

血液病诊断及图谱

王振法 著
杨崇礼 审

新 华 出 版 社

前 言

在医学诸多学科中,血液病属进展迅速的门类之一。造血理论的更新、造血干细胞的临床应用、白细胞分化抗原检测、血液病分型方案、细胞凋亡等多种新知识不断涌现,并已收入医学生用基础课和临床课教材。因此,迫使教师必须学好、弄懂、更新有关知识。为此,我查阅了一些有关资料,做了些笔记,又将其用于课堂及血液病学习班、研讨班反复实践、修改;血液学的进展亦要求临床工作做出相应反应,我们适时地对新的病例以新的分型方案作诊断,另外对存档病例、特别是诊断欠明确的病例重新观察。从这些新、旧病例中收集到很多典型病例和一些少见、疑难病例。上述教案、病例即是构成该书的基本素材。

书中未标染色方法的彩图,均为 Wright 或 Wright 与 Giemsa 混和染液染色的标本。本书的彩图还有苏木素—伊红、各种细胞化学和免疫细胞化学染色的标本,这些方法染色标本的彩图,则在其图题后,明确标示其染色方法。书中各图细胞大小,皆取自胞体最大直径和与之垂直的最宽径线以“×”相连表示。

关于图中细胞放大倍数:多数图为 100×10 倍放大,摄影于 135 正片,电子分色制版时将其短边放大成 8.2cm,最终取 8.0cm,长边随短边放大;在此种彩图中有 8 幅因版式或细胞显示的需要,电子分色图的实际大小是书中图的大小加 0.2cm。上列 100×10 倍数放大摄影的彩图均未标示放大倍数。此外,还有 4×10 、 10×10 、 20×10 、 40×10 倍放大者,其摄影时使用的正片、电子分色图的尺寸及剪取原则,与 100×10 倍放大者相同,其摄影时的实用放大倍数,皆明确标示于图题之后的括号内。图 11、12、18、314 是占两个页码的剪贴组合图,皆为 100×10 倍放大,摄影于 135 负片,在彩色扩印机上,同机同人将负片短边彩扩成 8.0cm 画面(长边随短边放大),剪取所需细胞,组贴于白纸上,原倍电子分色制版而成。

本书的出版得到多方支援。杨崇礼研究员做细致审阅,提出珍贵意见,对她付出辛劳深表感谢!恩师郑家齐教授一直关怀、鼓励,学术友好闫伯令教授给予物质支援和筹划指导,挚友王玺同学对本书的细胞描述提出修改意见,老同事郭连兴教授对细胞化学章精心审查,李顺义教授、邢文礼、张树平副教授积极支持,为本书成册做了工作。张家口医学院、河北医科大学附属二院、唐山工人医院、中国医学科学院血液学研究所等单位提供标本,妻子于静华副主任医师撰写易发于小儿的血液病,并对本书的一些用词提出有益的建议,小儿媳韩燕华(现为北京医科大学临床医疗技能训练与研究研究生)编撰本书的英汉索引,承担繁重的誉写、校对工作。在此一并致谢!

尽管我付出了最大努力,但水平有限,定有疏陋、谬误,恳请读者指正,以便再版时修正、补充。

王振法
1997 年 4 月 22 日
于承德医学院

序

血液细胞形态学是以血液细胞为特征的,进行细胞分类、鉴别和诊断的一门综合性科学。近年来,由于基础和临床医学的迅速发展,促进血液细胞形态学内容更加丰富,新知识,新观念不断涌现和更新,为适应这一科学进展,王振法主任根据自己教学和临床多年的经验,收集整理了有关文献和病例,并以高度负责的精神,观察了可以用以教学和为临床工作借鉴的血液及骨髓涂片,经过数年工作,这本图文并茂的血液病诊断及图谱一书得以问世。该书详尽地介绍了血液细胞生成到造血干细胞的临床应用;免疫细胞化学的实践及遇到的问题;提出血液病诊断水平三个划法;以及细胞凋亡等的引入都为本书增加了新的内容。值得提出的是本书介绍给读者的彩图是作者和他的同仁将多年来积累的典型标本有的是罕见病例标本,拍摄编著成的彩色图谱。本书收集 438 幅真实病例的标本照片,可以认为是血液病图谱中的精品,本书图文各占一半,内容紧密相连便于读者阅读。本书的出版无疑将会为血液学的发展起到重要作用。

郑家齐

1997 年 5 月 22 日

目 录

第一篇 总 论

第一章 血细胞生成	1
第一节 血细胞生成学说的分歧和统一	1
第二节 造血干细胞的起源与转移	2
第三节 造血干细胞和祖细胞的概念及种类	3
第四节 造血干细胞和祖细胞的临床应用	4
一 概述	4
二 循环血液中造血干细胞和祖细胞移植	4
三 祖细胞培养现状及临床应用	5
第二章 血细胞形态	8
第一节 红细胞形态	8
一 正常形态	8
二 异常形态	9
第二节 粒细胞形态	16
一 正常形态	16
二 异常形态	17
第三节 Auer 小体	18
一 形态、大小	18
二 在细胞中的位置	18
三 Auer 小体和宿主细胞分化阶段的关系	18
四 Auer 小体临床意义	18
第四节 淋巴细胞、浆细胞、单核细胞形态	22
一 淋巴细胞	22
二 浆细胞	22
三 单核细胞	22
第五节 巨核细胞形态	23
第三章 细胞化学染色	24
第一节 固定	24
第二节 复染及复染剂	25
第三节 过氧化物酶染色	26
第四节 中性粒细胞碱性磷酸酶染色	27
第五节 酸性磷酸酶染色	30
第六节 糖原染色	32
第七节 酯酶染色	34
一 特异性酯酶染色法	34
二 非特异性酯酶染色法	35

第八节 铁染色	38
第四章 免疫细胞化学	43
第一节 概述	43
第二节 单克隆抗体与白细胞分化群	44
一 单克隆抗体	44
二 制备 McAb 的基本知识	44
三 分化群	47
第三节 CD 的检测方法	51
一 标本片制备	51
二 CD 的检测	54
第二篇 红细胞疾病	64
第五章 干细胞增殖分化障碍性贫血	64
第一节 再生障碍性贫血	64
第二节 先天性再生障碍性贫血	71
一 Estren—Dameshek 综合征	71
二 Schwachman 综合征	71
三 血小板减少—桡骨缺失综合征	71
四 范可尼贫血	71
第三节 纯红细胞再生障碍	72
一 急性造血停滞	72
二 先天性纯红再障	75
三 慢性获得性纯红再障	75
第四节 肾性贫血	76
第六章 脱氧核糖核酸合成障碍引起的贫血	78
第一节 叶酸及维生素 B ₁₂ 对红细胞增殖的影响	78
一 叶酸与红细胞增殖	78
二 B ₁₂ 与红细胞增殖	79
第二节 叶酸缺乏的临床类型	80
一 妊娠巨幼细胞贫血	80
二 药物诱发的巨幼细胞贫血	80
三 细胞代谢超常的疾病	80
四 婴儿巨幼细胞贫血	80
五 营养性巨幼细胞贫血	81
第三节 营养性巨幼细胞贫血	81
第四节 B ₁₂ 缺乏的临床类型	87
一 营养型巨幼细胞贫血(B ₁₂ 缺乏型)	87
二 胃切除综合征	87
三 肠盲段综合征	87
四 鱼绦虫感染引起的巨幼细胞贫血	87
第五节 恶性贫血	87
第七章 血红蛋白合成障碍性贫血	92
第一节 缺铁性贫血	92

