

骨髓涂片评价在药物安全性评价中的操作流程

郭景玥, 王晶晶, 裴天仙, 蔡国栋

天津市新药安全评价研究中心, 天津 300301

摘要: 药物临床前安全性评价是在药物上市前保证药物安全的一个重要的环节, 而其中一个主要目标是为了找出潜在的毒性靶器官以及研究毒性是否可逆。由于造血系统常常会受到药物的影响, 所以骨髓涂片评价也是在药物安全性评价中评估药物对造血系统影响的一个重要的组成部分, 对常规骨髓涂片的操作过程以及重要性进行综述。

关键词: 骨髓涂片; 评价; 样本采集; 实验动物

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)02-0140-03

Operation process and significance of bone marrow smear evaluation in drug safety evaluation

GUO Jing-yue, WANG Jing-jing, PEI Tian-xian, CAI Guo-dong

Tianjin Center for New Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: An important link of preclinical safety evaluation of drugs is to ensure the pre-market drug safety. One of the primary goals is to identify potential target organs for toxicity and to study whether such toxicity is reversible. As the hematopoietic system is often subject to the influence of drugs, the bone marrow smear evaluation is also an important component in assessing the impact of drugs on the hematopoietic system in preclinical safety evaluation of drugs. This article provides a review in operation and significance of routine bone marrow smear.

Key words: bone marrow smear; evaluation; sample collection; laboratory animal

药物临床前安全性评价, 是指通过一系列的实验研究来判断药物对机体的不良反应和影响, 从而为药物的安全性提供全面、准确和严谨的实验数据。为了能够可靠地评估药物实体的安全, 往往需要通过遵守良好实验室规范 (GLP) 的实验室来进行药理学和毒理学实验。毒理学实验中的一项重要内容是推测受试药物的临床毒性靶器官、靶组织及其毒性特征。由于造血系统常常是药物实体暴露的潜在靶器官, 而骨髓是机体最重要的造血器官及负责产生红细胞、粒细胞、淋巴细胞和血小板的中枢淋巴器官^[1], 药物可能会特异性地影响到骨髓细胞的类型或非特异性地影响其细胞增殖、分化, 所以如果外周血检查出现无法解释的异常时, 需要对骨髓进行评价^[2]。通过对骨髓涂片进行细胞学检查来判断药物潜在的血液毒性以及对造血系统的影响。现在也有通过流式细胞技术^[3]、电镜技术^[4]等对骨髓细胞某些方面进行更为详细的评价。本文仅介绍目前广泛使用的常规骨髓涂片的整个操作及评价流程。

1 骨髓样本采集

骨髓样本采集通常都是在实验动物被麻醉或者处死的情况下进行的。从骨髓样本采集的角度来讲, 要获取最理想的骨髓标本, 在剖检取材时, 应该首先采集骨髓, 因为动物被处死后骨髓样本很快会凝结成块状, 并且开始出现自溶现象。在动物被处死后 5 min 之内采集骨髓样本, 细胞形态学最理想^[5]。当然, 每个实验室都可以根据自己的情况在保证骨髓样本质量的前提下进行调整。

1.1 啮齿类动物

对于啮齿类动物, 常见的采集部位是股骨或者胸骨, 需要注意的是, 股骨需要进行纵切采集才能够观察到骨髓样本的状态及采集的质量。

1.2 非啮齿类动物

对于一些非啮齿类动物 (如狗、猴、兔子等) 的采集部位, 有些观点认为采集部位一般是胸骨或者肋骨, 而如果采集部位是股骨, 会出现采集时间过长及电锯产生热量是否会对骨髓细胞产生影响等问

收稿日期: 2011-12-25

作者简介: 郭景玥, 男, 本科。Tel: (022)84845247 E-mail: guojy@tjipr.com

题。有些观点则认为通过股骨采集骨髓,涂片质量仍然是令人满意的^[6]。

由于骨髓涂片的样本质量会受到多方面的影响,很难在相同的客观条件下对因为采集部位的不同而使样本质量发生变化的论点进行实验论证。所以通常情况下,只要能够保证骨髓涂片的样本质量,采集部位无论是胸骨、肋骨还是股骨,都是可以的。

2 骨髓涂片制备

骨髓涂片的制备方法是通过不断的实践经验得来的,每一个实验室都可以根据自己的实验技术以及实践经验在保证骨髓涂片质量的前提下选择不同的制备方法。需要注意的是,在制备过程中,过多或过少的稀释液(血清)不仅会影响整个后续涂片的操作过程,而且对最后的读片也会产生影响。

