝细胞容积

2.2.2.1 批内差异　在每批标本测试中,随机抽取一份标本作批内重复性测试20次(加入不同渗透压培养液后10~15 min内),变异系数为1.6%~2.0%,平均≤2%,达到了精密分析与精密度要求。

2.2.2.2 批间差异　因肝细胞培养条件所限,加入培养条件肝细胞活性会逐渐下降,因此,每次测试前均用全血质控物进行校准。全血质控物红细胞容积测定,批间差异为1.6%,故可以间接反应肝细胞容积测定是稳定的。

2.3 不等渗培养条件下对鼠肝细胞容积的影响,见表2

表2 不等渗培养对鼠肝细胞容积的影响

渗透压(mOsm)	n	$\bar{x}\pm s$
210	15	68.4±4.2△
320	15	121.4±2.8
450	15	61.3±2.9△

△:$P<0.001$与等渗组比

3 讨论

肝细胞容积随不同渗透压培养在短时间内发生变化的现象已有较多报道,这些改变对肝细胞功能产生很大的影响[2-5]。测定肝细胞容积的方法,一般采用[^{14}C]尿素与[^{3}H]菊粉两种同位素分别标记细胞的不同部分,然后,用液相闪烁计数仪分别测定上清及沉渣中同位素的放射活性,最后计算出每毫克细胞蛋白中细胞容积的微升数(ml/g pr)[6]。该方法虽能精确反映单位重量内细胞的含水量,但不能直接反映每个肝细胞的真实容积。而且试剂贵,操作复杂,受多种条件的限制。鉴于 F-800仪能测定全血细胞的大小与容积,可测定红细胞容积范围的技术参数大(125~250 fl),本试验所用 F-800仪设置红细胞容积参数为40~160 fl[7],其原理是利用细胞脉冲在颗粒分布分析(Particle distrbution analysis, PDA)电路中与每一大小水平作比较而获得细胞容积信息。鼠肝细胞直径与人红细胞直径相差不大,而且均为不规则球形细胞,我们认为该仪器能够精确反应出鼠肝细胞的平均容积。因此利用人红细胞容积的检测通道,来检测鼠肝细胞容积是合理的。经过反复试验发现,将鼠肝细胞暴露于450 mOsm培养基中,十几分钟肝细胞容积较对照组缩小为54.8~64.5 fl(对照组59.9~80 fl),其变化率为5.7%~19.88%之间,平均10.38%,与文献[2]报道的±5%~15%是相符的。然而暴露于210 mOsm中的鼠肝细胞窖发生了显著变化117~130.8 fl,变化率高达71.2%~91.2%,平均77.49%,远远超出了文献报道。这可能与本试验肝细胞活性高(95%),使用的渗透压较文献报道的(220~277 mOsm)低有关。

试验应注意问题:① 所测肝细胞数量应控制在(0.6~0.8)×10^{12}/L间,以保证结果的一致性。② 为保证肝细胞对不等渗暴露反应灵敏,肝细胞活性最好在95%以上,肝细胞活性越低,其容积变化范围越小。③ 肝细胞纯度要高,用不同速度低温离心法将红细胞及其它小颗粒洗净,以免干扰结果。④ 一旦加入培养条件,应在10~15 min进行检测,过短过长对容积检测结果均有影响。总之,我们认为用 F-800仪测定肝细胞容积是简便可行的,它较以前通过测定直径及同位素标记法推测肝细胞容积更为实用,为深入研究肝细胞容积变化导致的一系列代谢改变提供了可靠直观的方法。

关键词　肝细胞容积;不等渗
中图法分类号　R333.4

参考文献

1 王宇明,陈国致,董家鸿等.分离肝细胞的一种体外灌流法.中华消化杂志,1994;14(3):175
2 Haussinger D, Schliess F. Cell volume and hepatocellular function. J Hepatol, 1995;22:94
3 Graf J, Haussinger D. Ion transport in hepatooytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone action and metabolism. J Hepatol, 1996;24(suppl 1):53
4 Offensperger W B, Offensperger S, Stoll B *et al*. Effect of anisotonic exposure on duck hepalilis virus replication. Hepatology, 1994;20:1
5 Häussinger D, Lang F, Gero R W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. Am J Physiol, 1994;

