

· 论 著 ·

流式细胞术检测肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群的诊断价值

洪燕燕, 杨芝红

(宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

摘要:目的 探讨支气管肺泡灌洗液(BALF)中 T 淋巴细胞免疫活性对几种常见肺部疾病的临床诊断价值。方法 选取该院 2013—2015 年住院患者 61 例, 其中肺癌 15 例, 肺结核 10 例, 结节病 13 例, 肺部感染 15 例, 特发性肺间质纤维化(IPF)8 例。流式细胞仪检测 BALF 中 T 淋巴细胞亚群水平。结果 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $CD8^{+}$ 及 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 在肺癌组和结节病组变化最明显, 与其他组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。肺癌组 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 下降, $CD8^{+}$ 升高, $CD4^{+}/CD8^{+}$ 明显下降; 而结节病组 $CD4^{+}$ 升高, $CD8^{+}$ 降低, $CD4^{+}/CD8^{+}$ 明显升高。肺结核组与肺部感染组也表现为 $CD4^{+}$ 下降, $CD8^{+}$ 相对升高, $CD4^{+}/CD8^{+}$ 下降, 与结节病组及 IPF 组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。IPF 组 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $CD8^{+}$ 及 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 均接近正常值。结论 通过流式细胞技术检测 BALF 中 T 淋巴细胞亚群水平, 在一定程度上可有效区分几种常见的肺部疾病, 对了解患者免疫功能、疾病鉴别诊断及预后具有重要的临床价值。

关键词:流式细胞技术; 肺泡灌洗液; T 淋巴细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.017 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)14-2051-03

Diagnostic value of applying flow cytometry in detecting T-lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid of patients with several common pulmonary diseases

HONG Yanyan, YANG Zhihong

(The General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:Objective To evaluate the clinical diagnosis value of T-lymphocyte cell activeness in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with several common pulmonary diseases. **Methods** 61 cases of inpatients in this hospital from 2013 to 2015 were selected, including 15 cases of lung cancer, 10 cases of pulmonary tuberculosis, 13 cases of sarcoidosis, 15 cases of pulmonary infection, 8 cases of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis (IPF). The levels of T lymphocyte subsets in BALF were detected by flow cytometry. **Results** $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ and $CD4^{+}/CD8^{+}$ were obviously changed in the group of lung cancer and sarcoidosis, the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the group of lung cancer, $CD3^{+}$ and $CD4^{+}$ were lowered, $CD8^{+}$ was increased, and $CD4^{+}/CD8^{+}$ was significantly lowered. However, in the group of sarcoidosis, $CD4^{+}$ was increased, $CD8^{+}$ was lowered, and $CD4^{+}/CD8^{+}$ was significantly increased. In addition, in the group of tuberculosis and pulmonary infection, $CD4^{+}$ was lowered, $CD8^{+}$ was comparatively increased, and $CD4^{+}/CD8^{+}$ was significantly lowered, they were significantly different from sarcoidosis and IPF ($P<0.05$). In the group of IPF, $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ and $CD4^{+}/CD8^{+}$ were closed to normal value. **Conclusion** Detecting the level of T-lymphocyte subsets in BALF helps differentiating the above-mentioned pulmonary diseases effectively to some extent, thus it has important value in exploring the immune function of patients and disease differential diagnosis and prognosis.

Key words: flow cytometry; bronchoalveolar lavage fluid; T-lymphocyte subsets

支气管肺泡灌洗检查可直接获取下呼吸道及肺泡上皮表面衬液, 对其所含的炎性细胞、免疫细胞进行细胞计数和淋巴细胞亚群检测, 可为肺部恶性肿瘤、肺结核、结节病、肺部感染及特发性肺间质纤维化(IPF)等疾病的鉴别诊断和疗效观察提供帮助^[1]。近年来, 随着国内外流式细胞术(FCM)的应用与发展, 支气管肺泡灌洗技术以其无创性、安全性等优势结合 FCM 检测肺泡灌洗液(BALF)逐步成为辅助诊断和鉴别肺部疾病的重要手段。根据 T 淋巴细胞表面的分子不同特征可分为 2 个亚群, 即 $CD4^{+}$ T 淋巴细胞和 $CD8^{+}$ T 淋巴细胞。有研究表明, 这 2 种细胞亚群的动态平衡可影响肺癌及肺部良性病变的发生、发展和转归。因此, 检测患者支气管 BALF 中 $CD4^{+}$ T、 $CD8^{+}$ T 细胞水平对了解患者免疫功能、疾病判断、预后具有重要的临床价值。现就 5 种常见的肺部疾病, 应用 FCM 对 BALF 进行 T 淋巴细胞亚群分析, 旨在为肺部疾病的鉴别诊断、判断疗效、了解预后提供更多有力的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择该院 2013—2015 年住院患者, 共 61 例。其中肺癌组 15 例, 中位年龄 62 岁, 全部经纤维支气管镜及活组织病理确诊; 肺部良性病变组包括肺结核 10 例, 结节病 13 例, 肺部感染 15 例, IPF 8 例, 中位年龄依次为 62、67、55、54、61 岁。

