

3 讨 论

通常情况下, Th17 细胞处于静止状态, 所以很难检测到。笔者分别将 PBMC 标本和全血标本进行刺激培养后检测 Th17 细胞的比例, 发现这 2 种标本的检测效果接近。这表明可以用全血进行刺激培养来检测人体外周血中的 Th17 细胞。用全血直接进行刺激培养减少了提取 PBMC 的繁琐步骤, 而且用量很少, 只要 100~200 μ L 全血即可。这使得在做临床试验时标本的留取变得容易, 特别是对儿童来说, 标本的收集变得简单易行。

有丝分裂原是非特异性多克隆活化剂, 能使某群淋巴细胞中的所有克隆都被激活。PMA 是有丝分裂原的一种, 能与多种细胞膜糖基分子等促有丝分裂原受体结合, 促使细胞活化并诱导细胞分裂。T、B 淋巴细胞表面都有多种有丝分裂原受体, 淋巴细胞在体内外接受有丝分裂原的刺激后, 静止的淋巴细胞向母细胞转化, 这种转化过程对研究淋巴细胞功能变化甚为重要。在实践中, 常利用淋巴细胞对有丝分裂原刺激的反应性来评价机体的免疫功能状态。本研究发现, 对于全血标本来说 PMA 在 200 ng/mL 刺激的效果最好, 但如果再增加其浓度, 检测结果反而会会出现下降的趋势, 可能是因为在高浓度的 PMA 刺激下, Th17 细胞不能耐受其毒性作用而导致分泌 IL-17 的功能减退。

通过分析不同的培养时间对 Th17 细胞比例的影响, 发现培养 9 h 的标本 Th17 细胞比例最高, 但和培养 6 h 的标本相比, Th17 细胞比例的差别不大, 从节省时间的角度考虑, 推荐选择培养 6 h 后检测。

值得注意的是, 影响流式细胞仪检测结果的因素较多, 比如本研究中提到的 PMA, 不同批号的试剂之间刺激效果可能不同; 相同批号的试剂随着时间的推移和冻融次数的增加刺激效果会减弱。因此, 本研究中关于 PMA 浓度和培养时间的探讨所得结论只是针对本研究的, 建议其他研究在正式进行试验之前重新探索, 建立新的条件。

Th17 细胞产生的 IL-17 作为一种炎症介质在机体中起到很大作用, 可以诱导一系列的细胞因子、趋化因子的表达, 介导

炎症细胞的局部浸润和组织损伤^[8]。本研究建立了全血检测 Th17 细胞的方法, 该方法简单适宜, 为临床上对 Th17 细胞的进一步研究提供了便利。

参考文献

- [1] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [2] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(5): 337-348.
- [3] Bachmann M, Horn K, Rudloff I, et al. Early production of IL-22 but not IL-17 by peripheral blood mononuclear cells exposed to live *Borrelia burgdorferi*: the role of monocytes and interleukin-1[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(10): e1001144.
- [4] Jones GW, Stumhofer JS, Foster T, et al. Naive and activated T cells display differential responsiveness to TL1A that affects Th17 generation, maintenance, and proliferation[J]. FASEB J, 2011, 25(1): 409-419.
- [5] Dölff S, Quandt D, Wilde B, et al. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R150.
- [6] Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, et al. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN- γ -producing cells with distinct properties from the Th1 lineage[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 679-687.
- [7] Li J, Xiang X, Li W, et al. Change and significance of peripheral blood Th17 cells in patients with acute asthma[J]. J Central South Univ (Med Sci), 2010, 35(2): 129-133.
- [8] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. Immunity, 2004, 21(4): 467-476.