第二节 血红蛋白病	94
一 地中海贫血	95
二 镰状细胞病	99
第八章 溶血性贫血	102
第一节 遗传性球形红细胞增多症	102
第二节 遗传性椭圆形红细胞增多症	103
第三节 棘状红细胞增多	105
第四节 口形红细胞增多	107
第九章 其它原因引起的贫血	108
第一节 雅克什综合征	108
第二节 铁粒幼细胞贫血	110
第三节 肝病性贫血	112
第十章 真性红细胞增多症	114
第三篇 白血病及一些恶性血液病	118
第十一章 白血病诊断进展史	118
一 器官水平诊断	118
二 细胞水平诊断	118
三 分子水平诊断	118
第十二章 急性淋巴细胞白血病	121
第十三章 急性非淋巴细胞白血病	130
第一节 急性粒细胞白血病	130
第二节 亚急性粒细胞白血病	137
第三节 绿色瘤	142
第四节 急性早幼粒细胞白血病	145
第五节 急性粒—单核细胞白血病和急性单核细胞白血病	150
第六节 红白血病	160
第七节 急性巨核细胞白血病	168
第十四章 慢性粒细胞白血病	172
第十五章 慢性中性粒细胞白血病	178
第十六章 慢性淋巴细胞白血病	181
第十七章 多毛细胞白血病	185
第十八章 大颗粒淋巴细胞白血病	188
第十九章 少见的急性白血病	190
第一节 嗜酸粒细胞白血病	190
第二节 嗜碱粒细胞白血病	193
第三节 肥大细胞白血病	195
第四节 浆细胞白血病	197
第五节 幼淋巴细胞白血病	201
第六节 成人 T 细胞白血病	202
第七节 急性干细胞白血病	204
第二十章 霍奇金病	206
第二十一章 皮肤 T 细胞淋巴瘤综合征	209

第二十二章 浆细胞疾病	213
第一节 多发性骨髓瘤	213
第二节 巨球蛋白血症	218
第二十三章 恶性组织细胞病	221
第二十四章 骨髓纤维化	230
第二十五章 骨髓增生异常综合征	233
第四篇 白细胞和单核巨噬细胞疾病	243
第二十六章 遗传性粒细胞疾病	243
第一节 Pelger—Huet 核异常	243
第二节 Jordan 异常	245
第三节 Chediak—Higashi 综合征	247
第二十七章 组织细胞增生症 X	250
第一节 莱特勒—西韦病	250
第二节 汉—许—克病	252
第三节 嗜酸细胞肉芽肿	255
第二十八章 海蓝组织细胞增生症	256
第二十九章 类脂质沉积病	258
第一节 戈谢病	258
第二节 尼曼—皮克病	261
第三十章 淋巴—浆细胞疾病	264
第一节 传染性单核细胞增多症	264
第二节 流行性出血热	267
第五篇 巨核细胞疾病	271
第三十一章 特发性血小板减少性紫癜	271
第三十二章 原发性血小板增多症	277
第三十三章 巨血小板综合征	279
第六篇 其它	281
第三十四章 脾功能亢进	281
第三十五章 骨髓坏死	283
第三十六章 类白血病反应	286
一 中性粒细胞型类白血病反应	286
二 嗜酸性粒细胞型类白血病反应	288
三 淋巴细胞型类白血病反应	288
四 单核细胞型类白血病反应	289
五 M ₆ 型类白血病反应	289
红斑狼疮细胞和恶性肿瘤细胞	291
附录 I 英汉索引	292
附录 II 血细胞及其疾病发展沿革	307
附录 III 常见急性白血病分型程序	311

第一篇 总 论

第一章 血细胞生成

第一节 血细胞生成学说的分歧和统一

1879年德国科学家 Ehrlich 发明了血细胞染色法,1891年俄国医师 Romanowsky 又对上述细胞染液加以改进,此时已能将血液中的细胞分成不同系列。这些不同系列的细胞是如何形成的?相互关系如何?这个问题是 Ehrlich 于 1896 年提出来的。Ehrlich 认为:粒细胞来源于骨髓内的无颗粒的原始细胞,淋巴细胞来源于淋巴结。1900 年 Naegeli 撰文支持 Ehrlich 的观点,并指出:未分化的间充质细胞(undifferentiated mesenchymal cell)是一种多潜能细胞,能直接分化为原粒细胞或原淋巴细胞,中间无过渡型,即二元论学派。1911 年 Pappenheim 和 1915 年 Maximow 反对上列观点,认为原网状细胞是一种固定的、未分化的多潜能细胞,它可行部分分化而成为游离细胞,所有血细胞皆起源于这种细胞,亦可以说都起源于原网状细胞,这就是血细胞生成的一元论观点。还有三元论、多元论等。各学派众说纷纭,各持己见,争论不休。但各学派的认识有一点是近似的,即认为各种血细胞都起源于造血器官内的原网状细胞,但以后的实验证明这种认识是错误的。因为原网状细胞对短波射线损伤的耐受力大大高于其它系列的原始细胞,所以,在动物接受大剂量短波射线照射后,残存的原始细胞可能仅仅是原网状细胞,现已证实,原网状细胞无论在体内还是在试管中,仅能分化成网状细胞,而不能分化成其它任何系列的细胞。自 Ehrlich 提出血细胞是如何生成的这个问题后,争论了 65 年之久。

1961 年 Till 和 Mc Culloch 创建了脾集落形成法,证实各种血细胞均来自于同一个祖先—多能干细胞(multipotential stem cell),相当于 CFU—S,从

此将争论了多半个世纪的血细胞生成学说,统一到新的一元论上来。

1961 年, TILL 等在研究射线对造血细胞的损伤作用时,发现给纯系小鼠致死量(900rad)射线照射后,会导致血细胞数目急剧下降,终因感染于两周左右死亡,解剖可见脾脏严重萎缩。倘若经一番处理,被射线照射的小鼠可免于死亡。方法是:在严格无菌条件下,取健康同系小鼠骨髓,置容器,以 200rad 射线照射,造成细胞染色体损伤,以此作为标记。在小鼠接受致死量射线照射后的 3~12 小时内,从尾静脉输入上列已经标记的同系鼠骨髓细胞十万(10^5)个,8~10 天后,剖检小鼠脾脏,肉眼可见脾脏不但没有萎缩,而且在脾脏的表面及深层满布很多圆形、凸起的结节,称其为脾结节,或称脾集落形成单位(colony forming unit—spleen, CFU—S)。实验证明,被致死量射线照射的小鼠若能如上输注同系鼠骨髓,就能免于死亡而长期存活下去。取其 CFU—S 的细胞作染色体分析,可见在每一个 CFU—S 内的各种细胞,染色体的畸变形是一致的。例如:若有一个细胞是 19⁺ 染色体长臂 2/3 短缺,则本 CFU—S 内的各种血细胞皆有同样的改变,说明这个 CFU—S 内的所有细胞是来自于同一个细胞。这种情况如同在固体培养基上生长的每一个细菌集落一样,都是原始于一个细菌。进一步分析可见,每一 CFU—S 内所包含的细胞系列亦不相同,约半数纯红细胞的集落,脾脏深层的 CFU—S 中纯红细胞集落多于脾脏表层,含多系列细胞的 CFU—S 可有红系、粒—单系、巨核系、嗜酸粒系等。在这种 CFU—S 内不管其它系列所占比例如何,却都是以红细胞占优