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

267: E342
6 Quinlan P T, Thomas A P, Armston A E *et al*. Measurement of the intramitochondrial volume in hepatocytes without cell disruption and its elevation by hormones and valinomycin. Biochem J, 1983; 241(2): 395
7 Thurattle G A, Adrados C, Ebbe S *et al*. Mean platelet volume. The need for a reference method. Am J Clin Pathol, 1984; 81: 769

(收稿: 1997-03-24;修回: 1998-01-20)
(编辑 张大春)

PCR检测尿液中乙肝病毒 DNA及意义

Using PCR to detect HBV-DNA in urine

李碧清* 邓光贵 (第三军医大学附属大坪医院检验科) 重庆, 400042

提 要 目的: 比较乙型肝炎病人血清及尿液中乙肝病素 DNA情况。方法: 经 EIA法检测证实 HBV感染阳性病人血清及尿液用毛细管 PCR法检测 HBV-DNA并再用 EIA法检测尿液 HBV标志。结果: 乙肝 5项检查 HBeAg阳性组、HBeAb阳性组、全阴性组血清中的 HBV-DNA阳性率分别为 92.5%、50%、14.3%;其对应尿液的 HBV-DNA阳性率分别为 33%、25%、0。结论: 血清 HBeAg阳性病人,血清和尿液中的 HBV-DNA阳性检出率高; HBeAg阴性、HBeAb阳性组的病人血清 HBV-DNA阳性提示血清 HBeAb阳性病人可能仍具传染性。

乙型病毒性肝炎是常见传染性疾病。文献报告血清中乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA)阳性,提示患者肝脏存在活动性乙型肝炎病毒(HBV)复制,并且有较高的传染性[1]。当血清中 HBV-DNA标志物阳性时,尿液中是否会同时检出 HBV-DNA尚未见报告。本研究对经酶免疫法(EIA)检测血清 HBsAg、HBeAg、HBcAb阳性及 HBV 5项标志全部阴性的病人,用 EIA法检测其尿液 HBV标志物和用聚合酶链反应(PCR)法检测其血清、尿液 HBV-DNA进行比较,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

49例血清及 49例尿液标本来自 1995年 5月至 6月中旬我院门诊和住院病人,且血清和尿液为其对应标本。病人中男性 29例,女性 20例。最小年龄 12岁,最大年龄 71岁,大多数为 18~48岁。经 EIA法检测血清 HBsAg、HBeAg、HBcAb阳性者为 1组(简称 HBeAg阳性组); HBsAg、HBeAb、HBcAb阳性者 8例为 1组(简称 HBeAb阳性组); HBV 5项标志全部阴性 14例为阴性组。将 3组各自对应的尿液用同样的试剂 EIA法检测其 HBV标志。取血清、尿液标本不加防腐剂及时存放于冰箱冷冻室内保存待检测用。

1.2 方法

1.2.1 EIA法 试剂盒购于上海科华公司,批号为: 950425临界值血清由卫生部临检中心提供,批号为: 950612

1.2.2 PCR检测法 由空军总医院临床分子生物学研究室提供的毛细管 PCR试剂盒。引物是对 HBV core基因序列设计,扩增片段为 423 bp,能扩增所有亚型 HBV,在严格防污染条件下,按使用说明操作和判断结果。尿液取样 200μl,血清取样 100μl,反应体系在毛细管 PCR扩增仪(宝神电子技术公司)上循环 40次,产物用琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色法紫外光检测[3]。

2 结果

2.1 PCR法检测 3组血清和尿液的阳性率,见表 1

表 1 PCR法检测不同人群血清和尿液 HBV-DNA的结果

组别	例数	血清 HBV-DNA阳性例数(%)	尿液 HBV-DNA阳性例数(%)
HBeAg阳性组	27	25(92.5)**	9(33.0)**
HBeAb阳性组	8	4(50.0)*	2(25.0)*
阴 性 组	14	2(14.3)	0(0)

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$与阴性组比较

* 李碧清,女,47岁,副主任技师

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