

• 临床检验研究 •

慢性肾功能衰竭患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变迁

刘霞¹, 胡宗海^{1#}, 刘毓刚¹, 帖儒修², 吴丽娟^{1△}

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

摘要:目的 了解慢性肾功能衰竭(CRF)患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化规律, 探讨 CRF 患者的免疫功能状态。方法 采用三色流式细胞学检测技术, 检测 34 例 CRF 患者, 34 例非 CRF 患者和 194 例健康体检者的外周血 T 淋巴细胞亚群水平, 并对其结果进行比较分析。结果 CRF 组总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞的百分含量(%)依次为 62.69 ± 2.00 、 35.69 ± 1.38 和 20.90 ± 1.58 ; T_4/T_8 比值 2.19 ± 0.24 , 总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞的绝对含量($\times 10^9/L$)依次为 0.88 ± 0.08 、 0.50 ± 0.05 和 0.30 ± 0.03 。与非 CRF 组和对照组比较发现, 患者总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞绝对含量的减少($P < 0.01$, $P < 0.05$), 总 T 细胞、 T_8 细胞在淋巴细胞中所占比例的减少($P < 0.01$, $P < 0.05$), T_4/T_8 比值升高($P < 0.01$)。结论 CRF 患者机体免疫功能紊乱, 且以 T_8 细胞功能减低和 T_4 细胞功能相对亢进为特征。流式检测 CRF 患者 T 淋巴细胞亚群有助于病情和疗效监测。

关键词:慢性肾功能衰竭; T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 免疫功能

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2317-02

The alteration of T-lymphocyte subsets in peripheral blood in patients with CRF

Liu Xia¹, Hu Zonghai^{1#}, Liu Yugang¹, Tie Ruxiu², Wu Lijuan^{1△}

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China;

2. Department of Medical Laboratory, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the alteration regularity of peripheral blood T-lymphocyte subsets in patients with chronic renal failure (CRF group), and investigate their immune functional status. **Methods** Peripheral blood T-lymphocyte subsets were detected by 3-color flow cytometry in 34 patients with CRF, 34 patients with non-CRF (non-CRF group) and 194 health people (control group). The results were analyzed statistically. **Results** In CRF group, the percentages of T lymphocyte, $CD4^+$ T lymphocyte and $CD8^+$ T lymphocyte as well as the ratio of $CD4^+ / CD8^+$ were 62.69 ± 2.00 , 35.69 ± 1.38 , 20.90 ± 1.58 and 2.19 ± 0.24 , and the absolute quantities of T lymphocyte, $CD4^+$ T lymphocyte and $CD8^+$ T lymphocyte were 0.88 ± 0.08 , 0.50 ± 0.05 and 0.30 ± 0.03 . Compared with non-CRF group and control group, the absolute quantities of T-lymphocyte, $CD4^+$ T lymphocyte and $CD8^+$ T lymphocyte were significantly lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the ratio of $CD4^+ / CD8^+$ was clearly higher ($P < 0.01$). **Conclusion** The results suggest that the function of $CD8^+$ T-lymphocyte decrease, of $CD8^+$ T-lymphocyte rise, and there is immune function disorder in patients with CRF. Peripheral blood T-lymphocyte subsets in patients with CRF detected by flow cytometry conduce to patients' condition and curative effect monition.

Key words: kidney failure, chronic; T-lymphocyte subsets; flow cytometry; immune function

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)又称慢性肾功能不全,是指各种原因造成的慢性进行性肾实质损害,致使肾脏明显萎缩,不能维持其基本功能,临床出现以代谢产物潴留、水、电解质、酸碱平衡失调,全身各系统受累为主要表现的临床综合征,也称为尿毒症。通常认为 CRF 患者存在机体免疫功能受损与紊乱,临床表现为感染和肿瘤的发病率增高^[1-3]。为了探讨 CRF 患者的细胞免疫功能,本研究采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)对 CRF 患者、临床非 CRF 患者和健康人群的外周血 T 淋巴细胞亚群进行了测定和分析,拟通过外周血 T 淋巴细胞亚群的变迁规律,探讨 CRF 患者的免疫功能改变,为临床患者的病情判断及疗效监测提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 慢性肾功能衰竭患者(CRF 组)34 例,为重庆市某三甲医院住院患者中被确诊的 CRF 患者,男 16 例,女 18 例,年龄 37~73 岁,平均 53.53 岁,患者无感染、肿瘤等并发症,肾小球滤过率(GFR)10~20 mL/min,内生肌酐清除率(Scr)451~707 $\mu\text{mol/L}$,临床分期处于肾功能衰竭期。对照组为该院同期住院患者中的非 CRF 患者 34 例,男 21 例,女 13

