

肝癌患者手术前后 T 细胞亚群的变化特点及其意义

李菊香, 苏运钦, 朱梓年, 尹更生, 谢庆芳

(暨南大学附属第一医院临床医学检验中心, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 探讨肝癌患者手术前后外周血 T 淋巴细胞亚群的变化特点。方法: 应用 APAAP 法测定 30 例肝癌患者手术前后的 CD3、CD4 和 CD8 细胞的阳性细胞百分率及其比值, 并与正常对照组比较分析。结果: 30 例肝癌患者手术前 CD3、CD4 及 CD4/CD8 比值明显低于正常对照组, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 手术后 CD4/CD8 的比值有明显提高, 差异也有显著性 ($P < 0.01$), 提示肝癌患者手术前后 CD4/CD8 比值有显著改变。结论: 监测外周血 CD4/CD8 的比值可作为评价肝癌患者病情及手术后预后的一个参考指标。

[关键词] 肝癌手术前后; CD4; CD8; T 淋巴细胞亚群; CD4/CD8

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2007)06-0602-03

Characteristics and significances of blood subgroups of lymphocyte T before and after operation on the patients with liver cancer

LI Ju-xiang, SU Yun-qin, ZHU Zi-nian, YIN Geng-sheng, XIE Qing-fang

(Center of Clinical Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** To study the proportion of blood subgroups of lymphocyte T before and after operation on the patients with liver cancer. **Methods:** The subgroups of lymphocyte T reagent APAAP from BeiJing Biotinge biotech company was used to detect the positive percentage of CD3、CD4 and CD8 T cell, and compare with the controlled group. **Results:** CD3, CD4 and CD4/CD8 reduced obviously before the operation ($P < 0.01$), while after the operation CD4/CD8 increased rapidly. These results showed that CD4/CD8 has notable changed before and after operation. **Conclusion:** The change of the proportion of blood subgroups of lymphocyte T of the patients with liver cancer can be used as an index of the state of illness. and prognosis.

[Key words] liver cancer before and after operation; CD4; CD8; sub-lymphocyte T cell mechanism; CD4/CD8

T 淋巴细胞亚群是反映机体细胞免疫功能的一个指标。一般认为肿瘤的免疫主要是细胞免疫^[1-2]。近年来,虽然有恶性肿瘤患者外周血中 T 淋巴细胞变化特点的报道,但是肝癌患者手术前后

T 细胞变化情况少有报道。为此,本研究采用 APAAP 法分析肝癌患者手术前后 T 淋巴细胞亚群比值,探讨在肝癌的发生、发展及治疗过程中, T 淋巴细胞亚群的变化。

1 材料与方法

1.1 标本来源及试剂

标本为我院临床确诊的住院肝癌患者 30 例,其中术前已发生癌转移的 5 例(包括骨髓转移、淋巴结转移),年龄 20~80 岁,平均 36 岁。正常对照组 20 例,为我院门诊体检的健康人。本实验的 T 细胞亚群检测试剂盒由北京邦定生物技术公司提供。

1.2 方法

采用 APAAP 联酶免疫法检测 T 细胞亚群。

(1)单个核细胞涂片制备:取正常对照组和患者在手术前和手术后 3 周的肝素抗凝静脉血 1~2 mL,用 PBS 缓冲液稀释 2~3 倍,加入到含有 2~3 mL 淋巴细胞分离液的试管上层,血液要沿管壁缓缓加入,使两液间保持清晰界面。2 000 r/min 离心 15~20 min,吸取血浆和分离液之间的单个核细胞层,加 5 倍 PBS 缓冲液混匀,800~1 000 r/min 离心 5 min,去掉上清,沉淀即为单个核细胞。将上述分离

好细胞的试管倒置,尽量去掉上清液。利用剩余的小许液体将沉淀细胞混匀获得悬液,取细胞悬液滴于涂有一层粘片剂的玻片上,涂一薄层细胞,快速吹干。

(2)标本染色:①固定 1~2 min 后,用 PBS 冲洗;②加抗 T 亚群单克隆抗体 10~15 μ L,放湿盒 20~30 min;③加羊抗鼠 IgG 二抗 10~15 μ L,温室放置 20~30 min;④加 APAAP 复合物 10~15 μ L,温室放置 20~30 min;⑤加碱性磷酸酶底物显色(临用前取底物,按每 mL 底物液加 1 mg 坚固红充分混匀。取 20~40 μ L 加于标本上,温室显色 15~30 min);⑥用自来水中止显色;⑦加苏木素复染液一滴复染 1~2 min,用自来水冲洗干净。

(3)结果观察:高倍镜下观察,细胞核呈蓝色,细胞表面有红色标记物的细胞为阳性细胞,无红色标记物的细胞为阴性细胞,计数 100~200 个单个核细胞,计数阳性细胞百分率,进行比值计算。各项指标通过统计学分析用均值标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验比较显著性的差异。

2 结果

(1)肝癌患者手术前后 T 细胞亚群的变化特点见表 1,结果显示肝癌患者手术前 CD3、CD4 及 CD4/CD8 比值明显低于正常对照组,差异有显著性($P < 0.01$),手术后 3 周的 CD3、CD4 及 CD4/CD8 明显升高,差异也有显著性($P < 0.001$)。

(2)肝癌转移组与未转移组的 CD3、CD4 及 CD4/CD8 的改变情况见表 2,结果显示 5 例术前已发生癌转移的患者与未转移组相比,CD4 降低更明显,而 CD8 更明显升高,CD4/CD8 比值更低,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 肝癌患者手术前后 T 细胞亚群的变化