1.2 仪器与试剂 美国 BD FACSCanto II 流式细胞仪。四色标记荧光抗体 $CD3$ -FITC/ $CD8$ -PE/ $CD45$ -PerCP/ $CD4$ -APC、红细胞裂解液、CST 荧光校准微球、7 色设置微球, 均购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 BALF 的制备 取新鲜 BALF 5~10 mL, 经 300 目金属网过滤去掉杂质和痰液, 3 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 加 1:9 配制的溶血素 2 mL, 避光 10 min,

1 500 r/min离心 5 min 后弃上清液,取 BALF 100 μ L 加入 10 μ L 荧光抗体,室温避光孵育 15 min,加入 PBS 2 mL,1 500 r/min离心 5 min 后弃上清液,加 300 μ L PBS 重悬细胞。

1.3.2 流式细胞仪检测 以荧光微球 CS&T 及 7-colour 校准仪器光路使其分辨率达到最佳工作状态。四色淋巴细胞免疫分析采用 Diva 软件获取数据。建立 SSC/CD45 和 SSC/CD3 荧光散点图,用 CD45 及 CD3 细胞群圈门以排除巨噬细胞、碎片及其他成分的干扰,调节 FSC、SSC 电压,FSC 阈值及荧光补偿,每管获取 1 万个细胞,建立 CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ 散点图,设十字门分析 Th(CD3⁺CD4⁺)和 Ts(CD3⁺CD8⁺)的表达情况,同时计算出 CD4⁺/CD8⁺。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组患者一般资料结果比较 本研究共入组 61 例患者,年龄 39~72 岁,男女比例为 33 : 28,20 例有吸烟史。肺癌组患者全部经纤维支气管镜及活组织病理确诊,其中腺癌 6 例,鳞癌 5 例,小细胞未分化癌 2 例,未确定细胞类型 2 例。肺部感染组患者 15 例,其中 4 例为获得性免疫缺陷病毒感染。见表 1。

2.2 各组患者 BALF 中 T 淋巴细胞亚群结果比较 肺癌组

和良性病变组 BALF 中淋巴细胞亚群进行两两比较,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 在肺癌组、结节病组、IPF 组中变化明显,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺癌组 CD3⁺、CD4⁺ 下降,CD8⁺ 升高,CD4⁺/CD8⁺ 明显下降;结节病组 CD4⁺ 升高,CD8⁺ 降低,CD4⁺/CD8⁺ 明显升高。肺结核组与肺部感染组也表现为 CD4⁺ 下降,CD8⁺ 相对升高,CD4⁺/CD8⁺ 明显下降,与结节病组及 IPF 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IPF 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 均接近正常值(健康非吸烟者 BALF 中 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺ 占 70%,CD4⁺ 占 50%,CD8⁺ 占 30%,CD4⁺/CD8⁺ 为 1.5~1.8)。见表 2。

表 1 5 组患者的基本资料

组别	例数(<i>n</i>)	中位年龄 (岁)	性别 (男/女, <i>n</i> / <i>n</i>)	抽烟史 (有/无, <i>n</i> / <i>n</i>)
肺癌组	15	62	9/6	7/8
肺结核组	10	67	6/4	4/6
结节病组	13	55	5/8	2/11
肺部感染组	15	54	8/7	4/11
IPF 组	8	61	5/3	3/5

表 2 各组患者 BALF 中 T 淋巴细胞亚群结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)
肺癌组	15	41.59±7.07 ^{bc}	13.08±2.62 ^{bc}	33.93±7.68 ^b	0.40±0.09 ^{bc}
肺结核组	10	48.94±14.35 ^{bc}	20.97±5.36 ^{bc}	28.49±13.38 ^b	0.86±0.35 ^{bc}
结节病组	13	66.73±16.20 ^a	53.27±10.27 ^{ac}	15.96±4.90 ^{ac}	3.52±0.84 ^{ac}
肺部感染组	15	60.69±16.20 ^a	25.09±12.16 ^{abc}	35.08±9.64 ^b	0.77±0.52 ^{bc}
IPF 组	8	70.51±12.47 ^a	41.34±16.49 ^{ab}	31.35±11.67 ^b	1.66±1.28 ^{ab}

