

外周血淋巴细胞免疫表型检验对恶性肿瘤患者细胞免疫功能的价值

张 静 周真珍 宋俐君

(郑州市中医院, 河南 郑州 450006)

〔摘要〕 **目的:** 探究外周血淋巴细胞免疫表型检验对恶性肿瘤患者细胞免疫功能的评估价值。**方法:** 选取2019年1月至2022年1月郑州市中医院收治的40例恶性肿瘤患者, 将其作为观察组, 另选取同期40例健康体检者作为对照组。采集两组研究对象的空腹静脉血, 应用流式细胞仪检验外周血淋巴细胞免疫表型(CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺), 比较两组研究对象外周血淋巴细胞免疫表型检验结果以及观察组不同化疗周期、有无转移患者的外周血淋巴细胞免疫表型指标差异性。**结果:** 观察组CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺高于对照组, CD3⁺CD4⁺低于对照组, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 不同化疗周期患者相比, 化疗周期 > 6 周期患者的CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺均高于未化疗、化疗周期1~6周期者, CD3⁺CD8⁺低于未化疗、化疗周期1~6周期者, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 肿瘤未转移患者的CD3⁺CD4⁺高于转移患者, CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺低于转移患者, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 恶性肿瘤患者伴随细胞免疫功能缺陷, 加强外周血淋巴细胞免疫表型检验, 能够监视肿瘤免疫状态, 辅助病情评估及预后判断。

〔关键词〕 恶性肿瘤; 外周血淋巴细胞免疫表型; 细胞免疫功能

〔中图分类号〕 R 730.43 **〔文献标识码〕** B

恶性肿瘤是多种因素共同作用下所致的基因异常疾病, 直接表现为细胞恶性增生, 具有侵袭性与可转移性, 在70岁以上老年群体有着较高的发病率^[1]。随着近年来环境的改变、生活节奏的加快以及膳食的不合理, 恶性肿瘤发生率有所升高, 且呈现出年轻化趋势。尽管目前恶性肿瘤病因机制尚未完全明确, 但已有研究证明细胞免疫功能的减弱与恶性肿瘤形成密切相关^[2]。机体免疫系统能够有效监视恶变细胞, 并对恶性细胞具有杀灭作用。细胞免疫功能下降是肿瘤的高危因素, 恶性肿瘤的发展也会导致免疫功能下降, 两者互为因果, 由此形成一个恶性循环^[3]。临床对恶性肿瘤患者予以细胞免疫功能检测, 能够辅助肿瘤严重程度评估, 为临床治疗方案选择提供可靠的依据。目前关于T淋巴细胞亚群在恶性肿瘤中参与的研究较多, 但鲜有所有淋巴细胞亚型在恶性肿瘤中变化的研究。基于此, 本研究收集40例郑州市中医院收治的恶性肿瘤患者及40例健康体检者进行对照研究, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2022年1月郑州市中医院收治

的40例恶性肿瘤患者, 将其作为观察组, 另外选择同期在郑州市中医院行健康体检的40例健康体检者作为对照组。观察组男女比例为23:17, 年龄21~76岁, 平均(58.78 ± 8.58)岁; 疾病类型: 呼吸系统肿瘤11例, 胃肠肿瘤16例, 生殖系统肿瘤10例, 其他3例; 化疗周期: > 6 周期14例, 1~6周期16例, 未化疗10例; 25例肿瘤未转移, 15例转移。对照组男女比例为24:16, 年龄21~77岁, 平均(59.18 ± 8.37)岁。两组研究对象年龄、性别比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。研究对象均知情同意本研究, 自愿参与。研究获得医学伦理委员会许可(S2019-010-03)。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 (1) 恶性肿瘤的诊断参照《2015年美国癌症筛查指南》的相关诊断标准^[4]; (2) 研究对象年龄均在18岁以上; (3) 可与医师建立正常沟通关系, 能做到基本的配合, 可顺利完成研究。

1.2.2 排除标准 (1) 病情累及到患者重要脏器, 肝肾功能明显异常或受损; (2) 存在意识模糊或神志不清、精神障碍者; (3) 伴随全身感染性疾病; (4) 血常规检查有明显异常; (5) 合并器质性疾病或自身免疫性疾病者; (6) 妊娠及哺乳期女性; (7) 研究期间患