例,年龄 23~70 岁,平均 42.41 岁,其慢性肾炎 8 例,肾结石 8 例,肾盂肾炎 7 例,多囊肾 7 例,贫血患者 1 例、乙肝相关性肾病 1 例、狼疮性肾炎 1 例、类风湿关节炎 1 例。对照组为 194 例健康体检人群中证实的健康个体,男 96 例,女 98 例,年龄在 19~62 岁之间,平均年龄为 37.4 岁。

1.2 标本采集 清晨采集静脉血 2~3 mL, EDTA-K₂ 抗凝(紫头真空采血管),立即检验。

1.3 流式 T 细胞亚群的检测 采用双平台法三色流式细胞术、SSC/FSC 设门淋巴细胞,分析总 T 细胞($CD3^+$)、 T_4 细胞($CD3^+CD4^+$)、 T_8 细胞($CD3^+CD8^+$)的百分含量和绝对含量,并计算 T_4/T_8 细胞比值。全部试剂(如同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5,测定抗体 $CD4$ -FITC/ $CD8$ -PE/ $CD3$ -PC5、标本预处理试剂等)均为美国 BECKMAN-COULTER 公司产品,仪器采用 BECKMAN-COULTER XL4-MCL 型流式细胞仪。具体检测方法见参考文献[4]。

1.4 统计学处理 所有统计学处理均采用 SPSS 13.0 软件进行,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,百分数的组间比较采用方差分析,计量资料组间比较采用 t 检验。

2 结 果

与对照组比较, CRF 组总 T 细胞、 T_8 细胞百分含量明显下降($P<0.01, P<0.05$), T_4/T_8 比值明显升高($P<0.01$), 总 T 细胞、 T_4 细胞和 T_8 细胞绝对含量均明显减少($P<0.01, P<0.05$); 非 CRF 组总 T 细胞、 T_4 细胞和 T_8 细胞的百分含量无明显改变, 但是绝对含量均明显减少($P<0.01, P<0.05$)。非 CRF 组与 CRF 组比较, CRF 组总 T 细胞、 T_8 细胞明显减少

($P<0.01, P<0.05$), T_4/T_8 比值明显升高($P<0.05$), 总 T 细胞绝对含量明显减少($P<0.05$)。上述结果表明, CRF 患者体内存在明显的免疫功能紊乱, 表现出总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞绝对含量的减少以及总 T 细胞、 T_8 细胞在淋巴细胞中所占比例的减少和 T_4/T_8 比值升高的特点, 提示机体免疫功能降低, 且以 T_8 细胞功能减低和 T_4 细胞功能相对亢进为特征。结果见表 1。

表 1 流式外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	百分含量(%)			T_4/T_8	绝对含量($\times 10^9/L$)		
		总 T 细胞	T_4 细胞	T_8 细胞		总 T 细胞	T_4 细胞	T_8 细胞
对照组	194	69.98 \pm 5.79	35.25 \pm 5.16	25.08 \pm 4.34	1.45 \pm 0.28	1.69 \pm 1.10	1.10 \pm 0.74	0.73 \pm 0.60
非 CRF 组	34	71.25 \pm 1.32	35.07 \pm 1.18	26.50 \pm 1.53	1.56 \pm 0.17	1.31 \pm 0.11 ^a	0.65 \pm 0.06 ^a	0.48 \pm 0.05 ^b
CRF 组	34	62.69 \pm 2.00 ^{bd}	35.69 \pm 1.38	20.90 \pm 1.58 ^{ac}	2.19 \pm 0.24 ^{bd}	0.88 \pm 0.08 ^{bc}	0.50 \pm 0.05 ^b	0.30 \pm 0.03 ^a