(收稿日期: 2012-04-12)

TCT 联合 HC2 在宫颈癌筛查中的临床应用

王金华¹, 宋光耀^{2△}, 刘英霞¹

(1. 大连市第二人民医院检验科, 辽宁大连 116012;

2. 大连市妇产医院病理科, 辽宁大连 116033)

摘 要:目的 探讨薄层液基细胞学检测方法(TCT)联合第二代杂交捕获(HC2)在宫颈癌筛查中的临床应用。方法 对照分析 785 例患者的 TCT、HC2 及组织学检查的结果。结果 TCT 诊断为非典型鳞状上皮细胞不能明确意义(ASC-US)、非典型鳞状细胞, 不排除上皮内高度病变(ASC-H)、鳞状上皮内低度病变(LSIL)、鳞状上皮内高度病变(HSIL)、鳞状细胞癌(SCC), 其组织学阳性率随病变程度的增加而升高; 与组织学结果比较, HC2 阴性符合率为 99.44%, 阳性符合率为 53.23%, 二者比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。TCT 与 HC2 联合时, 两种检测方法的结果一致时, 其与组织学结果的符合率更高。结论 TCT 与 HC2 联合应用, 可以提高宫颈癌及癌前病变筛查的准确率, 并可为后期诊治提高可靠依据。

关键词: 宫颈肿瘤; 薄层液基细胞学; 第二代杂交捕获法; 人乳头瘤病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)17-2119-03

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发生与人类乳头瘤病毒(HPV)感染密切相关。薄层液基细胞学检测方法(TCT)是目前国际上最先进的一种宫颈癌及癌前病变细胞学

检查技术, 现已广泛应用于宫颈癌变的筛查^[1]。第二代杂交捕获技术(HC2)由 Digene 推出, 其利用分子生物学技术在 DNA 水平直接检测高危型 HPV, 其临床敏感度很高, 在一定程度上

△ 通讯作者, E-mail: sgy5615@sohu.com。

弥补了 TCT 的不足^[2]。本研究对照分析了 785 例患者的 TCT、HC2 及组织学检查结果,以评价 TCT 与 HC2 联合应用在宫颈癌筛查中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 1 月至 2011 年 6 月间在本院门诊就诊的 785 例宫颈病变患者,年龄 21~74 岁,中位年龄 42 岁,均接受 TCT、HC2 及组织学检查。

1.2 方法

1.2.1 TCT 检测 采用专用宫颈刷分别收集宫颈外口和颈管的脱落细胞,放入 ThinPrep 细胞保存液中,经 ThinPrep 2000 系统程序化处理后,制成薄层细胞涂片,95%酒精固定,巴氏染色。TCT 诊断标准采用 2001 年国际癌症协会推荐的 TBS 分级系统^[3]。

1.2.2 HC2 检测 应用美国 Digene 公司制造的 HC2-HPV-DNA 基因杂交信号放大系统,测定试剂盒购于上海莱特公司,标本的采集及检测按试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 以非典型鳞状上皮细胞(ASC)及以上病变为 TCT 阳性,HPV 感染和宫颈上皮内瘤变(CIN)及以上病变为组织学阳性,标本中检出的 HPV DNA ≥ 1.0 pg/mL 为 HC2 阳性。应用 SPSS 11.5 软件,率的比较应用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCT 结果与组织学结果比较 785 例患者,157 例 TCT 提示阳性,阳性率为 20.0%(157/785)。TCT 诊断为 ASC 不能明确意义(ASC-US)、ASC 不除外上皮内高度病变(ASC-H)、鳞状上皮内低度病变(LSIL)、鳞状上皮内高度病变(HSIL)、鳞状细胞癌(SCC),其组织学阳性率随病变程度的增加而升高,分别为 51.78%(29/56)、86.67%(13/15)、98.04%(50/51)、100.00%(32/32)、100.00%(3/3)。LSIL、HSIL、SCC 的 TCT 结果与组织学结果比较,符合率分别为 70.58%(36/51)、78.13%(25/32)、66.67%(2/3),三者比较差异无统计学意义($P > 0.05$);TCT 阴性符合率为 98.72%(620/628)。