注:与肺癌组比较,^a $P < 0.05$;与结节病组比较,^b $P < 0.05$;与 IPF 组比较,^c $P < 0.05$

3 讨 论

T 淋巴细胞是反映组织或细胞免疫功能状态的重要指标,肺泡灌洗液中含有以 T 淋巴细胞为主的免疫细胞。因此,检测 BALF 中细胞分类及 T 淋巴细胞亚群在肺部疾病的诊断或鉴别中发挥重要作用。BALF 被认为是肺活组织病理学的一个重要补充,且优于肺活检,其安全、损伤性小,无病死并发症,取样范围较经支气管肺活检和开胸肺活检宽广,可发现更多关于炎性和免疫改变的信息。

肿瘤患者常处于免疫功能低下状态,肿瘤细胞可以产一系列逃避抗肿瘤免疫反应的机制。有研究表明,机体发生肿瘤时,肿瘤局部的微环境会发生免疫功能紊乱,Th(CD4⁺)、Ts(CD8⁺)平衡破坏,表现为局部的 Ts 细胞亚群增高,Th/Ts 比值降低^[2-3]。多项研究报道,与良性病变组比较,肺恶性疾病组肺泡灌洗液中 Th 细胞显著下降,Ts 细胞显著升高,Th/Ts 比值显著下降^[4-6]。本研究结果显示,与良性病变组比较,肺癌组 CD3⁺、CD4⁺ 下降,CD8⁺ 升高,CD4⁺/CD8⁺ 明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),与相关研究一致。Ts 细胞所占百分比增高,提示肺癌患者局部细胞免疫功能紊乱,是肿瘤发生、发展的原因。

结核病的免疫以细胞免疫为主,T 淋巴细胞可介导细胞免

疫反应,与肺结核的发生、发展密切相关^[7]。因此,T 淋巴细胞亚群的变化可反映肺结核的免疫调节情况。CD4⁺ T 淋巴细胞为辅助性细胞,通过分泌多种细胞因子,从而增大免疫反应,抑制结核菌的生长,在结核菌感染的细胞免疫中起重要作用^[8]。CD8⁺ T 淋巴细胞与 CD4⁺ T 淋巴细胞共同维持机体的免疫稳定,且维持一定的比例。田辉等^[9]报道 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低是导致结核病发生与发展的重要因素。赵丽华^[10]研究发现,肺结核患者外周血中 CD8⁺ T 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值降低。Meyer 等^[11]研究表明,肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群,肺结核组较对照组 CD3⁺、CD4⁺ 降低,CD8⁺ 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),共同作用使 CD4⁺/CD8⁺ 降低。但也有学者报道肺结核患者 BALF 中 CD4⁺/CD8⁺ 在正常范围之内。本研究结果显示,结核病患者 CD4⁺ 下降,CD8⁺ 升高,CD4⁺/CD8⁺ 下降,与结节病组、IPF 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与多数文献报道一致,即结核病患者外周血及支气管肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞免疫状态较一致,主要表现为 CD4⁺ 降低,CD8⁺ 升高,CD4⁺/CD8⁺ 降低。

有研究报道,BALF 在缺乏肺活检时能正确诊断结节病,从而提高诊断正确率^[12]。有学者研究表明,结节病中高达 96.55% 的淋巴细胞百分比增高,T 淋巴细胞亚群中 CD4⁺ 占

主要比例,CD4⁺/CD8⁺增高。有学者研究证实,健康成年人 BALF 中 CD4⁺/CD8⁺为 1.0~3.5,平均范围 1.5~2.0,通常 CD4⁺/CD8⁺大于或等于 3.5 对结节病的诊断具有指导价值。本研究结果显示,结节病组 CD4⁺升高,CD8⁺下降,CD4⁺/CD8⁺(3.52±0.84)明显升高,与其他肺部疾病组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),此结果对鉴别诊断结节病具有重要的临床价值。

有实验数据表明,与健康对照组比较,肺部感染组 BALF 中 CD3⁺变化不明显,CD4⁺降低,CD8⁺升高,CD4⁺/CD8⁺降低。而感染组外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺均下降,CD4⁺/CD8⁺无明显变化。本研究结果提示,肺部感染组 BALF 中 CD3⁺变化不明显,CD4⁺下降,CD8⁺升高,CD4⁺/CD8⁺降低,与结节病组、IPF 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),与文献报道一致。表明 BALF 中 T 淋巴细胞的检测能更好地反映患者肺部感染的情况,对临床诊断及治疗有较大帮助。