〔收稿日期〕 2022-11-01

〔作者简介〕 张静, 女, 主管检验师, 主要从事检验科工作。

者出现院内不良事件,或伴随其他突发状况、严重并发症,导致生命受到威胁者。

1.3 方法

(1) 血液样本采集。两组研究对象均保持空腹于清晨接受外周静脉血采集,采血量 5 mL。先行常规检测,剩余血样标本应用贝克曼库尔特 EPICS XL 流式细胞仪(天晴干细胞股份有限公司)进行检测。(2) 操作步骤。配置溶血剂工作液,取出溶血剂浓缩液,根据样本数量对用量予以计算,按照 1:10 的比例应用去离子水稀释,称为 1× 血细胞分析用溶血剂工作液,平衡至 23 °C 左右备用。1× 固定/破膜工作液现配现用,存储时间应 < 24 h。1× 破膜缓冲液按照样本量选择用量,采用去离子水稀释成为 1:10 缓冲液,留适当余量。若未用完用保存于 2 ~ 8 °C 冰箱环境下。将 eZFluor™ 抗人 CD4⁺ (5 μL)、CD3⁺ (5 μL)、CD8⁺ (5 μL)、CD56⁺ (20 μL),然后加入荧光标记单克隆抗体。将等量阴性对照抗体加入对照管。反复颠倒,使乙二胺四乙酸二钾盐(ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt, EDTA-K2)抗凝全血混匀,采用反向移液法将 100 μL 抗凝全血吸取,并缓慢加入试管底部,避免触及试管壁,引起染色不均。在其林贝尔 VORTEX-6 涡旋振荡器(济南欧莱博技术有限公司)作用下对加入荧光抗体的样本实施震荡处理,调整室温 20 ~ 25 °C,避光状态下进行 20 min 孵育。应做好温度控制,必要时使用空调,避免影响实验结果。将 1 mL 1× 血细胞分析用溶血剂加入荧光抗体样本管,涡旋混匀,至少持续 10 s,并在室温下避光孵育,时间为 15 min。在 TG16C 台式高速离心机(长沙英泰仪器有限公司)上进行处理,共处理 5 min,持流式管将上清液倒出,回正,避免二次倾倒引起细胞丢失。对流式管底部剩余液体进行涡旋处理,混匀,加入 1 mL Flow Cytometry Staining Buffer。室温下避光孵育 1 h,然后将 2 mL 1× 工作液加入其中,300×g 离心处理 5 min。去除上清液,加入 2 mL 1× 工作液,离心 5 min 去除上清液。将 2 μL 2% 鼠血清加入,孵育 15 min。上述步骤反复 3 次。经过染色,加入 500 μL Buffer,采用流式细胞仪进行检测,设置好流速。在直方图中框出淋巴细胞群,选取 5000 个淋巴细胞,计算其所占百分比情况,对检测数据予以记录。

1.4 观察指标

比较观察组与对照组的外周血淋巴细胞免疫表型(CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺),并比较观察组中不同化疗周期、有无转移患者的外周血淋巴细胞免疫表型指标差异性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组研究对象外周血淋巴细胞免疫表型检验结果比较

观察组患者外周血 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺ 高于对照组,CD3⁺CD4⁺ 低于对照组,差异均具有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 两组研究对象外周血淋巴细胞免疫表型检验结果比较
(*n* = 40, $\bar{x} \pm s$, %)

组别	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
对照组	24.50 ± 4.52	2.24 ± 0.18	11.35 ± 1.27	36.18 ± 3.17
观察组	33.29 ± 3.53 ^a	6.04 ± 1.24 ^a	14.84 ± 2.47 ^a	30.52 ± 4.22 ^a

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05。

2.2 观察组中不同化疗周期患者淋巴细胞免疫表型比较

与化疗周期 1 ~ 6 周期及未化疗的患者比较,化疗周期 > 6 周期患者的外周血 CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD4⁺ 水平平均更高,CD3⁺CD8⁺ 水平平均更低,差异均具有统计学意义(*P* < 0.05);化疗周期 1 ~ 6 周期患者的各项淋巴细胞免疫表型与未化疗患者比较,差异均具有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

表 2 观察组中不同化疗周期患者外周血淋巴细胞免疫表型比较
($\bar{x} \pm s$, %)