2.2 HC2 结果与组织学结果比较 785 例患者中,537 例 HC2 检测结果阴性,阴性率为 68.41%(537/785),248 例 HC2 结果阳性,阳性率为 31.59%(248/785);与组织学结果比较,阴性符合率为 99.44%(534/537),阳性符合率为 53.23%(132/248),二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 TCT 联合 HC2 检测结果与组织学结果比较 TCT 与 HC2 均为阴性者 509 例,与组织学结果比较,符合率为 99.80%(508/509),略高于 TCT 和 HC2 各自与组织学结果的阴性符合率,分别为 94.11%(112/119)、92.86%(26/28),但差异无统计学意义($P > 0.05$);TCT 与 HC2 均为阳性者 129 例,与组织学结果比较,符合率为 93.02%(120/129),TCT 和 HC2 各自与组织学结果的阳性符合率,分别为 85.99%(135/157)、53.23%(132/248),差异有统计学意义($P < 0.05$)。TCT 阳性 HC2 阴性的 28 例患者中,26 例为 TCT 诊断 ASC-US,其组织学结果为炎症。

3 讨论

研究表明,宫颈癌的发生与高危型 HPV 感染的持续作用密切相关,一般要经历不同程度 CIN 到癌变,早期诊治对预防宫颈癌的发生具有重要意义。TCT 目前已作为宫颈癌的一个重要筛查手段,是一种通过脱落细胞的形态改变来判读宫颈的病变程度^[4]。HC2 是目前唯一经美国食品和药品监督管理局、欧洲 CE 和中国食品药品监督管理局共同认证的检测技术,该技术采用化学荧光法来定量检测病毒 DNA,对高危

HPV 检测敏感度较高,阴性结果准确性高的特点。TCT 与 HC2 二者联合应用,可以互相弥补不足,提高宫颈癌及癌前病变筛查的准确率^[5-6]。

本资料结果显示,785 例患者中 157 例 TCT 结果为阳性,135 例得到组织学证实,阳性符合率为 85.99%(135/157)。TCT 阳性符合率随病变程度的增加而升高,提示 TCT 对宫颈高度病变的筛查效果优于低度病变,与文献报道一致^[7]。由于脱落细胞的特征与活体细胞不完全相同且无组织结构,故 TCT 结果不能作为宫颈病变诊断的最后依据,因此对于 TCT 诊断为 ASC-H、LSIL、HSIL、SCC 的病例,要严格按照“三阶梯”即细胞学、阴道镜及组织学方案诊治。在经历临床宫颈细胞取样、细胞涂片制作到细胞学阅片过程中,不可避免的会出现一些细胞学假阴性的结果^[8]。本研究资料显示,TCT 诊断假阴性率为 1.29%。

与组织学结果比较,HC2 的阴性符合率为 99.44%(534/537),显著高于阳性符合率[53.23%(132/248)]与文献报道一致,提示 HC2 有较高的 HPV 阴性预测值,接近 100%^[9]。而阳性符合率较低,可能提示患者存在 HPV 感染,尚未出现细胞和组织学的形态上改变,应给予足够重视和密切随诊。

TCT 与 HC2 联合检测,其阴性符合率为 99.80%,略高于 TCT 和 HC2 各自的阴性符合率,提示二者联合检测对宫颈病变阴性的预测优于单项检测。TCT 联合 HC2 共同阳性,其组织学符合率均高于各自符合率,且有统计学意义($P < 0.05$),提示 TCT 和 HC2 同时用于早期筛查宫颈癌,可有效降低 CIN 和宫颈癌的漏诊率。有研究显示,两项检查结果均为阴性的病例再次检查的间隔时间可延长至 5 年^[10]。

由于多种主观因素和客观因素的存在,ASC-US 诊断可重复性差,组织学阳性符合率低。本研究中 ASC-US 组织学符合率为 51.78%(29/56)。在分析病例的 HC2 检查结果时,笔者发现,组织学结果为炎症的 27 例 ASC-US 患者中,26 例 HC2 的结果为阴性;组织学阳性的 29 例 ASC-US 患者,HC2 均为阳性,即 56 例 ASC-US,HC2 结果与组织学符合率达 98.21%(55/56)。提示 HC2 的检查可进一步提示 ASC-US 患者存在宫颈病变的风险性。因此,笔者建议,所有 ASC-US 患者均应进行 HC2 检查,HC2 阳性者应严格按照“三阶梯”治疗方案,阴性者可适当延长随诊时间。