分组	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
正常	0.5845 \pm 0.055	0.4300 \pm 0.018	0.2360 \pm 0.026	1.843 \pm 0.220
术前	0.4360 \pm 0.036 ¹⁾	0.3080 \pm 0.039 ¹⁾	0.3280 \pm 0.026 ¹⁾	0.9400 \pm 0.091 ¹⁾
术后	0.4600 \pm 0.028 ²⁾	0.3650 \pm 0.032 ³⁾	0.2700 \pm 0.020 ³⁾	1.350 \pm 0.149 ³⁾

与正常对照组相比,1) $P < 0.001$;手术前后组相比,2) $P < 0.01$;3) $P < 0.001$

表 2 肝癌患者转移组和未转移组之间 CD4/CD8 的改变

分组	CD4	CD8	CD4/CD8
转移	0.3080 \pm 0.044	0.3340 \pm 0.017	0.9214 \pm 0.115
未转移	0.3696 \pm 0.039 ¹⁾	0.3068 \pm 0.028 ¹⁾	1.206 \pm 0.087 ¹⁾

与转移组相比,1) $P < 0.05$

3 讨论

人类 T 淋巴细胞是由不同亚群组成的,分别介导特定的细胞免疫功能。应用 CD4 和 CD8 单克隆抗体可将外周淋巴器官或外周血中的 T 细胞分为

CD4⁺CD8⁻和 CD4⁻CD8⁺两个主要亚群。临床上主要是借助于某些特异性抗 CD 分子单抗,采用流式细胞仪或免疫组织化学检测外周血 T 淋巴细胞亚

群,并依据不同亚群数量异常初步判断患者的免疫功能状态。机体内环境的平衡,有赖于体内各类细胞免疫的免疫功能处于相对稳定状态。T淋巴细胞按其表面标志物和功能不同分为 CD4 T 细胞亚群和 CD8 T 细胞亚群,前者主要为辅助性 T 细胞(Th),后者包括抑制性 T 细胞(Ts)及杀伤性 T 细胞(Tc)。外周血 T 细胞亚群在数量上的协调比例,特别是 CD4/CD8 的比值是反映细胞免疫平衡与否的敏感指标,有助于反映机体免疫反应的调节能力^[3-4]。在正常情况下,CD4/CD8 比值维持动态平衡,以保持机体免疫功能稳定^[5]。

本研究结果显示肝癌患者手术前 CD3、CD4 细胞数量明显减少,CD8 细胞数目增高,CD4/CD8 比值下降,与正常对照组比较差异显著($P < 0.01$),提示肝癌患者手术前细胞免疫功能低下,可能由于肝癌患者体内癌细胞分泌一些体液性或可溶性因子,这些因子诱导 CD8 细胞和 CD4 细胞发生异常,导致 CD4/CD8 比值失衡,反映机体免疫反应的调节能力下降^[1]。另外,转移组与非转移组比较显示发生癌转移时,CD3、CD4 细胞数量减少更明显,CD8 细胞增高更多,CD4/CD8 比值更低,提示肝癌晚期患者其细胞免疫功能更低下,预后更差。肝癌患者手术后 3 周 CD3、CD4 细胞数明显增高,CD4/CD8 比值明显升高,提示肝癌患者手术后去除肿瘤,清除免疫抑制,使免疫功能不同程度恢复。潘池^[6]应用 S-P 一步法检测 30 例原发性肝癌病人肝动脉介入栓塞化疗(TACE)前后 T 细胞亚群的变化,也认为 T 细胞亚群测定可作为原发性肝癌病人行 TACE 治疗后疗效判定的辅助指标。虽然 TACE 治疗与手术治方法不同,T 细胞亚群检测方法也不同,但是得出结论相似。因此,通过动态检测肝癌患者 T 淋巴细胞亚

群变化对临床诊断、判断病情、手术后的预后及疗效观察有一定的临床意义。T 淋巴细胞亚群的变化反映了整个复杂的免疫反应异常的一个环节。与其它免疫环节的相互作用及调控十分复杂,有待进一步探讨。

近年来,有些医院检验科使用流式细胞技术对细胞或颗粒悬液进行快速分析,在临床上取得较好的成效,但是流式细胞仪价格昂贵,尚未普及使用,尤其基层医院。而且本研究应用的 APAAP 联酶免疫法利用单抗特异性检测 CD3、CD4、CD8 细胞抗原的标志,能客观较准确地测定各种细胞的阳性比例,操作简便,价格低廉,值得基层医院使用。

[参考文献]

- [1] 卢香兰,李霞,王萍萍,等. 恶性肿瘤患者 T 细胞亚群和 SIL-2R 的变化及意义[J]. 中国医科大学学报, 2004,33(3):243-244.
- [2] 陈复兴,刘军权,周忠海,等. 癌症患者 T 细胞亚群的临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002,18(1):55.
- [3] 段民新,刘 锟. 肺癌患者红细胞免疫功能与外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 临床肿瘤学杂志, 2001,6(2):109-111.
- [4] YASUTOMO K. The cellular and molecular mechanism of CD4/CD8 lineage commitment[J]. J Med Invest, 2002, 49(1-2):1-6.
- [5] 董西林,王亚娟,孙雅娟,等. 肺癌患者外周血 T 细胞亚群及免疫细胞活性的研究[J]. 西安医科大学学报, 1999,20(4):474-475.
- [6] 潘 池. 肝癌患者 T 细胞亚群检测及临床意思[J]. 临床肿瘤学杂志, 2000,5(4):248-250.

[责任编辑:陈咏梅]