势。为了证实干细胞学说,可取纯红细胞的 CFU—S,再输入经上列致死量射线照射的同系鼠体内,又可重复上列结果。这又说明在纯红系细胞 CFU—S 内亦存在一种可以生成各种血细胞的细胞,也就是

造血干细胞。上列试验结果雄辩地将造血理论统一到新的一元论上来。新的一元论现已被各国学者所接受。

第二节 造血干细胞的起源与转移

血细胞来自造血干细胞,造血干细胞起源于何处呢?研究证明,造血干细胞是胚的卵黄囊血岛原位发生的。

精子、卵子结合成为受精卵,着床于子宫内膜,形成胚。

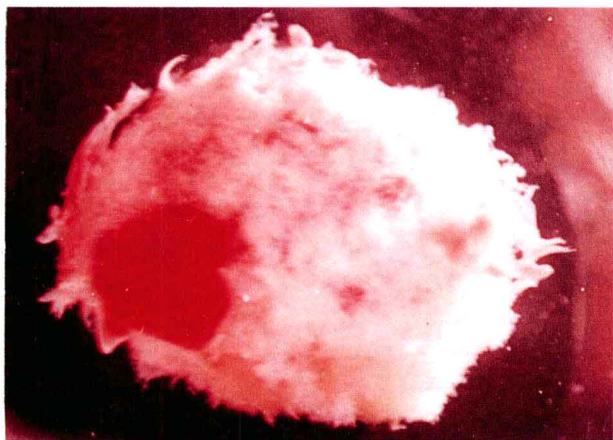


图1 21天胚外形

显示胚的外部包绕丰富的绒毛(Villi),大血凝块处为体蒂(body stalk)。

受精后的第13~15天,胚的卵黄囊血岛即出现造血干细胞(图2、图3、图4)。第6~7周时,卵黄囊血岛的造血干细胞经血流转移到肝脏,并成为3~7个月的胎儿制造血细胞的主要器官。肝脏虽然是造血器官,但它自身不能发生血细胞。肝能够造血是卵黄囊血岛的造血干细胞经血流转移、种植在肝组织上,才有血细胞生成。如同土壤生长禾苗一样,土壤无论多么肥沃,湿度、温度再合适,不撒入种子,就不会长出禾苗来。所以说:肝脏是造血器官,但其造血能力来源于卵黄囊血岛的造血干细胞,而肝脏本身不能原位发生血细胞。为了证明造血干细胞的起源,有人将尚未有肝脏造血的鸡胚的卵黄囊血岛切除,即可以观察到虽然鸡胚能继续发育,但肝脏及全身

任何器官及组织无血细胞生成,成为无血细胞生命。上列试验可证明造血干细胞起源于卵黄囊血岛,造血干细胞随血流种植到肝脏,使肝脏获得造血能力。

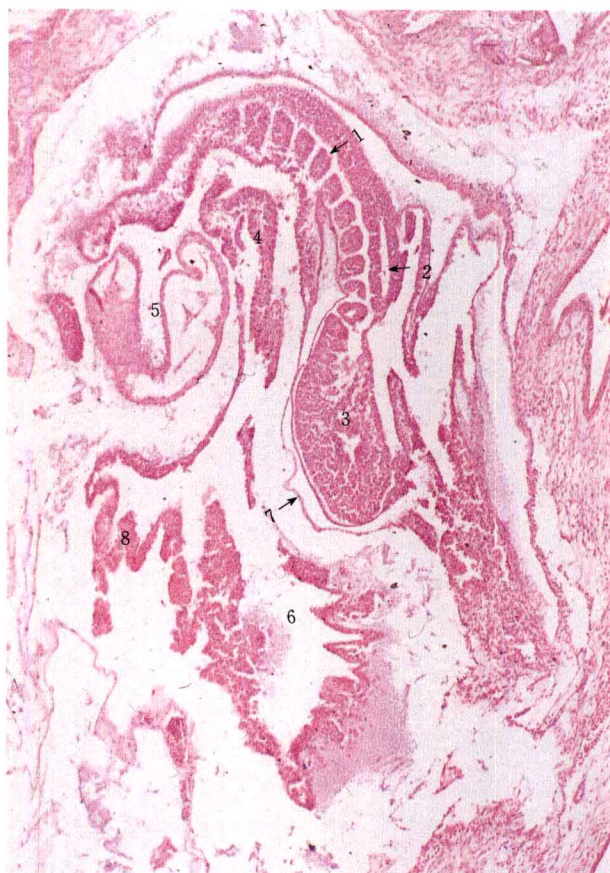


图2 21天胚纵切面(4×10, HE 染色)

此为图1的冷冻切片标本

- 1 体节 2 神经管 3 原始心脏 4 脐带始发部
5 尿囊 6 卵黄囊腔 7 卵黄囊壁 8 血岛

胎儿发育到3、4个月时,脾、骨髓分别开始造血。为证实这一过程,在胎鼠尚未开始骨髓造血前,将胎鼠的股骨或肱骨移植到同系、异性、成年鼠的

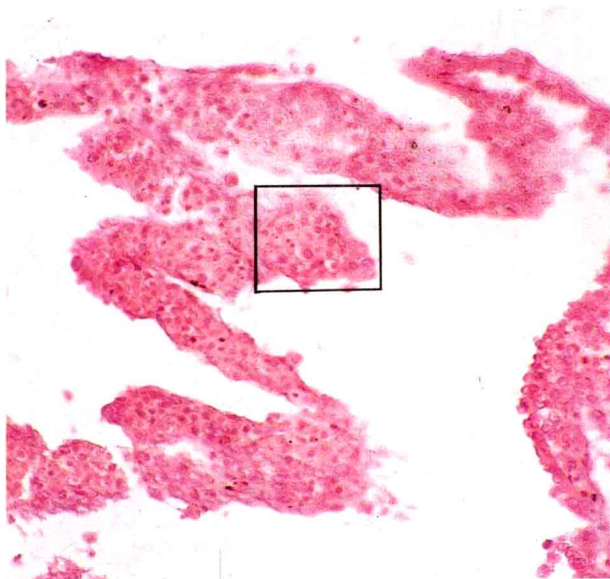


图3 21天胚纵切面(40×10, HE染色)

此为图2的局部放大。

皮下,约10天后,即可查出移植后的胎鼠骨髓腔内有血细胞生成。经染色体分析,生成的血细胞和其宿主(成年鼠)的性别相同,而不是胎鼠的性别。我们作如下分析:胎鼠的股骨能够在同系成年鼠皮下生存下来,只能是成年鼠的血液提供了其生存的必要条件,胎鼠骨髓腔内出现的和成年鼠性别相同的血细胞,只能是成年鼠血流中有造血干细胞,随血流种植于胎鼠骨髓后,形成各种血细胞,不能考虑其它途