2.1 人工骨髓涂片制备

2.1.1 大鼠骨髓(股骨)涂片制备 在干净的玻片一端滴一滴大鼠血清或者胎牛血清,然后摘取完整的大鼠股骨,用骨剪从膝关节向髋关节处纵剖,使骨髓暴露并记录骨髓颜色及状态;用尖头镊子将骨髓左右混合均匀后取出少量骨髓,最后将其与置放在玻片上的血清混匀。然后取出另一片干净的玻片作为推片,与玻片形成 $30^{\circ}\sim 60^{\circ}$ 夹角(骨髓液较浓时角度要小些,骨髓液较稀时角度要大些),由一侧向另一侧用力均匀地推出,标本制作完成后应尽快使之干燥。

2.1.2 犬骨髓涂片制备(胸骨/股骨) 在干净的玻片一端滴一滴狗血清,如果采用胸骨作为取材部位,则需要用剪刀沿肋骨的软硬肋连接线内侧大约1 cm处,从肋弓到第二肋骨,将左右肋骨剪断,取出胸骨,用手术刀片从两节胸骨的软骨接缝处取第四或第五胸骨,并将胸骨纵剖,暴露胸骨骨髓并记录骨髓颜色及状态;如果采用股骨作为取材部位,则需完整摘取股骨并用电锯从膝关节横向斩断,使骨髓腔暴露并记录骨髓颜色及状态。然后用尖头镊子将骨髓左右混合均匀后取出少量骨髓,最后将其与置放在玻片上的血清混匀;取出另一片干净的玻片作为推片,与玻片形成 $30^{\circ}\sim 60^{\circ}$ 夹角(骨髓液较浓时角度要小些,骨髓液较稀时角度要大些),由一侧向另一侧用力均匀地推出,标本制作完成后应尽快使之干燥。

2.2 离心涂片机骨髓涂片制备

2.2.1 大鼠骨髓(股骨)涂片制备 摘取完整大鼠股骨,用骨剪从膝关节向髋关节处纵剖,使骨髓腔暴露,用尖头镊子将骨髓左右混合均匀,用镊子尖部取出

骨髓约 0.5 mm^3 放入事先装入 $1.5\sim 2\text{ mL}$ 血清(胎牛血清或同种动物血清)的试管中。再用尖头玻璃滴管反复吹打30次左右抽吸混有骨髓的血清,使骨髓均匀。将骨髓液用微量加样枪取 $30\sim 50\text{ }\mu\text{L}$ (视所取骨髓量而定)加入细胞离心涂片机的小漏斗中,以 $600\sim 800\text{ r/min}$ 中速离心10 min,取出载玻片,标本制作完成。

2.2.2 犬骨髓(股骨)涂片制备 犬完整摘取股骨并用电锯从膝关节横向斩断,使骨髓腔暴露;用 2 mL 注射器配 $18\text{ G}\times 70\text{ mm}$ 针头轻轻吸取出少量骨髓约 0.52 mL ,放入事先装入 $1.5\sim 2\text{ mL}$ 血清(胎牛血清或同种动物血清)的试管中,再用尖头玻璃滴管反复吹打30次左右抽吸混有骨髓的血清,使骨髓均匀分散其中,注意尽量不要将血清吹打出气泡。将骨髓液用微量加样枪取 $30\sim 50\text{ }\mu\text{L}$ (视所取骨髓量而定)加入细胞离心涂片机的小漏斗中,以 $600\sim 800\text{ r/min}$ 中速离心10 min,取出载玻片,标本制作完成^[7]。

3 骨髓涂片染色

骨髓涂片染色在整个操作过程中方法比较统一,但是各个染色方法的侧重点又有所不同,瑞氏(Wright)染色的染料配方浓度对细胞核着色程度适中,细胞核结构和色泽清晰艳丽,对核结构的识别较佳,但对胞浆着色偏酸,色泽偏红,对胞浆内颗粒特别是嗜天青颗粒及嗜中性颗粒着色较差;姬姆萨(Giemsa)染色的染料配方浓度对胞浆着色能力较强,能较好的显示胞浆的嗜碱性程度,特别对嗜天青、嗜酸性、嗜碱性颗粒着色较清晰,色泽纯正,而对胞核着色偏深,核结构显示较差;瑞氏-姬姆萨混合染色则兼顾以上两个染色剂的特点,目前已经开始广泛使用。但无论采用哪种染色方法,都需要注意以下两个问题,一是如果涂片制备完成需要一段时间以后再进行染色,那么在涂片制备完成并晾干后,需要用无水甲醇固定涂片 $1\sim 2\text{ min}$;二是在对涂片进行染色时,缓冲液稀释度越大,染色时间越长,细胞着色较为均匀;反之,稀释度越小,染色时间越短,细胞着色较深,但不鲜艳。

3.1 Wright 染色

将标本涂片平放在染色架上,滴瑞氏染液于涂片上,用滴管将染液荡散,直至布满整个玻片为止(染液量要充足),等待 $1\sim 2\text{ min}$,用配好的缓冲液进行稀释,染液与缓冲液的比例在 $1:2\sim 1:4$,染色时间通常在 $10\sim 30\text{ min}$,但仍需要视何种标本,涂膜厚薄,有核细胞多少及何种细胞而定。最后直