IPF 是特发性间质性肺炎中最常见的一种,IPF 患者 BALF 的中性粒细胞和淋巴细胞比例对纤维化程度和对治疗的反应评估有一定作用。有文献报道,IPF 患者淋巴细胞比例升高者预后较好,中性粒细胞比例升高者预后较差。王小燕^[13]报道,CD8⁺细胞所占比例较高者预后较好。也有一些学者研究发现 CD8⁺细胞与 IPF 组织纤维化有一定联系,BALF 中 CD8⁺细胞升高常提示预后较差。IPF 组 CD3⁺[(66.37±22.33)%]、CD4⁺[(28.39±13.23)%]、CD8⁺[(36.07±16.8)%]细胞数量、CD4⁺/CD8⁺(1.04±0.81)均接近正常值。本研究 IPF 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞数量及 CD4⁺/CD8⁺均接近正常值,可明显区分于其他组。目前,关于 BALF 中 T 淋巴细胞亚型及其比例对 IPF 疾病预后的影响还存在争议。

本研究肺癌组、肺结核组及肺部感染组均表现为 CD4⁺降低,CD8⁺不同程度升高,导致 CD4⁺/CD8⁺降低;结节病组 CD4⁺明显升高,CD8⁺明显降低,CD4⁺/CD8⁺明显升高;IPF 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺均接近正常值。本研究通过 FCM 检测肺部疾病患者 BALF 中 T 淋巴细胞亚群的分布情况,在一定程度上可有效区分常见的几种肺部疾病,为了解肺部疾病患者免疫功能、疾病判断和预后等方面提供更多有力的实验室依据。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管肺泡灌洗液细胞学检

(上接第 2050 页)

[11] 曾雪云,毛兴龙,钱军,等. 重症急性胰腺炎伴腹腔感染患者易感因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(18):4173-4175.

[12] 苏鹏飞,林文清. 谷氨酰胺联合亚胺培南治疗重症急性胰腺炎合并腹腔感染的临床疗效研究[J]. 实用药物与临床,2014,17(9):1193-1196.

[13] 金光军,张浙恩,厉有名. 重症急性胰腺炎合并腹腔感染的感染特点和相关因素分析[J]. 中国微生态学杂志,2017,29(1):85-88.

测技术规范(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(7):390-391.

[2] 杨红,鹿英英,张中. 流式细胞术检测肺泡灌洗液淋巴细胞免疫表型的临床意义探讨[J]. 中国实用医药,2015,10(17):14-15.

[3] 杨国辉,廖景峰,雷显萍,等. 支气管肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群和细胞 DNA 含量分析对肺癌的诊断价值[J]. 临床内科杂志,2002,19(6):438.

[4] 莫扬,朱宇芳. 检测肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群对肺癌的诊断价值[J]. 医学新知杂志,2007,17(6):322-326.

[5] Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, et al. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease[J]. Clin Exp Immunol,2002,128(1):149-154.

[6] Jones BE, Smith MM, Taikwel EK, et al. CD4 cell counts in human immunodeficiency virus-negative patients with tuberculosis[J]. Microbes Infect,2005,7(4):776-778.

[7] 唐神结,吴福蓉,范以虎. 肺结核患者支气管肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群的检测及其临床意义[J]. 中国防痨杂志,2002,24(5):254-257.

[8] 魏静. 肺结核患者支气管肺泡灌洗液中 T 细胞亚群的检测[J]. 中国现代医药杂志,2012,14(8):7-9.

[9] 田辉,徐利军,彭守春,等. 支气管肺泡灌洗液对弥散性实质性肺疾病的诊断意义[J]. 中国全科医学,2008,11(3A):428-430.

[10] 赵丽华. 3 种弥漫性肺病支气管肺泡灌洗液细胞免疫活性研究[J]. 中国内镜杂志,2013,19(8):801-805.

[11] Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? [J]. Eur Res J,2011,38(5):761-769.

[12] 顾国平,朱雪明,冯萍. 探讨肺部感染患者肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群的临床意义[J]. 中国血液流变学杂志,2009,19(1):114-116.

[13] 王小燕. 特发性间质性肺炎支气管肺泡灌洗液细胞类型特点及临床意义分析[D]. 北京:中国协和医科大学,2008.

(收稿日期:2017-02-17 修回日期:2017-04-25)

[14] 王琼,杨晓钟,戴伟杰,等. 重症急性胰腺炎患者腹腔感染病原菌分布与危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(23):5346-5348.

[15] Lai SW, Lin CL, Liao KF, et al. Increased risk of acute pan-creatitis following pneumococcal pneumonia: a nationwide co-hort study[J]. Int J Clin Pract,2015,69(5):611-617.

(收稿日期:2017-02-25 修回日期:2017-05-07)