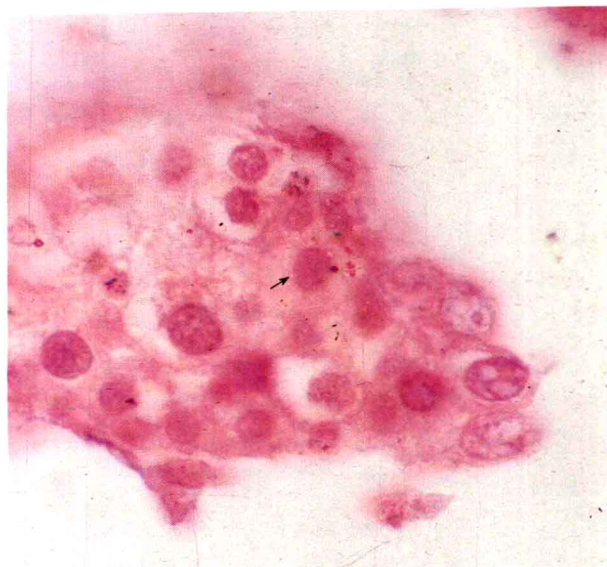


图4 21天胚纵切面(HE染色)

此为图3的局部放大。箭头所指为造血干细胞,胞体直径 $8 \times 8 \mu\text{m}$,正圆形;胞浆无颗粒;胞核 $6 \times 6 \mu\text{m}$,圆形,染色质细致均匀,着紫蓝色。

径。依据实验条件和结果,可以肯定胎鼠骨髓内长出的与其异性的血细胞只能是来自成年鼠,别无它途。

肝造血期之后、骨髓造血之前,有脾造血期。

上列试验说明:造血干细胞起源于胚的卵黄囊血岛,在胚胎的2、3、4个月时,经血流顺次转移到肝、脾、骨髓,亦说明肝、脾、骨髓仅是造血组织,不能原位发生造血干细胞。

第三节 造血干细胞和祖细胞的概念及种类

造血干细胞是一种具有高度自我更新(self renewal)能力和进一步分化为各系列造血祖细胞潜能的细胞。上列两条既是造血干细胞的定义、又是造血干细胞具备的两大特征。所谓自我更新就是造血干细胞经有丝分裂后,两个子细胞仍保持干细胞特征的能力,亦可以称为自我复制。人的一生造血干细胞的数量(即干细胞池大小)和质量能够保持不变就是通过自我更新实现的。上列过程亦称作“自我维持”(self-maintenance)。

造血祖细胞是造血干细胞在增殖过程中,约有半数离开“干细胞池”(stem cell pool),进入不可逆的自我更新能力减低的细胞群体。因此,自我更新能

力的改变是区别于干细胞、祖细胞(progenitor cell)的逐级分化的一个重要指标。

增殖后的干细胞是什么原因使其走上分化为祖细胞的途径呢?如上所述,增殖后的干细胞有半数维持干细胞池的数量和质量,即处于Go期;另一半则发生基因重排或易位,或有关分化的特定基因开放,使干细胞重新合成mRNA,因而合成新的蛋白质,最终导致细胞的结构及功能发生改变,这时则有别于干细胞,而成为祖细胞了。干细胞一旦分化为祖细胞,不久即变为用光镜即可识别的各种原始细胞。

当前所称干细胞、祖细胞,仅仅是从细胞功能、而不是以细胞形态划分的。至今尚无从细胞形态上

确切区分二者的方法。晚近发展起来的所称“CD”的检查,是以分子水平看待问题的,有关干细胞、祖细胞的区分标准,可望通过“CD”的检查做出贡献(见本篇免疫细胞化学)。

既往曾将造血干细胞分为全能干细胞(totipotent stem cell)、淋巴样造血干细胞(lymphoid-hemopoietic stem cell)等。近来将其划分为 CFU-S₁(淋巴-髓系干细胞)和 CFU-S₂(髓系干细胞)(见下表)。就干细胞的主要特征—自我更新潜能而论,CFU-S₁>CFU-S₂3~4 倍。由此可见造血干细胞是由不同层次的细胞组成,是一个很不均一的细胞群体。一般情况下它们处于 G₀ 期,当机体需要时,它们则立即进入细胞周期,增殖后两个子细胞中的一个又回到 G₀ 期,以保证干细胞池的大小。

1979 年人类的混合集落(CFU-Mix 或 CFU-GEMm)培养成功,有关祖细胞的研究进展十分迅速,现已知早期的祖细胞也是多向的,CFU-Mix 可能是最早的祖细胞,故亦称多向祖细胞(multipotent progenitor cell)。祖细胞发育的规律是:多向→少向→单向,所以祖细胞池也是多层次结构(hi-

erarchal structure)。已丧失多向分化能力,只能向特定细胞系分化的祖细胞即单向祖细胞,或称定向祖细胞(committed progenitor cell)。已知的单向祖细胞有:红系祖细胞(BFU-E 和 CFU-E)、粒-单核系祖细胞(CFU-GM)、巨核系祖细胞(CFU-Mk)、嗜酸粒系祖细胞(CFU-Eo)、嗜碱粒系祖细胞(CFU-Bas)、B 淋巴细胞祖细胞(BL-CFU)、T 淋巴细胞祖细胞(TL-CFU)等。

CFU-S₁ 与 CFU-S₂ 比较

	CFU-S ₁	CFU-S ₂
周期状态	非周期、慢周期	快周期
自我更新潜能	比 CFU-S ₂ 强 3~4 倍	较差
沉降率(mm/h)	4.00	4.25
密度(g/cm ³)	1.070	1.075
细胞直径(μm)	6~8	7~9
脑 θ 抗原	(-)	(+)
在长骨腔分布	轴心附近	外缘

第四节 造血干细胞和祖细胞的临床应用

一 概述

如前所述,自 1961 年 Till 和 Mc Culloch 以脾集落形成法在小鼠体内证实存在多能造血干细胞后,有关造血干细胞理论和实验研究进展迅速。尽管在人及其它动物尚未如同在小鼠体内那样直接检测出造血干细胞,但种种情况表明在人的骨髓及循环血液中确实有造血干细胞存在。骨髓中的造血干细胞浓度大大高于循环血液中的浓度。在脾集落形成法成果的影响下,1965 年后,多种型号的细胞分离器应运而生,为从循环血液中分离、收集造血干细胞、祖细胞提供了有力武器,并在临床应用中取得良好效果。1967 年 Senn 等以原来用于小鼠骨髓造血细胞培养的双层琼脂技术,加以改进,成功地培养出正常人骨髓细胞的集落和簇(cluster)。1970 年 Pike 和 Robinson 用正常人的循环血液白细胞作滋养层,

培养成活正常人和白血病人的骨髓细胞。此后,造血祖细胞培养技术广泛应用于正常和异常造血机理的研究,同时也开始应用于临床。

有关造血干细胞、祖细胞分离培养的技术细节问题,已有多书介绍,不再赘述。现仅就其临床应用,简述如下:

二 循环血液中造血干细胞和祖细胞移植

循环血液中造血干细胞、祖细胞数目远不及骨髓,但可以硫酸葡聚糖(dextran sulphate,DS)等刺激骨髓,而将其调动到循环血液中来。此时以血细胞分离器从循环血液中获取尽量多的造血细胞,以备作移植之用。

(一) 使用循环血液中造血细胞移植的优点

1 采集血液中造血细胞的方法较采集骨髓中的造血细胞简单,影响供者健康的程度亦较采集骨

髓者轻。

2 植入受者体内后成活率高。

3 受者接受循环血液中造血细胞移植后,免疫功能重建快。

4 循环血液中的造血细胞较骨髓中的造血细胞对短波射线的耐受性高、敏感性低,更易植活。

(二) 白血病治疗中的自体移植

慢粒病人血液中有大量造血干细胞,化疗达完全缓解(complete remission, CR)时,以血细胞分离器收集血液中的造血细胞液氮冷冻,待病人出现复发时可加大化疗药物剂量,随后植入冷冻的自身造血干细胞,可很快恢复白细胞数。另外,一般情况下,慢粒发展为急变后,会很快死亡,此时若加大化疗药物剂量,随之植入自体造血细胞,亦能延长其生命。其它各种白血病都可进行循环血干细胞移植。

(三) 几项研究结果

1 失血后血液中的造血干细胞即增加。

2 血液中 CFU—GM 的变化有一定规律性:

(1) 在一天的 24 小时内,9 时最高,15 时至次日晨 3 时最低。

(2) 在性别差异上男性比女性高一倍。

(3) 运动后血液中 CFU—GM 显著增多。

(4) 某些血液病人血液中的 CFU—GM 高于正常人。

(5) 现已发现一些物质对血液中的 CFU—GM 有提高作用,包括:聚阴离子化合物、抗癌药物、肾上腺皮质激素、吡喃聚合物、聚甲基丙烯酸、细菌内毒素、酵母多糖、刀豆素等。

三 祖细胞培养现状及临床应用

(一) 祖细胞培养

祖细胞培养是一项程序较繁杂、影响因素多、操作条件要求较高的技术。经血液细胞学工作者的努力,现已建立了 CFU—GM、CFU—E、BFU—E、CFU—Mix、CFU—M_K、CFU—Bas、CFU—Eo 等培养技术。

1 CFU—GM 培养 在各类造血祖细胞培养中,最先取得成功的是 CFU—GM,所以 CFU—GM 培养技术便成为培养祖细胞的基础。外周血液中含 CFU—GM 甚少,因而 CFU—GM 的培养多选用骨髓液作为培养物。培养过程中需要选用并制备适当的培养基、一定浓度的骨髓培养细胞、条件培养液、琼脂等,并需加入 CFU—GM 生长需要的集落刺激

因子(colony stimulation factor, CSF)、马或胎牛血清等。

(1) CFU—GM 培养需要的主要原材料

① RPMI (roswell park memorial institute, RPMI)—1640 培养液:PRMI—1640 10.4g 于无菌容器内加无菌重蒸馏水 20.0ml 调成粥状,最后加重蒸馏水至 1000.0ml,磁力搅拌 30~60 分钟,其间可充入 CO₂ 以加速溶解,加入双抗(青霉素、链霉素),以 NaHCO₃ 调 pH=7.2~7.4, G₅ 漏斗除菌,分装, -20℃ 可保存 3 个月。

② 骨髓培养细胞:抽取骨髓液 1~2ml,加入肝素 50U 抗凝, RPMI—1640 2~3ml 将骨髓加以稀释,沿管壁细心加入淋巴细胞分离液 3.0ml,使成液面,静置 15 分钟,以 1500rpm 离心,吸出白细胞层,再以 RPMI—1640 洗涤两次,以 RPMI—1640 液稀释成 2×10^5 /ml 细胞悬液。

③ 条件培养液:人胎盘以碘酒、酒精消毒后,无菌生理盐水冲净,剥胎膜、去血块,切成 1cm³ 块,以 RPMI—1640 培养液充分洗净,置于 RPMI—1640 培养液(含 20% 马或胎牛血清)中, 3~4 块/10ml, 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度培养 5~7 天,其上清液即条件培养液,分装, -20℃, 可保存半年至一年。

④ 琼脂:优质琼脂以重蒸馏水煮沸半小时,配制成 30.0g/L 琼脂液。

(2) 培养步骤

① 制作培养体系:

RPMI—1640 培养液	3.0ml
马血清(或胎牛血清)	1.0ml
骨髓培养细胞	1.0ml
琼脂液	0.5ml
条件培养液	1.0ml
混合即成	

② 培养:在直径 35mm 培养皿内,加入条件培养液 0.2ml,然后加入培养体系液 1.0ml,混匀,置 37℃、5%CO₂ 环境孵育 8~9 天。每份标本至少作 3~5 个平行培养皿,以求得平均值。

(3) 结果观察:培养皿置倒置显微镜下计数集落、集簇数。规定 ≥ 50 个细胞组成的细胞团称为集落, < 50 个细胞组成的细胞团称为集簇。

2 BFU—E、CFU—E 培养 红系祖细胞需要红细胞生成素(erythropoietin, Epo)的作用而增殖、分化,以甲基纤维素(methyl cellulose, MC)为支架,

在适当培养条件下,于培养后第4天观察CFU-E、第10~20天观察BFU-E集落生长情况。

(1) 培养所需主要原材料

① Eagle 最低必须培养液(Eagle minimum essential medium, MEM): MEM 4.9g,重蒸馏水加至1000.0ml,谷氨酰胺0.292g(最好临用前加入),调pH=7.2~7.4,过滤除菌后使用。

② 2%甲基纤维素:甲基纤维素1.3g,以环氧乙烷消毒,加重蒸馏的沸水30.7ml,充分混合溶解,冷后置4℃至气泡消失,加双倍浓缩的MEM 32.5ml,100.0g/L NaHCO₃ 1.8ml。

③ 10U/ml Epo:以MEM培养液稀释。

④ 100.0g/L小牛血清白蛋白:小牛血清白蛋白2.0g,重蒸馏水1.8ml溶解,放置24小时后使用。

⑤ 10⁻⁴mol/L 2-巯基乙醇:取2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME)0.05ml,加MEM培养液4.95ml混匀,取其中0.05ml加入MEM培养液4.95ml混匀即成。两天内用完,操作在通风橱内进行。

⑥ 骨髓培养细胞:分离方法同CFU-GM,仅是以MEM替代RPMI-1640培养液,细胞浓度增至2×10⁶/ml。

(2) 培养步骤

① 制作培养体系:

骨髓培养细胞	0.5ml
胎牛血清	1.0ml
100g/L小牛血清白蛋白	0.5ml
10U/ml Epo	0.5ml
甲基纤维素液	2.0ml
2-巯基乙醇液	0.5ml

