

T 细胞亚群测定与卵巢肿瘤 辨证分型关系的研究

上海中医药大学附属曙光医院妇科(上海 200021)

齐 聪 庞泮池* 张志毅△

内容提要 本研究应用流式细胞仪和单克隆抗体技术测定了 73 例卵巢肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群, 试图阐明卵巢肿瘤患者各证型之间的免疫状况。结果显示: 卵巢肿瘤患者外周血 T 细胞亚群变化与辨证分型有关, 可作为临床判断虚证、实证及其免疫状况的敏感指标, 为中医治疗卵巢肿瘤提供了客观依据。

关键词 卵巢肿瘤 辨证分型 T 细胞亚群 流式细胞仪

目前, 检测 T 细胞亚群变化已成为临床观察免疫状态的重要指标^(1~3)。为了探讨卵巢肿瘤患者辨证分型各型间、虚与实之间的免疫状况, 本文对 73 例卵巢肿瘤患者外周血 T 细胞亚群进行了检测。

临 床 资 料

一、观察组选择 1988 年 9 月至 1992 年 4 月在上海医科大学肿瘤医院妇科接受手术治疗并经病理证实为卵巢良、恶性肿瘤患者 73 例。年龄: <40 岁 25 例, 40~60 岁 38 例, >60 岁 10 例。卵巢良性肿瘤 23 例, 恶性者 50 例; 恶性肿瘤病理分类: 恶性上皮性肿瘤 27 例, 恶性生殖细胞肿瘤 12 例, 转移性卵巢癌 11 例。临床分期: I 期 12 例, II 期 2 例, III 期 19 例, IV 期 6 例; 11 例转移性卵巢癌(一般均为晚期)。以上病例均未接受化疗、放疗和免疫治疗。

二、对照组 40 例, 为肿瘤医院健康职工。均为女性。年龄: <40 岁 28 例, 40~50 岁 12 例。

三、辨证分型诊断标准由庞泮池教授拟定。

1. 气滞血瘀型(13 例) 腹部积块, 推之不移, 胀痛不适, 面色暗黑, 形体消瘦, 口干不欲饮, 舌紫暗或边有瘀斑, 脉细弦或涩。

2. 痰湿阻滞型(10 例) 下腹包块时或作痛, 按之柔软, 带下色黄, 胸闷纳呆, 神疲倦怠, 小便不多, 舌苔白腻, 舌质暗紫, 脉细濡或沉滑。

3. 气虚型(15 例) 腹部胀痛较轻或按之

舒适, 面色苍白, 气促心慌, 懒于行动, 恶心呕吐, 纳食不香, 胸闷, 口渴不欲饮, 大便溏薄, 有时面浮肢肿, 自汗, 脉细小, 苔薄或白腻, 舌质胖或有齿痕。

4. 阴虚型(9 例) 腹部隐痛, 头晕失眠, 心烦口渴欲冷饮, 有时牙宣鼻衄, 溲赤便结, 烘热, 盗汗, 纳少, 精神倦怠, 脉细小, 苔薄或剥, 舌质红或降。

5. 气阴两虚型(26 例) 综合以上两种类型, 既有气虚, 又有阴虚症状。

以上各型中, 凡具备一型中的五项症状便可诊断该型。并将气滞血瘀型、痰湿阻滞型归纳为实证组(23 例卵巢良性肿瘤), 将气虚型、阴虚型、气阴两虚型归纳为虚证组(50 例卵巢癌)。

检 测 方 法

一、试剂 单克隆抗体(OKT 系列), 由北京医科大学微生物与免疫学教研室提供。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗小鼠 IgG, 由上海长征医院免疫室提供。细胞洗液(NaCl 8.47g、K₂PO₄ 4.11g、KH₂PO₄ 1.36g、NaN₃ 0.1g、小牛血清 20 ml, 加蒸馏水至 1000 ml)、红细胞溶解液(KHCO₃ 1.0g、NH₄Cl 8.3g、EDTA-Na₂ 37 mg, 加蒸馏水至 100 ml)。固定液(25%戊二醛 3.2 ml、葡萄糖 2.0 g, 加无血清细胞洗液至 100 ml)。