参考文献

- [1] Abulafia O, Pezzulb JC, Sherer DM. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey[J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(1): 137-144.
- [2] 肖克林, 王丁, 周克元. HC2 法在宫颈癌筛查中的应用现状[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(4): 364-366.
- [3] Davey DD. Cervical cytology classification and the Bethesda System[J]. Cancer J, 2003, 9(5): 327-334.
- [4] 陈国强, 韦丽艳. 宫颈癌筛查中液基薄层细胞学检查与巴氏涂片法的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(17): 1996-1997.
- [5] 蒋辉. 液基薄层细胞学检查和 HC2 检测在宫颈癌前病变筛查中的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(22): 2715-2716.
- [6] 郭美兰. TCT 联合 HPV 检查在基层宫颈病变筛查的临床应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(24): 1928.
- [7] Biscotti CV, Dawson AE, Dziura B, et al. Assisted primary screening using the automated ThinPrep Imaging System[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 123(2): 281-287.
- [8] 张江宇, 赖日权, 张佳立, 等. 宫颈液基细胞学涂片假阴性原因分

析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 21(6): 663-665.

[9] 吕卫国, 谢幸. 宫颈癌的筛查[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(1): 8-9.

[10] Roncaglia MT, Tacla M, Vieira da Motta E, et al. Evaluation of the combination of cytology and hybrid capture to safely predict

the high-grade lesion status of patients treated with conization with large loop excision of the transformation zone[J]. Acta Cytol, 2011, 55(5): 421-425.

(收稿日期: 2012-03-20)

• 检验技术与方法 •

3 种方法在临床交叉配血中的比较

姜世辉¹, 周 玲²

(1. 重庆市合川区中西医结合医院, 重庆 401520; 2. 重庆市合川区中心血站, 重庆 401520)

摘 要:目的 探讨盐水法、聚凝胺法与微柱凝胺法在临床交叉配血工作中的应用价值。方法 分别采用 3 种方法对 300 份血样标本同步交叉配血, 并对结果进行分析。结果 在 300 份血样中盐水法检出的阳性 2 例, 阳性率为 0.67%; 聚凝胺法检出的阳性 7 例, 阳性率为 2.33%; 而微柱凝胺法检出阳性 11 例, 阳性率为 3.67%。在检测不完全抗体方面聚凝胺法与微柱凝胺法差异无统计学意义($P>0.05$), 与盐水法存在显著差异($P<0.01$)。结论 微柱凝胺法在交叉配血中的具有较高的敏感性和特异性; 聚凝胺法操作简便、快速, 在出现配血不合的标本时最好两种方法联合应用。

关键词:血型鉴定和交叉配血; 微柱凝胺; 聚凝胺

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.035 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)17-2121-02

随着科学的不断发展, 交叉配血技术有了长足进步。常用的配血方法有盐水法、抗人球蛋白法、聚凝胺法、聚乙二醇法、各种酶法以及微柱凝胺法等。交叉配血实验是保障临床输血安全的及时、有效的重要手段, 但有时会出现同型血配血不合的现象。为了确保输血安全, 输血前应该做不规则抗体筛选实验^[1-3]。近几年来, 微柱凝胺法在欧美等一些发达国家已作为常规的血型及交叉配血实验^[4], 在条件好的实验室, 交叉配血试验常用微柱凝胺实验(MGT), 又名微柱凝胺卡式法, 该法基于分子筛过滤作用, 通过离心分离游离红细胞和凝集的红细胞^[5]。但由于 MGT 的灵敏度高、特异性好、结果准确、操作简单快速, 所以进行 MGT 操作时一定要标准化^[6]。本文就盐水法、聚凝胺法与微柱凝胺法的应用情况进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2011 年 5 月合川区需要输血的患者 300 例, 其中男性 110 例, 女性 190 例, 年龄 17~60 岁, 平均 38.1 岁, 既往输血史 30 例, 供血者为无偿献血者, 共采集标本 300 份。

