

# 视网膜母细胞瘤患者细胞免疫功能状态的改变

迟 林, 邓 红

(首都医科大学附属北京同仁医院检验科 100730)

**摘要:**目的 研究视网膜母细胞瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例及 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值的变化,并探讨其临床意义。方法 回顾性分析 2015 年 4 月至 2016 年 4 月在该院就诊的 122 例视网膜母细胞瘤患者外周血 T 细胞亚群变化,将视网膜母细胞瘤患者分为 3 组:双眼视网膜母细胞瘤组(n=51)、左眼视网膜母细胞瘤组(n=33)、右眼视网膜母细胞瘤组(n=38),另选取同期健康体检者 45 例作为健康对照组,使用 Backman Coulter FC-500 流式细胞仪,采用多参数流式细胞术检测各组的外周血 T 细胞亚群水平,对检测结果进行统计学分析。结果 与健康对照组相比,视网膜母细胞瘤患者外周血 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞比例明显减少,差异有统计学意义(P<0.01);CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例明显升高,差异有统计学意义(P<0.01);CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值明显下降,差异有统计学意义(P<0.01);视网膜母细胞瘤患者各组间外周血 T 细胞亚群水平差异无统计学意义(P>0.05)。结论 视网膜母细胞瘤患者有细胞免疫功能紊乱,监测其外周血 T 淋巴细胞亚群,可以评估患者的细胞免疫功能及疾病的状态,为临床治疗提供依据。

**关键词:**视网膜母细胞瘤; T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.008 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)02-0172-03

## The changes of cellular immunity function in patients with retinoblastoma

CHI Lin, DENG Hong

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ratio and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ratio of peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with retinoblastoma, and to evaluate its clinical significance. **Methods** The clinical data of 122 retinoblastoma cases and 45 healthy(healthy control group) were selected from April 2015 to April 2016 in Beijing Tongren Hospital were retrospective reviewed. The retinoblastoma patients were divided into 3 groups: bilateral retinoblastoma group (51 cases), left retinoblastoma group (33 cases), right retinoblastoma group (38 cases). Backman Coulter football club-500 flow cytometry was used, multi-parameter flow cytometry was used to detect the level of T lymphocyte subsets in the peripheral blood of each group, and the results were statistically analyzed. **Results** The percentage of CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in peripheral blood of patients with retinoblastoma was significantly lower than that of healthy control group (P<0.01), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells were significantly increased (P<0.01), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ratio was significantly decreased, the difference was statistically significant (P<0.01). There was no significant difference in the levels of T cell subsets in the peripheral blood of the patient's with retinoblastoma (P>0.05). **Conclusion** Patients with retinoblastoma have cellular immune dysfunction, monitoring of peripheral blood T lymphocyte subsets, which can assess the patient's cellular immune function and disease status, provide the basis for clinical treatment.

**Key words:** retinoblastoma; T lymphocyte subsets; flow cytometry

视网膜母细胞瘤(RB)是婴幼儿最常见的眼内原发恶性肿瘤,严重危害患儿的视力及生命<sup>[1]</sup>。在肿瘤方面,随着对肿瘤研究的不断深入,很多人都注意到了肿瘤和免疫之间的关系。现有研究证实, T 淋巴细胞介导的细胞免疫应答在杀伤肿瘤细胞,控制肿瘤生长中起重要作用<sup>[2]</sup>。其中 T 辅助细胞(Th)与 T 抑制细胞(Ts)是肿瘤免疫调节的重要细胞<sup>[3]</sup>。为探讨 RB 患者细胞免疫功能的变化,本课题拟对 122 例确诊 RB 患者,包括双眼 RB 患者 51 例,左眼 RB 患者 33 例,右眼 RB 患者 38 例,探讨 RB 患者与健康者间的外周血 T 淋巴细胞的改变,以了解 RB 患者的免疫功能状态及临床意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2015 年 4 月至 2016 年 4 月在北京同仁医院就诊的 122 例 RB 患者进行研究,所有患者均进行眼科 B 超、彩色超声多普勒、CT 或 MRI、眼底照相检查,间接眼镜及眼前节镜检查明确诊断。所有入组患者均为初次明确诊断,且未进行治疗。按肿瘤累及范围分为 3 组:其中双眼 RB 组 51 例,

肿瘤累及双眼,男 28 例,女 23 例,就诊年龄 29 d 至 6 岁,中位年龄 22.8 个月;左眼 RB 组 33 例,肿瘤只累及左眼,男 19 例,女 14 例,就诊年龄 35 d 至 7 岁,中位年龄 23.4 个月;右眼 RB 组 38 例,男 21 例,女 17 例,中位年龄 23.9 个月。另选取就诊于北京同仁医院健康体检儿童 45 例作为健康对照组,男 26 例,女 19 例,就诊年龄 1~6 岁,中位年龄 24.2 个月。本研究经首都医科大学附属北京同仁医院医学伦理委员会审查同意,所有受检者均知情同意。各组一般资料比较差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