二、方法 取肝素抗凝全血 0.4 ml, 分

*导师, △上海医科大学肿瘤医院妇科

为4管。分别加入0.1 ml T细胞亚群单抗(OKT₃、OKT₄、OKT₈)，对照管加入0.1 ml细胞洗液，置30℃ 30 min后，每管加3 ml细胞洗液，1000 r/min离心2 min，洗去未结合的单抗，反复2次。摇匀管底沉淀细胞，加入0.1 ml FITC-羊抗鼠IgG，置30℃ 30 min。再加入红细胞溶解液3 ml，见红细胞悬液变为真溶液时，立即1000 r/min离心2 min，弃血红蛋白上清液，离心洗涤细胞2次，余细胞悬液，加入固定液20 ml，即可上机分析，以上过程在10~15℃时进行，抽取标本到分析，在12 h内全部完成。

流式细胞仪分析 双激光流式细胞分析仪(EPLCSC)，绿荧光检测，激光波长为488 nm，功率为300 nW。系美国Coulter电子仪器公司产品。

结 果

一、T细胞亚群分布与卵巢肿瘤患者辨证分型的关系，见表1、表2。

表1 三组T细胞亚群测定结果比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	OKT ₃	OKT ₄ (%)	OKT ₈	OKT ₄ / OKT ₈
对照	40	68.8±8.1	41.0±7.7	25.8±9.9	1.8±0.6
实证	23	67.7±11.3	41.8±8.3	28.5±5.3	1.5±0.3*
虚证	50	65.2±11.8	34.7±10.1**△	37.9±9.5**△	1.0±0.4**△

注：与对照组比，* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；与实证组比，△ $P < 0.01$

表2 中医分型T细胞亚群测定结果 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	OKT ₃	OKT ₄ (%)	OKT ₈	OKT ₄ / OKT ₈
气滞血瘀	13	68.8±8.2	43.4±7.8	28.1±4.8	1.7±0.3
痰湿阻滞	10	66.2±14.7	39.6±8.8	29.2±6.1	1.5±0.3*
气虚	15	66.6±13.6	39.2±11.3	29.4±7.6	1.4±0.4*
阴虚	9	65.2±9.9	36.3±6.9	39.3±9.3△	1.0±0.1△△
气阴两虚	26	64.5±13.7	31.6±11.0**	42.5±7.0△△	0.8±0.3△△

注：与气滞血瘀型比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与气虚型、气滞血瘀型、痰湿阻滞型比，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$

表1示：卵巢肿瘤虚、实二证患者外周血总T细胞(OKT₃)基本正常。虚证组与对照组、实证组相比，T辅助细胞亚群(OKT₄)减少($P < 0.01$)，T抑制细胞亚群(OKT₈)增多($P < 0.01$)，故OKT₄/OKT₈比值也较前二组显著下降($P < 0.01$)。实证组与对照组比OKT₄/OKT₈比值有明显差异($P < 0.05$)。

表2示：OKT₃细胞在五型间均无明显差异($P > 0.05$)。OKT₄细胞以气阴两虚型最低，与气滞血瘀型相比差异显著($P < 0.01$)。其余各组之间无差异。OKT₈细胞以气阴两虚型最高，阴虚型次之，与二实证型及气虚型相比有明显的差异(前者 $P < 0.01$ 、后者 $P < 0.05$)。OKT₄/OKT₈比值：实证组两型以痰湿阻滞型较气滞血瘀型明显下降($P < 0.05$)。虚证组三型中，阴虚型和气阴两虚型的OKT₄/OKT₈比值失调明显。两者之间无差异，但与气虚型及实证组两型相比差异显著($P < 0.01$)。气虚型与痰湿阻滞型相比无差异，与气滞血瘀型相比差异明显($P < 0.05$)。