^a: $P<0.05$, ^b: $P<0.01$, 与对照组比较; ^c: $P<0.01$, ^d: $P<0.01$, 与非 CKD 组比较。

3 讨 论

CRF 免疫功能紊乱各家文献报道出入较大, 如高玲等^[5]采用流式细胞术检测 23 例 CRF 患者外周血 T 细胞发现, 患者 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 淋巴细胞减少, $CD8^+$ 淋巴细胞增加, $CD4/CD8$ 比值显著下降; 而钟琼等^[6]同样采用流式细胞术测定了 48 例 CRF 患者外周血 T 细胞亚群, 却发现患者 $CD3^+$ T 细胞的绝对含量、 $CD3^+CD4^+$ T 细胞(即 T_4 细胞)和 $CD3^+CD8^+$ T 细胞(即 T_8 细胞)的百分含量均较健康组升高, T_4/T_8 比值升高。出现上述不一致的结果, 我们推测与所分析的 CRF 患者筛选标准不一致有关。众所周知, CRF 临床可分为四期, 包括代偿期、失代偿期、肾功能衰竭期和尿毒症期。代偿期肾单位受损未超过 50%, GFR 在 50~80 mL/min, Scr 133~177 μ mol/L, 无临床症状; 失代偿期患者肾小球滤过率(GFR) 50~20 mL/min, 肌酐清除率(Scr) 186~442 μ mol/L, 临床上有乏力、轻度贫血、食欲减退等全身症状; 肾功能衰竭期患者 GFR 10~20 mL/min, Scr 451~707 μ mol/L, 患者出现严重贫血, 代谢性酸中毒, 水电解质代谢紊乱; 尿毒症期患者 GFR<10 mL/min, Scr>707 μ mol/L, 临床上代谢酸中毒加重, 全身各系统症状突出。处于不同临床分期的患者, 其肾功能受损程度不同, 血液中毒性物质的含量相差甚远, 对淋巴细胞的影响可能存在差异。同时, CRF 患者免疫功能异常, 容易发生细菌感和肿瘤等。患者合并感染或肿瘤时, 其淋巴细胞亚群的变迁将受到感染和肿瘤刺激的影响。本研究以 34 例无感染及肿瘤并发症的处于肾功能衰竭期的 CRF 患者为观察对象, 结果证实患者总 T 细胞、 T_8 细胞在淋巴细胞中的百分含量明显下降, T_4 细胞无明显消长(即相对增加), T_4/T_8 比值明显升高, 并且总 T 细胞、 T_4 细胞和 T_8 细胞的绝对含量均明显减少, 与参考文献^[5-6]的报道均有所不同。结果表明, CRF 患者免疫功能低下, 外周血中的总 T 细胞、 T_4 细胞和 T_8 细胞绝对含量降低; 在淋巴细胞构成中, T_8 细胞含量下降导致总 T 细胞含量降低。因此, CRF 患者体内 T_8 细胞功能受到抑制, T_4 细胞功能相对亢进。

总众周知, 淋巴细胞是人类最主要的免疫细胞。正常情况下, T 细胞占淋巴细胞总数的 65% 以上, 是人类最重要的免疫效应细胞。T 细胞($CD3^+$ 淋巴细胞)包括 T_4 细胞($CD3^+CD4^+$ 淋巴细胞或 $CD4^+$ T 淋巴细胞)、 T_8 细胞($CD3^+CD8^+$ 淋巴细胞或 $CD8^+$ T 淋巴细胞)、双阴性细胞($CD3^+CD4^-CD8^-$ 淋巴细胞)和双阳性细胞($CD3^+CD4^+CD8^+$ 淋巴细胞)等。双