② 培养:上列培养体系混匀,放直径为30mm培养皿内,每皿1.0ml,置37℃、5%CO₂、饱和湿度环境培养。

(3) 结果观察:培养后的第4天观察CFU-E,此为由8~50个细胞组成的集落;第10~20天观察BFU-E,此为由50~500个甚或更多的细胞组成的集落。其细胞分布似空中爆炸的礼花,国外学者称之为“burst”,该词意译为爆炸,音译亦有爆音;所以称之为爆式集落(burst forming unit-erythroid)。

3 CFU-Mix 培养 在植物血凝集-白细胞

条件培养基(phytohemagglutinin leukocyte condition medium, PHA-LCM)及Epo共存条件下,可培养出含有红、粒、单核、巨核等多种细胞系列同时存在的集落,称其为混合集落,缩写成CFU-Mix或CFU-Mm。CFU-Mix培养成功,对造血干细胞生理状态及血液疾病时的异常分化的深入研究有重要的促进作用。

(1) 培养需要的原材料除PHA-LCM外,其它原材料与上列1、2基本相同,仅一些原材料最终浓度有所不同。

(2) 培养步骤

① 制作培养体系:

PHA-LCM	5%
Epo	1U/ml
“AB”血型人血浆	30%
牛血清白蛋白	1%
2-巯基乙醇	5×10 ⁻⁵ mol/L
骨髓有核细胞	2×10 ⁵ /ml
RPMI-1640	适量
甲基纤维素	0.9%

② 培养:在直径30mm培养皿中,加入上列培养体系液1~2ml,每份标本作平行试验培养皿4~5个,以求其均值。置37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养18天。

(3) 结果观察 一般情况下,于培养后第7天即可出现含有两个或两个以上细胞系列的集落;待到第14~18天时,细胞集落的生长达最高峰。

4 CFU-M_K 培养 CFU-M_K培养方法的建立较前述祖细胞培养方法的建立晚,培养结果的稳定性亦差些,但目前已能肯定巨核细胞祖细胞是客观存在的。CFU-M_K不仅在血液中浓度低,而且骨髓中含量亦少,因而给培养工作带来困难。另外,CFU-M_K对培养条件的要求亦高些。对CFU-M_K的确认上亦有难度,巨核细胞间胞体悬殊甚大,以普通染色法可识别胞体大、较成熟者,但原始性高、胞体小者则常常需要行免疫细胞化学染色,以CD₄₁、CD₄₂阳性作出判断才是可靠的方法。

(1) CFU-M_K培养需要的原材料除前列祖细胞培养需要的原材料外,还需要再生障碍性贫血病人的血清、脾细胞条件培养液、去血小板的“AB”血型人的血浆等。

(2) 培养步骤

① 制作培养体系:

去血小板“AB”血型人血浆	20%
PHA-LCM	5%
再障病人血清	10%
脾细胞条件培养液	10%
2-巯基乙醇	5×10^{-5} mol/L
骨髓有核细胞	1×10^6 /ml
甲基纤维素	0.8%

② 培养:在直径 30mm 培养皿中,加入培养体系及培养液各 1.0ml,混合,置 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下,培养 7~14 天观察结果,每份标本作 4~5 个培养皿,以求均数。

(3) 结果观察 培养时间内结果满意时,即可作巨核细胞计数及 CFU-M_K 集落计数。不染色标本光镜下巨核细胞有较强的折光性,胞体大、平滑,但胞体小者则不易识别;遇此应行免疫细胞化学染色,分别计数每个集落中含有 1、2 及 3 个以上巨核细胞的集落。

一些造血祖细胞培养方法虽已建立,但各实验室间实验条件不同,所提出的参考值悬殊甚大,可有几倍乃至几十倍以上的差距,这种情况无论国内、国外都是如此。所以,只能在自己的实验室,稳定实验条件,求得自己的参考值,应用于实际工作中。

还可利用体内扩散盒琼脂法培养骨髓细胞中的粒系及红系祖细胞,本法重复性较体外培养法好些。详细情况请查阅有关书籍。如果能够将其与体外培养法联合使用,所得结果会更满意一些。

(二) 祖细胞培养在几种常见血液病中的应用

1 急性粒细胞白血病:未经治疗前,CFU-GM 集落生成极少或完全消失,集簇生长增加(簇与集落之比正常人约为 5:1,急粒时比值增加)。如有集落生成,检查其细胞分化情况时发现多数细胞停滞在原始及早幼阶段,不见成熟细胞。若反复多次培养而无集落生成或长出特别巨大的集落者,则预后不良。当治疗达完全缓解时,则 CFU-GM 培养可恢复正常。急粒未治疗前 CFU-E 和 BFU-E 皆显著减少或消失,治疗达完全缓解后则可上升或恢复正常。

2 慢性粒细胞白血病:未经治疗的慢粒,其 CFU-GM 培养可见集落生成大量增加,骨髓培养可为正常人的 5~10 倍,循环血液标本的培养可为

正常人的 50~100 倍。簇与集落之比可近于正常人(5:1),集落内细胞分化亦较好,可见 Ph¹ 集落。治疗达完全缓解时,CFU-GM 集落的生成可降至正常。当发生慢粒急变时,CFU-GM 集落生成明显减少至消失。慢粒未经治疗前 CFU-E 和 BFU-E 集落皆明显增多,不加入 Epo 亦能形成集落。当发生慢粒急变时 CFU-E 和 BFU-E 集落皆减少。

3 红白血病:CFU-GM、CFU-E、BFU-E 集落的生成均减少,治疗达缓解时即增加。

4 急性和慢性淋巴细胞白血病:CFU-GM、CFU-E、BFU-E 均可极度减少至消失。

5 骨髓增生异常综合症:CFU-GM 显著减少,CFU-E、BFU-E 多减少但亦有正常者。

6 巨幼细胞贫血、缺铁性贫血等:CFU-GM、CFU-E、BFU-E 皆可正常或增多。

7 再生障碍性贫血:再障的发病机理尚无权威性学说。它可能是一个诸多因素引起的一种相同结果—骨髓造血功能衰竭综合症。利用祖细胞培养技术可进行一些实验:再障病人的骨髓单独培养,CFU-GM、CFU-E、BFU-E 均很少生长或不生长。若与正常人的骨髓一起培养,有的病人的骨髓可使正常人 82% 的 CFU-GM 受抑,亦可加入 Epo 后进行培养,可能有两种表现:①红细胞有合成血红蛋白的能力,说明 CFU-E 本身是正常的,这样的病人一般临床症状轻,但治疗缓解率低;②红细胞合成血红蛋白不增加,说明病人的 CFU-E 本身即不正常,这种病人一般临床症状重,但治疗后病人多有缓解。有人以抗胸腺细胞球蛋白(antithymocytic globulin, ATG)处理病人骨髓后再行培养,可使病人的 CFU-GM 增加 10 倍。此外还有一些试验方法,借此可将再障分为三个类型:干细胞损伤型、血清抑制因子型(或称抑制性淋巴细胞型)及微环境损伤型。再障病人病情的缓解和骨髓培养生成的 CFU-GM 数密切相关,一般情况多为不生长,缓解时可部分生成 CFU-GM 集落,但仍居低值,仅有临床症状缓解时,CFU-GM 几乎不上升,只有同时有血小板数上升,CFU-GM 才有恢复至正常的可能。