化疗周期	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
未化疗	10	35.42 ± 2.85	4.74 ± 0.53	13.26 ± 1.24	27.49 ± 2.53
1 ~ 6 周期	16	32.49 ± 3.73 ^b	6.03 ± 0.63 ^b	16.42 ± 1.63 ^b	32.19 ± 3.14 ^b
> 6 周期	14	26.33 ± 3.25 ^{bc}	6.84 ± 1.24 ^{bc}	19.21 ± 2.15 ^{bc}	35.93 ± 2.52 ^{bc}

注:与未化疗比较,^b*P* < 0.05;与 1 ~ 6 周期比较,^c*P* < 0.05。

2.3 观察组中肿瘤转移与未转移淋巴细胞免疫表型比较

肿瘤未转移患者的外周血 CD3⁺CD4⁺ 高于转移患者,CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺ 低于转移患者,差异均具有统计学意义(*P* < 0.05),见表 3。

表 3 观察组中肿瘤转移与未转移患者外周血淋巴细胞免疫表型比较
($\bar{x} \pm s$, %)

转移情况	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
未转移	25	28.93 ± 3.24	5.13 ± 1.04	13.63 ± 2.47	33.73 ± 2.57
转移	15	34.69 ± 3.02 ^d	7.34 ± 1.12 ^d	17.03 ± 2.39 ^d	28.84 ± 2.12 ^d

注:与未转移比较,^d*P* < 0.05。

3 讨论

流行病学调查研究发现,近年来恶性肿瘤发病率逐年增长,成为了威胁人们生命健康的常见病,受到了医学界的高度重视^[5]。有学者在研究中提出,免疫系统能够对微生物侵犯起到防御作用,且能够从机体清除已经发生改变的宿主成分,具备抗肿瘤免疫机制^[6]。而当免

疫系统由于自身或肿瘤细胞原因被削弱,肿瘤的形成与发展则具备了有利的环境。基于此,细胞免疫功能状态能够在一定程度上反映出患者的疾病进展与预后情况^[7-8]。目前,免疫疗法已经被应用于恶性肿瘤治疗中,关于细胞免疫功能与肿瘤相关性研究较多,加强对细胞免疫功能状态的评估,对于患者疾病诊断、疗效评估以及治疗方案选择意义重大^[9]。

T淋巴细胞介导了细胞免疫应答,参与人体抗肿瘤反应,既往被应用于免疫系统疾病以及心血管疾病等诊断与治疗中。作为成熟淋巴细胞,CD3⁺同时也是细胞免疫中的重要活性细胞,其主要功能为促进CD4⁺、CD8⁺T细胞的活化^[10]。CD3⁺CD4⁺属于辅助性T淋巴细胞代表,能够对细胞免疫功能起到正向调节作用,有利于吞噬细胞抗感染能力的提升,对肿瘤细胞具有一定的抵抗作用;CD3⁺CD8⁺则为抑制性T淋巴细胞典型代表,对细胞免疫功能为负向调节作用,可对机体免疫应答起到抑制作用^[11]。作为自然杀伤(natural killer, NK)T细胞,CD3⁺CD56⁺是在各类细胞因子诱导作用下产生的,可产生细胞溶解效应,在肿瘤以及感染性疾病、自身免疫疾病形成、发展中有重要的参与作用^[12]。CD3⁺CD56⁺为NK T细胞,其既能够表达NK细胞,又能够表达T淋巴细胞表面标志物。以往有学者在研究中比较了恶性肿瘤患者与健康者CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁺,可以发现前者在恶性肿瘤患者中水平更高,后者低于对照组,差异显著,提示恶性肿瘤患者伴随免疫功能紊乱^[13]。