二、卵巢癌T细胞亚群比值的有关因素分析 将50例卵巢癌患者的OKT₄/OKT₈比值作为应变变量(Y)，其余有关的8个因素作为自变量即：年龄X₁、辨证分型X₂、月经状况X₃、临床分期X₄、病理分类X₅、组织分级X₆、发病性质X₇、雌、孕激素受体状况X₈，进行逐步回归分析，剔除指标临界值：F=2得方程 $Y = 2.1925 - 0.289 X_2$ 。本方程提示：OKT₄/OKT₈比值与辨证分型X₂有关，偏回归系统负号表明：随着辨证分型中由气虚型→阴虚型→气阴两虚型的分型排列，OKT₄/OKT₈比值逐渐下降，其余未选因素表示作用较小或不显著。

复相关系数 $R = 0.6617$ 示：入选因素与应变变量之间的相关性，其值越大越好。剩余标准差：SY=0.2936示：该方程稳定。入选因素的相关系数检验 $F = 37.37$ ($P < 0.001$)，提示有非常显著的意义。

讨 论

自 Hoffman 等⁽⁴⁾首次报告用微量全血染色流式细胞仪分析人体外周血 T 细胞亚群以来,该方法已广泛应用于临床,并被公认为是测定 T 细胞亚群最精确的方法⁽⁵⁾。越来越多的研究者利用新技术来探讨肿瘤患者机体的抗肿瘤免疫反应,以及肿瘤对机体免疫调节的影响⁽⁶⁾,但有关卵巢肿瘤患者外周血 T 细胞亚群的研究,尤其是对卵巢癌辨证分型、各型之间的 T 细胞免疫水平的研究,国内报道甚少。

本实验应用流式细胞仪和单克隆抗体技术,对 73 例卵巢肿瘤患者进行了外周血 T 淋巴细胞检测,比较观察了卵巢肿瘤患者辨证分型中实证、虚证及各型的 T 细胞亚群变化,结果显示 T 细胞亚群检测,对卵巢肿瘤患者较为敏感,有一定的临床参考价值。

卵巢良性肿瘤实证组患者,由于正气未衰, T 细胞各亚群变化不大,但 OKT₄/OKT₈ 比值下降,提示患者的细胞免疫功能有下降的趋势,但不紊乱。而虚证组多见于卵巢癌中晚期患者,正气已损,邪气旺盛,免疫功能严重失调,外周血 T 细胞亚群分布与健康人及实证组患者相比均有明显差异,这与中医辨证同属虚证的看法一致。

卵巢癌患者外周血 T 细胞亚群比值经多因素分析(逐步回归分析),发现与辨证分型密切相关。表现为辨证分型从气虚型到气阴两虚型, OKT₄ 进行性下降, OKT₈ 明显上升,这表明 T 细胞亚群的测定,客观地论证了中医学对卵巢癌形成的病机及病理变化的认识,即当癌瘤(卵巢癌)内生于脏腑组织,必然耗损人体正气以自养。脏腑组织的功能失调,不断加

剧虚弱证候,初期伤气,继而耗及阴血,最终气阴两虚,致辅助性 T 细胞明显下降,抑制性 T 细胞显著上升,说明卵巢癌虚证患者的免疫功能受到了严重的抑制,并随病情的发展而加重。为此, T 细胞亚群的测定,能初步地反映出是早期还是晚期的患者,为临床判断虚证以及虚损程度提供了客观实验依据。

本组实证患者的 T 细胞各亚群接近正常,辨证以气滞血瘀、痰湿阻滞为主。治疗应采取活血消癥、清热解毒、祛痰化湿等祛邪的原则;卵巢癌虚证患者,其特点是细胞免疫功能异常和低下,其证候多以正气虚弱为主,这提示我们应采用扶正固本治虚的原则,以促进和改善机体免疫状况,从而提高卵巢癌患者的五年生存率。