### 1.2 方法

**1.2.1 仪器与试剂** 美国 Beckman Coulter FC-500 流式细胞仪, CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, Lysing Solution, PBS 均为美国 Beckman Coulter 公司生产。

**1.2.2 试验方法** 所有观察对象空腹取静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)真空抗凝采血管内,混匀,室温保存。取 CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 荧光标记

抗体 20 μL 加入流式试管底部,加入 100 μL 抗凝外周血,避光孵育 20 min,加入 Lysing Solution 500 μL,避光孵育 10 min,加入 PBS 500 μL,避光孵育 10 min,上机检测,记录 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 阳性细胞比例。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同年龄组外周血 T 淋巴细胞亚群表达情况** RB 患者各年龄组间外周血 T 细胞亚群表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),结果见表 1。

**2.2 RB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群与健康对照组比较** RB 患者外周血 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞比例明显低于健康对照组

的水平 ( $P < 0.01$ ),而 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例明显高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ),CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值较健康对照组显著下降 ( $P < 0.01$ ),结果见表 2。RB 各组间 T 细胞亚群水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**表 1 不同年龄组外周血 T 淋巴细胞亚群表达情况 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

年龄 (岁)	<i>n</i>	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<3	75	65.16±7.05	35.69±6.11	25.90±6.56	1.46±0.45
≥3	47	65.41±8.64	35.21±6.90	26.91±6.11	1.38±0.40
<i>P</i>		0.174	0.402	0.849	0.997

**表 2 RB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达情况与健康对照组比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	<i>n</i>	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
健康对照组	45	71.13±6.56	41.64±6.02	23.70±3.47	1.81±0.48
双眼 RB 组	51	64.21±8.66 <sup>a</sup>	35.50±7.07 <sup>a</sup>	26.38±5.65 <sup>a</sup>	1.40±0.39 <sup>a</sup>
左眼 RB 组	33	64.98±7.53 <sup>a</sup>	34.89±6.59 <sup>a</sup>	26.99±4.82 <sup>a</sup>	1.34±0.29 <sup>a</sup>
右眼 RB 组	38	66.90±6.10 <sup>a</sup>	36.04±5.33 <sup>a</sup>	28.16±6.57 <sup>a</sup>	1.32±0.30 <sup>a</sup>
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

**3 讨 论**

肿瘤的发生并不是一个简单的过程,而肿瘤免疫的过程更为复杂。机体抗肿瘤免疫应答以细胞免疫为主,依赖于激活的 T 淋巴细胞、NK 细胞和巨噬细胞对肿瘤细胞的直接杀伤并释放效应因子,同时,抗体、补体、细胞因子和黏附分子等多种免疫分子,它们的参与和相互调节,在机体对肿瘤的杀伤中起重要作用<sup>[4]</sup>。细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的重要机制,而 T 淋巴细胞是机体重要的免疫细胞,它不仅直接介导细胞免疫应答,而且对机体抗肿瘤免疫应答的调节起关键作用<sup>[5]</sup>。T 淋巴细胞根据细胞表面 CD 分子表达可分为 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞 2 个亚群,在抗原识别中,2 个亚群分别受不同的主要组织相容性复合体 (MHC) 分子约束,CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞主要识别 MHC II 类分子递呈的外源性抗原肽,而 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞主要识别 MHC I 类分子递呈的内源性抗原肽,两者之间细微平衡是维持免疫系统内部环境稳定的中心环节<sup>[6]</sup>。T 淋巴细胞亚群中,CD3<sup>+</sup> 细胞数量代表了机体总的 T 淋巴细胞免疫状态;CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是辅助性 T 淋巴细胞,辅助机体完成抗肿瘤免疫;大多数 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞为细胞毒性 T 淋巴细胞,参与直接杀伤肿瘤细胞;CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值保持动态平衡,以维持机体细胞免疫功能稳态,当其比值降低,则机体免疫功能低下,从而有利于肿瘤的增殖<sup>[4,6]</sup>。