从本研究研究结果来看,观察组患者外周血CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺高于对照组,CD3⁺CD4⁺低于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),结果提示恶性肿瘤患者免疫失衡,机体免疫抑制作用强于辅助作用,与以往学者研究结果一致。化疗是临床治疗恶性肿瘤的常见手段,其在延长患者生存期、改善临床症状方面具有一定的作用^[14]。本研究通过对不同化疗周期患者外周血淋巴细胞免疫表型的检验,发现化疗>6周期的患者外周血CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺高于未化疗、化疗1~6周期者,CD3⁺CD8⁺低于未化疗、化疗1~6周期者,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),这是因为化疗可有效杀灭肿瘤细胞,且随着化疗的持续作用,患者免疫抑制状态能够得到显著的改善,有利于免疫功能的提升,维持机体免疫平衡^[15]。但化疗药物在杀灭肿瘤细胞的同时,也会将部分健康免疫细胞杀灭,出现免疫双重调节现象,应予以重视。对于肿瘤转移与未转移组患者的淋巴细胞免疫表型,显示未转移组患者外周血CD3⁺CD4⁺高于转移组,CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺低于转移组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),表明发生肿瘤转移的患者免疫系统受损更严重,通过检验能够辅助评估疾病严重程度及是否转移,但由于本研究现有资源有限,患者纳入过少,研究可能有

所偏倚,后续需要进一步完善研究,丰富观察指标,为试验提供数据支撑。

综上所述,恶性肿瘤患者伴随细胞免疫功能缺陷,加强外周血淋巴细胞免疫表型检验,能够监视肿瘤免疫状态,辅助病情评估及预后判断。

[参考文献]

- (1) 杨舒,李晶,冯燕,等.昆明医科大学附属延安医院收治的9303例恶性肿瘤首诊患者流行病学特征分析(J).职业与健康,2020,36(17):2351-2355.
- (2) 佟川,王瑶,韩为东.嵌合抗原受体-T细胞免疫治疗B细胞恶性肿瘤的生物标志物可评估治疗疗效和毒性(J).中华检验医学杂志,2022,45(8):875-880.
- (3) 石金凤,李庆伟,王浩.分化抑制因子在免疫细胞发育及血液恶性肿瘤发生中的调控作用(J).中国生物化学与分子生物学报,2021,37(11):1458-1465.
- (4) Smith RA, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2015: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening (J). CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 30-54.
- (5) 乐晨琴,周欣毅,杨琦,等.合并结肠恶性肿瘤的多原发恶性肿瘤临床流行病学特点及病理特征分析(J).中华肿瘤杂志,2022,44(8):888-892.
- (6) 耿一超,张秋宁,卢冰,等.重离子束联合免疫疗法治疗恶性肿瘤的基础研究进展(J).中华放射肿瘤学杂志,2021,30(8):867-870.
- (7) 徐玉林,胡永仙,曾祥钧,等.嵌合抗原受体T细胞免疫治疗血液系统恶性肿瘤的现状及其面临的问题(J).国际输血及血液学杂志,2020,43(1):1-7.
- (8) 曹敏,尹英爱,侯海娜.142例淋巴结恶性肿瘤细针吸取活检结合细胞块免疫组化标记的意义探讨(J).诊断病理学杂志,2020,27(10):709-713.
- (9) 陈刚,吴嫣然,李婧.免疫治疗时代对恶性肿瘤中西医结合治疗的思考(J).现代中西医结合杂志,2022,31(3):376-380.
- (10) 于晓洁,丘木水.CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞在结肠癌诊治中的临床应用(J).检验医学与临床,2021,18(18):2758-2762.
- (11) 嵇利芳,翁佰琴,姚萍丽,等.COPD合并肺部真菌感染外周血(1-3)- β -D葡聚糖和淋巴细胞CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺水平变化(J).中华医院感染学杂志,2022,32(13):1960-1964.
- (12) 周晓海,黄玉如,杨向绸,等.CD3⁺CD56⁺NK细胞及CD3⁺CD56⁺NKT样淋巴细胞在急性白血病患者中的变化(J).中国卫生检验杂志,2020,30(17):2086-2089.
- (13) 隗传超,柏方,刘维燕,等.乳腺癌患者术前、术后及化疗后外周血CD4⁺、CD8⁺和B细胞的变化及临床意义(J).海军医学杂志,2018,39(1):33-37.
- (14) 王辉,边晨峰.顺铂联合吉西他滨循环热灌注化疗对肝癌腹腔积液患者恶性肿瘤特异性生长因子、癌胚抗原水平的影响(J).中国药业,2021,30(3):63-65.
- (15) 刘通,徐健,许凝.CIK细胞免疫治疗联合化疗治疗广泛期小细胞肺癌一例(J).实用肿瘤杂志,2021,36(3):218-221.