接用自来水冲洗,但水冲力不可太大,以防止脱色或涂膜脱落。

3.2 Geimsa 染色

将标本涂片用无水甲醇固定 2~3 min,再置于稀释过的染液(10 mL 水加入 1 mL 染液)中,染色 10~20 min,取出涂片并用水冲洗,置空气中自行干燥即可。

3.3 Wright-Geimsa 染色

将标本涂片用 Wright 染液充分覆盖,并静置 1~2 min 后,将骨标本涂片移至 5% Giemsa 染液中,轻振后静置 20 min 左右,最后取出涂片并用水冲洗,置空气中自行干燥。

4 骨髓涂片评价

骨髓涂片的评价必须建立在涂片品质优良的前提下,尽可能防止由于人为操作而导致涂片不能客观反应动物本身所应有的生理学状态。骨髓涂片首先应该在低倍镜下观察并确定涂片的涂膜厚度、着色程度以及合适的区域,然后在油镜下对骨髓细胞进行形态学的详细分类及评估^[8]。比较良好的骨髓涂片应该涂膜厚度适中,着色红、蓝分明,含有核细胞多,涂片尾部有造血岛、大细胞或油滴。油镜下在合适的区域内应该由上到下或由下到上,由涂片头部向涂片尾部迂回渐进,分类计数各类有核细胞 300~500 个^[8],并计算出其中各个系统各个阶段有核细胞所占百分数、粒细胞系统各阶段有核细胞总和数、红细胞系统各阶段有核细胞总和数、粒红两系有核细胞的比例。

在观察分类计数过程中,应对各个系统进行详细观察。

4.1 粒细胞系统

观察核形、成熟度(有无分叶过多、核出芽、核松散、核溶解、畸形、Pelger 形核等)、颗粒有无异常(有无中毒性黑褐色大颗粒等)、胞浆反应(有无空泡、吞噬物等)、细胞大小(有无巨幼样变、巨大分叶核等)。

4.2 红细胞系统

观察核形、成熟度(有无核固缩、核碎裂等)、胞浆反应、有无巨大(无核)红细胞。

单核和淋巴细胞系统:观察有无幼稚细胞及形态、体积大小是否异常。

4.3 巨核细胞系统

在低倍镜下计数,在油镜下确认属于何种阶段,核形、成熟度(固缩、分叶)及周围有无血小板并

分类计数。

4.4 浆细胞系统

观察有无幼稚细胞及形态、体积大小是否异常。胞浆是否异常(有无桑椹形、散珠形、葡萄状、火焰状等)

4.5 非造血细胞

如果非造血细胞(各种组织细胞,退化细胞、纤维细胞、网状细胞等)过多,需要进行记录并分析是否是骨髓造血出现问题。

6 结语

骨髓涂片评价是在对骨髓进行评估时的一个不可被其他检查所替代的重要组成部分,要想从骨髓涂片中得到客观真实的数据,减少在操作过程中的各种人为因素是必要的。当然在临床前评价中,血液学检查和骨髓组织学检查仍然是基础,但任何一种单一的检查方法都不能对骨髓造血系统做出完整的评估。近年来国外有通过应用流式细胞技术来参与到对骨髓细胞进行评价的例子,可是由于目前的技术并不是很容易精确区分对啮齿类动物某些细胞系的分类,而且某些骨髓细胞细微的形态学上的改变必须通过人工镜检来进行辨别。所以到目前为止,在对骨髓细胞进行形态学判断时,骨髓涂片评价仍然是能够比较客观反映骨髓造血系统变化的一个重要方法。

参考文献

- [1] Travlos G S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow [J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(5): 548-565.
- [2] Grindem C B, Neel J A, Juopperi T A. Cytology of bone marrow [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2002, 32(6): 1313-1374.
- [3] Saad A, Palm M, Widell S, et al. Differential analysis of rat bone marrow by flow cytometry [J]. *Comp Haemat Int* 2000, 10(2): 97-101.
- [4] Burns W A, Yook C R. Plastic sections and ultrastructural techniques in the evaluation of bone marrow pathology [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1988, 2(4): 525-536.
- [5] Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, et al. *Handbook of Toxicologic Pathology* [M]. San Diego, CA: Academic Press, 2002.
- [6] Andrews C M. The preparation of bone marrow smears from femurs obtained at autopsy [J]. *Comp Haematol Int*, 1991, 1(4): 229-232.
- [7] 范玉明, 张 舒. 毒理学安全性评价标准操作规程指南 [M]. 西安: 电子科技大学出版社, 2009.
- [8] Buetler E, Lichtman M A, Collier B S, et al. *Williams Hematology* [M]. New York, NY: McGraw-Hill, 2001.