RB 起源于视网膜胚胎中性核层细胞,这种发生在儿童眼部的恶性肿瘤,病因尚不明确,据统计 6% 为常染色体显性遗传,其余与遗传突变和体细胞突变有关,也有人认为与病毒感染因素有关,其发生与 RB 等位基因的缺失和失活具有直接联系<sup>[7]</sup>。有研究证明,T 淋巴细胞识别肿瘤抗原后激活,凋亡敏感性增加,肿瘤低表达 MHC、B7-1,分泌抑制因子,引起 Th1 反应向 Th2 的偏移和淋巴细胞因子相互作用,使生存因子下调和凋亡保护因子丧失,2 种因素相辅相成共同促进 T 淋巴细胞凋亡<sup>[8]</sup>。在凋亡的过程中,FasI 是诱导细胞实现凋亡的重要途径之一,其可以通过诱导淋巴细胞的凋亡,使肿瘤细胞逃避

免疫系统的监控<sup>[7]</sup>。而在视网膜母细胞瘤中和正常视网膜细胞中 Fas-Ligand 均为高表达,使视网膜母细胞逃避了免疫系统的攻击,对视网膜母细胞瘤的失控性增长提供帮助,对 RB 的发展起重要的作用<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示 RB 患者 T 淋巴细胞亚群表达水平的变化,RB 患者外周血 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞比例明显低于健康对照组 ( $P < 0.01$ );CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例较健康对照组有明显升高 ( $P < 0.01$ );CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值明显下降 ( $P < 0.01$ ),说明 RB 患者的细胞免疫功能低下。这与 Noble 等<sup>[10]</sup>和周晋华<sup>[11]</sup>研究的其他类型的恶性肿瘤(食管腺癌、肺癌、鼻咽癌等)细胞免疫状态的结果一致,研究证明,不同类型的恶性肿瘤患者免疫功能都存在着不同程度的紊乱和(或)低下。

导致 RB 患者外周血 T 淋巴细胞活性降低的原因,可能与以下因素相关:(1)杀伤肿瘤细胞过程中消耗大量 T 淋巴细胞。(2)肿瘤细胞分泌了一些抑制因子,使 T 淋巴细胞活性降低。(3)视网膜母细胞瘤中 Fas-Ligand 的高表达,其可以诱导淋巴细胞的凋亡,使视网膜母细胞逃避了免疫系统的攻击,使 T 淋巴细胞活性降低。肿瘤免疫学的研究也证实,恶性肿瘤患者的机体免疫功能均有不同程度降低,机体的免疫功能异常与恶性肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关<sup>[12]</sup>。因此,采用多参数流式细胞术对视网膜母细胞瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例及 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值进行监测,对了解患者细胞免疫状态、病情发展、治疗方案的选择及预后评估有一定的帮助。

**参考文献**

[1] Abramson DH. Retinoblastoma in the 20th century: past success and future challenges the Weisenfeld lecture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 46: 2684-2691.  
 [2] Lotze MT, Finn OJ. Recent advance in cellular immunology implication for immunity to cancer[J]. Immunol today, 2009, 11(6): 190. (下转第 176 页)

及离散情况,见图 1。

### 3 讨 论

近年来,凝血、抗凝及纤溶系统的变化在孕产妇中的应用价值越来越受到临床重视<sup>[9]</sup>。妊娠是一种特殊的生理过程,因胎儿生长发育和分娩的生理需求,此时机体内的各项生理指标均发生一定程度的改变,以利于胎儿的生长和娩出。特别是在妊娠晚期,体内的凝血功能增强,抗凝功能减弱,纤溶功能减弱,致使妊娠晚期妇女体内出现高凝状态,因此,对于孕妇这个特殊群体再使用正常非孕妇女性或男性的参考区间已不合适。故建立正常健康孕妇不同妊娠期凝血筛查 4 项的参考区间迫在眉睫。

凝血筛查 4 项是出血性及血栓性疾病筛查的常规检验项目。PT 是外源性凝血系统较为敏感的筛选指标,可反映血浆中凝血因子 II、V、VII、X 水平;APTT 是内源性凝血系统较为敏感的筛选指标,可反映血浆中凝血因子 VIII、IX、XI、XII 水平;FIB 是内、外源性凝血途径的最终通路,主要用于纤溶筛查<sup>[10]</sup>,在妊娠期 FIB 可由 2~4 g/L 增至 4~6 g/L;TT 是检测待测标本是否有循环抗凝物质的试验,其长短反映血浆纤维蛋白原量或质的异常程度。

本研究结果显示,随着孕期进程,PT、APTT 逐渐缩短,FIB 则显著升高,提示妊娠末期高凝状态易形成血栓<sup>[9]</sup>,应高度关注。本研究结果表明,孕早期孕妇的凝血系统和纤溶系统发生变化,血浆纤维蛋白原的水平逐渐增加,大部分凝血因子增多,可溶性纤维蛋白单体水平增加,纤溶酶源激活物活性下降而其抑制物水平升高,血液呈高凝状态。这种生理变化随着孕妇孕周的增加而加剧,适度高凝是一种生理性保护措施。其有利于维持纤维蛋白沉积于动脉、子宫壁和胎盘绒毛间,有助于维持胎盘的完整性以及剥离而形成血栓,有利于分娩过程中和产后迅速止血,有效防止大出血。