阴性细胞和双阳性细胞为 T_4 细胞和 T_8 细胞的前体细胞, 是免疫学标志尚未完全成熟的 T 细胞。由于正常情况下, 人体外周血中双阴性细胞和双阳性细胞的含量极其稀少, 习惯上将 T_4 细胞和 T_8 细胞看做是 T 细胞的两大亚群, 并用 T_4 细胞与 T_8 细胞百分含量的比值(T_4/T_8)来评价它们在 T 细胞中的构成。 T_4 细胞为 HLA-II 类限制, T_4 细胞活化后大量增殖并产生细胞因子, 进一步活化 B 细胞, 导致 B 细胞大量增殖和产生抗体, 诱导体内以体液免疫为主的免疫机制。活化的 T_4 细胞还可以刺激 T_8 细胞活化与增殖, 诱导 T_8 细胞的免疫功能。 T_8 细胞为 HLA-I 类限制, T_8 细胞活化后大量增殖, 通过诱导靶细胞的程序化死亡来直接杀死靶细胞, 体现以细胞免疫为主的免疫机制。本研究发现 CRF 患者外周血总 T 细胞、 T_4 细胞和 T_8 细胞的绝对含量均减低, 说明患者免疫功能总体水平减低; 患者 T_8 细胞减低, T_4 细胞无消长, 造成总 T 细胞在淋巴细胞中的百分含量减低, 支持患者 T 细胞免疫功能总体水平减低, 具体的以 T_8 细胞的细胞免疫功能减低为特征。值得注意的是, 患者总 T 细胞相对下降, 但是 T_4 细胞并未下降, 即出现 T_4 细胞相对增加的情况, 考虑到文献称 CRF 患者体液免疫无明显改变, 作者推测 CRF 患者 T_4 细胞的相对增加与其进一步活化 T_8 细胞, 导致 T_8 细胞增殖相关。

另外, 流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚型测定可作为 CRF 患者免疫功能检测的手段, 用于病情判断和疗效监测。对不同临床分期的 CRF 患者进行大规模外周血 T 细胞亚群检测, 动态分析患者淋巴细胞亚群的变迁规律, 适时掌握患者体内的免疫功能状态, 仍然是十分必要的。

参考文献

- [1] 蔡蓓, 王兰兰, 冯伟华, 等. 尿毒症患者 T 细胞亚群共刺激分子 $CD28^+$ 和 $CD152^+$ 的表达分析[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(5): 261-263.
- [2] 高艳霞, 周候, 高玲, 等. 慢性肾功能衰竭患者 T 淋巴细胞活化状态的研究[J]. 山东医药, 2005, 45(10): 40.
- [3] Wakabayashi Y, Sngimoto M, Ishiyam T, et al. Studies on T-cell colony formation in chronic renal failure(CRF) patients[J]. Clin Nephrol, 1989, 32(6): 270-275.
- [4] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 78-88.

(下转第 2320 页)

Beckman-Coulter 公司 EPICS-XL4 MCL 流式细胞仪进行测定。具体检验方法参见参考文献[2]执行。

1.4 T 淋巴细胞亚群检测 于治疗前及治疗后 1 周,分别于清晨抽取患者静脉血 2~3 mL, EDTA-K₂ 抗凝(紫色采血管)。同型对照抗体 IgG1-PC5/IgG1-FITC/IgG1-PE、测定抗体 CD3⁻PC5/CD4⁻FITC/CD8⁻PE、标本预处理试剂等均购自 Beckman-Coulter 公司,使用美国 Beckman-Coulter 公司 EPICS-XL4 MCL 流式细胞仪进行测定。具体检验方法参见参考文献[2]执行。

1.5 统计学处理 全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS13.0 统

计学软件进行数据处理,多组间数据的比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

肝硬化失代偿患者治疗前、后外周血 T 细胞亚群的检测结果见表 1。肝硬化失代偿患者治疗前,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞及 T₄/T₈ 比值与健康对照组比较显著下降($P < 0.05$);肝硬化失代偿患者干细胞治疗后,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₄/T₈ 比值与治疗前比较显著升高($P < 0.05$);T₈ 细胞与治疗前比较显著降低($P < 0.05$);T₄/T₈ 比值较治疗前更接近健康对照组水平。

表 1 肝硬化患者治疗前、后外周血 T 淋巴细胞亚群测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	总 T 细胞(%)	T ₄ 细胞(%)	T ₈ 细胞(%)	T ₄ /T ₈
健康对照组	40	72.3 ± 26.5	58.3 ± 10.3	36.5 ± 7.9	1.86 ± 0.55
肝硬化组治疗前	51	60.6 ± 22.5 ^a	45.2 ± 13.6 ^a	26.2 ± 7.6 ^a	1.21 ± 0.35 ^a
肝硬化组治疗后	51	68.5 ± 17.6 ^b	51.2 ± 14.6 ^b	21.3 ± 8.5 ^c	1.71 ± 0.65 ^b

^a: $P < 0.05$,与健康对照组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与肝硬化组治疗前比较。