1.2 仪器与试剂 台式离心机, BYL 型血型血清学多用离心机和免疫微柱孵育器, Olympus CX-21 普通光学显微镜。凝聚胺试剂为珠海贝索生物技术有限公司生产, 抗人球蛋白配血卡为长春博迅生物技术有限公司生产。

1.3 方法 对每份标本均采用盐水法、聚凝胺法与微柱凝胺法同时做交叉配血。盐水法: 操作参照参考文献^[7]。聚凝胺法: 用生理盐水将受血者和供血者标本分别配 3%~5% 的红细胞悬液。取清洁试管 2 支, 分别标上主侧和次侧; 在主侧加受血者血清 2 滴和供血者红细胞悬液 1 滴; 在次侧加供血者血清 2 滴和受血者红细胞悬液 1 滴。各管加低离子介质溶液 0.7 mL, 混匀, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液使管底残留约 0.1 mL, 轻轻摇动试管, 目测有无凝集, 如不凝集则需重做, 然后各管加重悬液 2 滴, 轻轻摇动试管于显微镜下观察, 30 s 内红细胞散开则为非特异性凝集, 否则为血型抗原与抗体引起的特异性凝集, 判为阳性。微柱凝胺法: 用生理盐水将受血者和供血者标本分别配 0.5%~1% 的红细胞悬液。在配血卡上标上患者姓名, 于主侧加 50 μ L 供血者 0.5%~1% 红细胞悬液和 50 μ L 的受血者血浆。在次侧加 50 μ L 受血者 0.5%~1% 红细胞悬液和 50 μ L 的供血者血浆。然后 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,

以 900 r/min 的速度离心 3 min 后, 再以 1 500 r/min 的速度离心 2 min 后观察结果。红细胞沉积于凝胶管底部表示无凝集, 红细胞聚集于胶上或胶中表示凝集阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS11.0 进行统计学分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

在 300 份血样中盐水法检出阳性 2 例, 阳性率为 0.67%; 聚凝胺法检出阳性 7 例, 阳性率为 2.33%; 而微柱凝胺法检出阳性 11 例, 阳性率为 3.67%。对于 11 例阳性标本, 3 种方法检测情况见表 1。3 种方法中微柱凝胺法在交叉配血中的敏感性最高, 聚凝胺法次之, 盐水法最低; 在检测不完全抗体方面聚凝胺法与微柱凝胺法差异无统计学意义($P>0.05$), 与盐水法差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 11 例阳性标本用 3 种方法进行交叉配血结果											
方法	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
盐水法	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
聚凝胺	2+	-	+	-	2+	-	+	-	2+	+	+
微柱凝胺法	3+	+	2+	+	2+	+	+	+	3+	+	+

3 讨 论

不规则抗体为 IgG 抗体, 在盐水法交叉配血中不出现凝集, 不能直接检出。而聚凝胺法中和红细胞表面的负电荷, 缩短红细胞之间的距离, 引起红细胞的非特异性凝聚, 促进红细胞抗原与相应的 IgG 或 IgM 抗体结合, 如果存在与红细胞抗原相结合的特异性抗体, 聚凝胺诱导的凝集现象则消失。该方法快速简便, 但仍存在漏检, 如因肝素或其他药物中和聚凝胺试剂而造成的假阴性结果^[8], 适用于急诊抢救患者的交叉配血。上述结果亦表明有 4 例聚凝胺法检测凝集阴性而微柱凝胺法凝集阳性。

与凝聚胺法相比, 微柱凝胺法具有灵敏度更高, 结果更准确等优点。其主要利用 Coombs 实验和分子筛技术相结合来检测不完全抗体^[9], 当抗球蛋白试剂中加入待检红细胞盐水悬液时, 如果红细胞已经被不完全抗体致敏, 红细胞表面的抗体球蛋白与抗球蛋白试剂中的抗体发生特异性反应, 使红细胞发