然而当某些诱因存在时,机体可由高凝状态迅速转化为低凝状态,此时由于大量凝血因子的消耗,可引起妊娠高血压综合征及诱发纤溶的发生、胎盘早剥、弥散性血管内凝血(DIC)<sup>[11]</sup>和产后血栓等多种产科并发症,严重威胁孕产妇、胎儿的安全<sup>[5]</sup>。因此,建立孕妇不同孕期常规凝血试验参考区间,密切观察孕妇产前凝血 4 项指标,了解其凝血与纤溶功能的变化,有助于病情的监测,防止产科出血及血栓性疾病,对提高分娩安全、保护母婴健康具有重要意义。

### 参考文献

[1] 邓群英,张宏. 妊娠期女性血浆抗凝血酶 III 和 D-二聚体

(上接第 173 页)

[3] Fernandez-Cruz E. Elimination of syngeneic sarcomas in rats by a subsets of T lymphocytes [J]. JEXP Med, 2015, 152: 823.

[4] Voena C, Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy [J]. Discovery Med, 2016, 21 (114): 125-133.

[5] 立彦,傅雷,杜艳丽. 肿瘤病人细胞免疫功能状态及临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3): 330-332.

[6] 安云庆. 医学免疫学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 84-109.

[7] 陆焯,童剑萍. 视网膜母细胞瘤的发生机制及诊断和治疗进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016 24(6): 1007-1014.

[8] Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, et al. Fas-mediated suicide of tumor reactive T cell following activation by specific tumor selective rescue by escape inhibition[J].

参考区间的建立[J]. 检验医学与临床杂志, 2016, 13(3): 341-346.

[2] CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved Guided line. Third Edition[S]. Wayne, PA: CLSI CA3-C28, 2008.

[3] Lippi G, Tripodi A, Simundic AM, et al. International survey on D-Dimer test reporting: a call for standardization [J]. Semin Thromb Hemost, 2015, 41(3): 287-293.

[4] 周文宾,谢波,陆红,等. 凝血检测参考区间的验证与分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 42-45.

[5] 刘慧英. 正常孕妇不同孕期及产后常规凝血功能检测指标参考区间调查[J]. 河北医学, 2012, 18(9): 1253-1255.

[6] 陈锐,鲁燕飞,周志兰,等. ACL-TOP700 血凝仪凝血 4 项正常参考区间的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36 (8): 1088-1089.

[7] Zhang GM, Guo XX, Zhu BL, et al. Establishing reference intervals of aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for apparently healthy elderly[J]. Clin Lab, 2016, 62 (1/2): 135-140.

[8] Bakan E1, Polat H, Ozarda Y, Ozturk N, et al. A reference interval study for common biochemical analytes in Eastern Turkey: a comparison of a reference population with laboratory data mining [J]. Biochem Med, 2016, 26(2): 210-223.

[9] 李帅,吕时铭,汤杰英. 浙江地区汉族孕产妇 D-二聚体参考区间的建立及应用. 中华检验医学杂志, 2011, 34(7): 580-585.

[10] 闫宏斌,郑善鑫,郝晓柯,等. SYSMEX CS5100 血凝分析仪性能评估及凝血六项参考区间的调整[J]. 检验医学, 2014, 29(9): 964-968.

[11] Clifford SM, Bunker AM, Jacobsen JR, et al. Age and gender specific pediatric reference intervals for aldolase, amylase, ceruloplasmin, creatine kinase, pancreatic amylase, prealbumin and uric acid [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(9/10): 788-789.

(收稿日期: 2016-08-23 修回日期: 2016-10-29)

Immunol, 2009, 162(6): 3273-3279.

[9] 李光辉,彭燕一. RNA 干扰技术在视网膜膜疾病治疗中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(5): 901-904.

[10] Noble F, Mellows T, et al. Tumor infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2016, 31: 1-9.

[11] 周晋华. 流式细胞术分析不同分期的恶性肿瘤外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 临床肿瘤杂志, 2009, 7(14): 619-621.

[12] Baumann MH, Milson TJ, Patrick CW, et al. Correlation of circulating natural killer cell count with prognosis in largecell lymphoma[J]. Cancer, 2010, 57: 2309.

(收稿日期: 2016-08-17 修回日期: 2016-10-23)