3 讨 论

近年来国内外大量基础研究发现,脐血干细胞在特定环境下可分化为肝组织和干细胞从而参加肝脏的修复与重建。Avital 等^[3]研究证实从脐血分离的造血干细胞移植入受体后,可整合到受体肝板,分化为成熟肝细胞并合成尿素。Harris 等^[4]以绿色荧光蛋白报告基因转染干细胞并进行性别交叉移植实验,发现分化的肝细胞没有表达荧光蛋白且仍为双倍体,进一步证实了脐血造血干细胞可横向分化为肝细胞。杨宏丽等^[5]将自体脐血干细胞通过介入移植到 86 例肝硬化病患者肝内,发现患者肝功能、凝血机制较对照组有明显提高。

本实验通过检测 51 例干细胞治疗后肝硬化失代偿患者 T 淋巴细胞亚群,观察治疗对机体免疫功能的影响。从结果可以看出,干细胞治疗后,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₄/T₈ 比值与治疗前比较显著升高($P < 0.05$);T₈ 细胞与治疗前比较显著降低($P < 0.05$)。上述结果表明,患者在接受干细胞治疗后机体免疫功能得到了显著提升。

T₄ 细胞在体内能够诱导细胞凋亡,清除分泌自身抗体的 B 细胞,干细胞治疗后 T₄ 细胞升高,表明机体为了增强免疫抑制功能,通过增加 T₄ 细胞的比例来发挥抑制作用^[6]。T₈ 细胞具有细胞毒作用,对机体具有免疫调节功能,干细胞治疗后 T₈ 细胞明显降低,表明在干细胞治疗后,降低了细胞毒作用的 T₈ 细胞的数量,抑制了自身反应性的 T₈ 细胞的细胞毒作用,从而达到抑制自身免疫性反应的作用^[1]。干细胞治疗后肝硬化失代偿患者 T₄/T₈ 细胞比例显著升高,更接近健康对照组水平,表明机体的免疫功能得到了明显提升^[5]。

总之,肝硬化患者由于肝纤维化导致肝脏功能丧失,肝脏对淋巴细胞的拮抗作用引起 T 淋巴细胞减少。T₄ 淋巴细胞作

为体内启动细胞免疫的主要细胞,T₄ 淋巴细胞的减少将引起体内免疫机能调节能力下降。T₈ 淋巴细胞作为体内细胞免疫的主要效应细胞,T₈ 淋巴细胞的减少将引起体内清除靶细胞的功能降低。肝硬化患者外周血 T₄ 细胞的下降程度高于 T₈ 细胞,引起 T₄/T₈ 比值下降。干细胞治疗后,上述被打破的 T₄ 淋巴细胞和 T₈ 淋巴细胞平衡向着逐步恢复的方向发展。因此,对于肝硬化失代偿患者来说,早期利用脐血干细胞修复肝损伤、改善遗传性缺陷组织的功能以及代替退行性组织,在一定程度上可以恢复肝功能,提高机体免疫功能,可缩短治疗时间,改善预后,提高病人生存质量。

参考文献

[1] 张丽欣,邢利和,张丽丽,等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床效果研究[J]. 中国全科医学,2010,13(8):2680-2682.
 [2] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社,2010:66-70,79-82.
 [3] Avital I, Feraresso C, Aoki T, et al. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection[J]. Surgery,2000,132:384-390.
 [4] Harris JR, Brown GA, Jorqensen M, et al. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006,47(5):2108-2113.
 [5] 杨宏丽,于发涛,李桂杰,等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化 86 例疗效观察[J]. 山东医药,2010,50(45):16-17.
 [6] 王剑虹,吴建波. 肝硬变患者的细胞免疫状态研究[J]. 世界华人消化杂志,2000,8(10):1178-1190.

(收稿日期:2011-08-08)

(上接第 2318 页)

[5] 高玲,高艳霞,周缤. 慢性肾功能衰竭患者 T 淋巴细胞亚群测定分析[J]. 泰山医学院学报,2006,27(4):373-374.
 [6] 钟琼,刘尧娟,欧超伟,等. 慢性肾功能衰竭患者血清腺苷脱氨酶

活性与淋巴细胞亚群的关系[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):625-626.

(收稿日期:2011-08-08)