8 实行骨髓移植时,测定供者骨髓中的 CFU-GM 数,可保证输入的骨髓有一定的有效细胞数。

(王振法 谢言秋 金小平)

第二章 血细胞形态

本书所称“血细胞形态”，是指用 Wright 或 Wright 和 Giemsa 混合液染色标本，利用光学显微镜观察到的细胞形态。若为其它染色，则附加说明。

从本篇第一章中知道：细胞发育过程中的造血干细胞、祖细胞阶段光镜不能识别，光镜可识别的最早阶段是各系统的原始细胞，此后，细胞越来越成熟，特点越来越明显，易辨认。干细胞、祖细胞不宜用光镜图像表示，现采用多数人所能接受的观点，将相互间的关系以文字排列如下表：

血细胞发育是自然的、渐变的一个连续过程，不是截然的。为了便于掌握和对比分析，人们按照各系统血细胞的特点，人为地将其划分若干阶段。血细胞的发育同人的衰老过程所表现的一样，即同年龄的人，各器官的成熟、衰老程度不相同。镜下见到的细

胞各有其特点，有的细胞还可兼有上、下两个阶段的特征。这样的细胞，原则上划入下一个阶段。

在实际工作中，镜下见到的细胞图像不会全部是模式化的、阶段分明的细胞。所以，在划归类别、决定阶段时，常常带有主观成分。染色时条件的更动使细胞着色有变异。另外，不同系列的血细胞，胞体大小可有很大悬殊，小淋巴直径仅几微米，而巨核细胞直径可达百余微米，有十几倍的差别。为了接近实际，也为了显示在正常范围内细胞大小的比例关系，将工作中常见的各系列、不同阶段的血细胞，以 100×10 倍放大、摄影，经彩扩、剪贴，集中为图 11(常见血细胞形态)和图 12(巨核细胞形态)，以资对照。

以下列出血细胞正常形态及常见的异常形态。

干细胞、祖细胞及其所形成细胞关系

祖细胞	红系	粒—单核	嗜酸	嗜碱	巨核	T—淋巴	B—淋巴
形成细胞	红	中性粒或单核	嗜酸粒	嗜碱粒	巨核	淋巴	淋巴

第一节 红细胞形态

一 正常形态

1 原红细胞(proerythroblast) 胞体直径约为 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ ，圆形或椭圆形，边缘处常有钝角或瘤状突起；胞浆量少，占细胞直径的 $1/5$ ，因其富含 RNA 而着浓重的油墨蓝色，近核周着色较浅淡，即所谓“核周界”，多无颗粒，偶尔有的含嗜天青或深蓝色假颗粒，此乃处于分裂期的细胞 RNA 自凝所致；胞核多为圆形，居中或稍偏一侧，占细胞直径的 $4/5$ ，染色质呈颗粒状，比原粒细胞的染色质粗，核膜明显，核仁 $1 \sim 2$ 个，大小不一，暗蓝色或淡蓝色，常常被染色质深埋而界限不甚清楚。

2 早幼红细胞(basophilic erythroblast) 胞体直径 $10 \sim 18 \mu\text{m}$ ，圆形或椭圆形，细胞的周边仍可见瘤状突起；胞浆开始合成 Hb，故着色较原红细胞

的蓝色稍淡，但不应出现红色调，胞浆占细胞整体的 $1/3$ 以下；胞核多为圆形，居中或稍偏一侧，占细胞整体的 $2/3$ 以上，染色质出现聚集，较原红细胞粗糙，呈现“粗砂粒状”是本阶段的特点，核仁模糊不清或消失。

3 中幼红细胞(polychromatophilic erythroblast) 胞体直径 $8 \sim 15 \mu\text{m}$ ，多为圆形，可有钝角状突起，但瘤状突起已消失；胞浆呈蓝、灰蓝、灰红、浅紫灰或浅红等色调，但必须有“红”的成分后才能划入中幼红细胞，因为此期已合成一定数量的 Hb，故此阶段又称“嗜多色幼红细胞”；胞核多呈圆形，居中或偏心位，占细胞大小的 $1/2$ ，染色质粗糙浓集，呈团块、索条或车轮状，其间有明显的缝隙，似有色玻璃被打碎在白纸上，有色部分是染色质块，显露出的

白纸部分即染色质相互间的缝隙,有人将其称为“副染色质”,无核仁。

4 晚幼红细胞(orthochromatic erythroblast)

胞体直径 $7\sim 10\mu\text{m}$,多呈圆形,已接近成熟红细胞;胞浆量甚丰富,因富含Hb而呈现与成熟红细胞相似的桔红色,亦可带有浅淡的微蓝色调;胞核圆形,居中或偏一侧,小于细胞直径的 $1/2$,染色质浓集成紫黑色团块,看不清任何结构。

5 网织红细胞(reticulocyte) 胞浆中含有核糖核酸(RNA)等嗜碱性物质的红细胞,无论有无细胞核,皆称为网织红细胞。网织红细胞的任何型皆有合成血Hb的能力。Heilmeyer根据细胞发育情况,将网织红细胞分为五型:

0型:嗜碱性物质绕于核周,呈花冠样,故亦称花冠型。

I型:嗜碱性物质呈线团状,位于细胞中央,亦称丝球型。

II型:嗜碱性物质疏松,呈网状分布,亦称网型。

III型:网状结构开始溶解,嗜碱性物质呈不规则分布,亦称破网型。

IV型:残余少量点状颗粒,零散分布,多位于细胞一侧,亦称点粒型。

6 红细胞(erythrocyte) 胞体直径平均 $7.4\mu\text{m}$ 左右,圆形,无细胞核,立体形态似双面凹陷的盘状,周边较厚,中央较薄(约 $1.0\mu\text{m}$),平均厚度 $1.7\mu\text{m}$ 。经染色后显示:细胞中心部位约有 $1/3$ 着色浅淡,称“生理性中心浅染区”,即描述细胞特点时所称“正细胞、正色素”(normocytic normochromic)。

二 异常形态

(一) 无核红细胞的异常

1 大小异常及标准

小红细胞:细胞直径 $<6\mu\text{m}$ 。

大红细胞:细胞直径 $>10\mu\text{m}$ 。

巨红细胞:细胞直径 $>15\mu\text{m}$ 。

超巨红细胞:细胞直径 $>20\mu\text{m}$ 。

注意:在工作中使用的“红细胞大小不均(anisocytosis)”一词,系指同一视野或与其附近的视野中,细胞直径相差一倍以上,否则不可称“大小不均”。因为同一涂片分为片头、片尾,其厚薄不同,干燥的快慢不同,对细胞的大小影响甚大。

2 形态异常 按细胞异常形态,取自然界物体与其近似的形状命名,可分为:

靶形红细胞(target cell)。

球形红细胞(spherocyte)。

椭圆形红细胞(elliptocyte)。

镰状红细胞(sickle cell)。

棘状红细胞(echinocyte)。

口形红细胞(stomatocyte)。

上列形态异常红细胞各有专题讨论,请参阅相应章节。

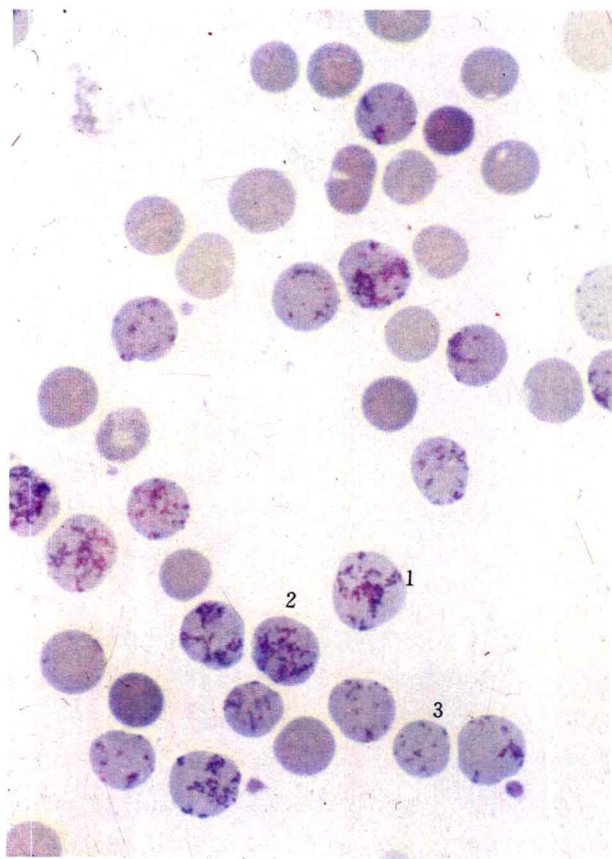


图5 周围血网织红细胞染色

此为溶血性贫血病人周围血的灿烂甲酚蓝(brilliant cresol blue)活体染色标本,可见半数以上红细胞浆内有蓝色网状物,这些网织红细胞比无网状物的红细胞胞体大。

1 破网型网织红细胞。

2 网型网织红细胞。

3 点粒型网织红细胞。

贫血病人,常常存在某种造血原料缺乏或利用障碍时,循环血液中又需要增加红细胞,此时的骨髓常常粗制滥造细胞,所生产的红细胞脆性增大,涂片时极易变形,形成梨形、三角形、月牙形、棍棒形、盔形、泪滴形等等畸形怪态;DIC时,由于所形成的纤

维物缠裹红细胞,会出现更为奇特的怪态红细胞,将其总称为裂细胞(schizocyte)。

缙钱状红细胞:生理情况下,红细胞表面有唾液酸,因而带一层负电荷,使红细胞间保持一定的排斥力(细胞间距约 25nm),不易相互粘贴;当血液中带正电荷的成分增加,例如 α -球蛋白增加时,便抵销了红细胞表面的负电荷,此时的红细胞极易粘合在一起,形似缙钱状,称缙钱状红细胞。

3 着色异常 染色后红细胞表现出来的色调取决于胞浆内嗜碱性物质及合成 Hb 的多寡,规律是:嗜碱性物质多则蓝, Hb 多则红。结合细胞直径大小,着色异常的红细胞可分为:

(1)低色素小红细胞:胞体直径 $<6\mu\text{m}$,细胞中心浅染区扩大,如若细胞中央部分为无色,则称为环形红细胞。见于缺铁性贫血。

(2)高色性小红细胞:胞体直径 $<6.4\mu\text{m}$,厚度 $>2.6\mu\text{m}$,中心自然浅染区消失,亦称球形红细胞。见于先天性球形红细胞贫血。

(3)低色性大红细胞:胞体直径 $>10\mu\text{m}$,细胞的中心浅染区扩大。见于营养不良性大细胞贫血。

(4)高色性大红细胞:胞体直径 $>10\mu\text{m}$,细胞的自然中心浅染区消失。见于大红细胞性贫血及恶性贫血。

(5)嗜碱性红细胞(basophilic erythrocyte):胞体较大,是胞浆着深蓝色的无核红细胞。有人认为它是早幼红细胞因某种原因失去胞核而形成。见于严重的增生性贫血。

(6)嗜多色性红细胞(polychromatic erythrocyte):胞体稍大,细胞的全部或细胞的一部分着灰蓝色、灰红色或浅灰色。有人认为它是中幼红细胞因某种原因失去细胞核后形成。见于各种增生性贫血。

4 结构异常(abnormal structure)

(1)嗜碱性点彩红细胞(basophilic stippling cells):是指在 Wright 染色条件下,胞浆中出现粗大或细小的黑蓝色颗粒的红细胞。这种红细胞常常有胞浆嗜多色特性,属尚未完全成熟的红细胞。正常人血液涂片中甚少见,多见于重金属中毒(特别是铅中毒)及骨髓纤维化病人,巨幼细胞贫血时亦增多。

(2)染色质小体(Howell-Jolly bodies):无核红细胞或幼红细胞的胞浆内出现的圆形、大小为 $1\sim 2\mu\text{m}$ 、数目不定的紫红色物称染色质小体。现已证实,它是细胞核的残余物。见于增生性贫血。

(3)卡一搏环(Cabot rings):在红细胞胞浆中出现的细线环状或 8 字形的红色或紫红色的物质称卡一搏环。它可能是红细胞胞浆中的脂蛋白变性形成的,可同染色质小体共同出现于一个红细胞内。见于溶血性贫血、巨幼细胞贫血或恶性贫血等疾病。在实际工作中,染色质小体易见,而卡一搏环不易见到。

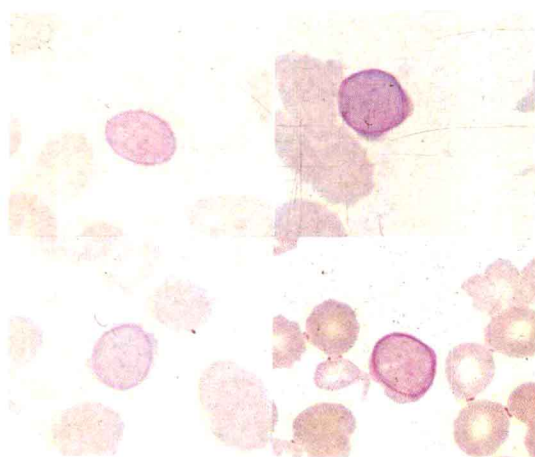


图 6 周围血卡一搏环

基本形态为圆形的卡一搏环。

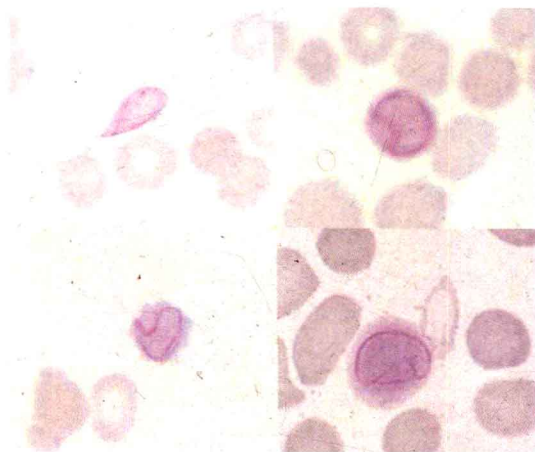


图 7 周围血卡一搏环

环凹陷、环折叠和环泪滴样卡一搏环。