参 考 文 献

1. Barker WH, et al. Biologic control of cancer. Arch Surg 1986; 121:1237.
2. Vohide A, et al. Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease. Cancer Immune Immunotherapy 1980; 9:153.
3. 张鲁榕,等. 流式细胞仪分析 T 淋巴细胞亚群. 生物化学与生物物理进展 1989; 16(22):157.
4. Hoffman RA, et al. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:4914.
5. Iwatani Y, et al. Effects of various isolation methods for human peripheral lymphocytes on T cell subsets determined in a fluorescence activated cell sorter(FACS), and demonstration of a sex difference of suppressor/cytotoxic T cell. J Immunol Meth 1982; 54:31.
6. 郭亚军,等. 应用全血微量染色流式细胞仪控制肝癌患者外周血和癌组织中 T 淋巴细胞亚群. 中华微生物学和免疫学杂志 1989; 9(2):99.

《家庭中医药》杂志创刊发行

时值'94 国际家庭年之际,由国家中医药管理局主管,中国中医研究院中药研究所主办的大型科普性中医药综合性杂志已于近日正式创刊发行。该杂志适合各个不同年龄组、不同文化阶层的读者,以家庭生活为中心,宣传介绍传统中医药学在防病治病、食疗养生、保健长寿等方面宝贵而丰富的经验与常识。该刊为双月刊 16 开 64 页,定价 2.90 元(全年 17.90 元)。目前自办发行,欢迎广大读者订阅。联系地址:北京中国中医研究院中药研究所“家庭中医药”杂志社(100700)。

Abstract of Original Articles

Clinical Study on Prevention and Treatment to Chemotherapy Caused Nephrotoxicity with Jian-Pi Yi-Qi Li-Shui Decoction (健脾益气利水汤)

Cheng Jian-hua (程剑华), et al

The Jiangxi Provincial Tumor Hospital, Nanchang (330029)

95 cases of cancer patients were treated with large dose of Cisplatin. They were randomly divided into treated group with Chinese medicinal herbs (49 cases) and control group with hydration treatment (46 cases). Multiple indexes were selected to observe effect on renal function. The result showed that the level of blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), β_2 microglobulin (β_2 -MG), urea N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) of treated group lowered. After treatment the difference of BUN, Cr between the two groups was significant ($P < 0.05$). It suggested that Jian-Pi Yi-Qi Li-Shui Decoction (JPYQLSD) was superior to hydration group in preventing the large dose of Cisplatin induced nephrotoxicity. It was also used to treat 44 cases-times of chemotherapy caused renal failure. The total effect rate is 93.18%. The difference of the level of BUN, Cr between before and after treatment was very significant ($P < 0.01$). It is proved that JPYQLSD has good effect in treating chemotherapy caused renal failure.

Key words Jian-Pi Yi-Qi Li-Shui Decoction, Cisplatin, renal failure

(Original article on page 331)

Relationship between T Cell Subsets and TCM Type in Ovarian Tumor Patients

Qi Cong (齐 聪), et al

Shu-Guang Hospital, Shanghai College of TCM, Shanghai (200021)

In order to study the difference in TCM types as well as between Deficiency and Excess type in immunity in the patients with ovarian tumors, the profile of peripheral blood T lymphocyte subsets in 73 cases of ovarian tumors was determined by using flow cytometry and monoclonal antibody technique. The results showed that the total T cells (OKT₃) of peripheral blood were almost normal in 73 tumor cases. And 50 of them were malignant tumors in which T helper cell were progressively decreased and T suppresser cell gradually increased in accordance with the order of Qi-Deficiency, Yin-Deficiency, Qi-Yin Deficiency types. The T₄/T₈ ratio showed significant difference ($P < 0.01$) compared with the control group and the initial ovarian tumor group. These results indicated that the change in the T lymphocyte subset in tumor was correlated with TCM type and this serves as both clinically sensitive indexes of different TCM type and reflection of the patient's immunologic status.

Key words TCM type of ovarian tumor, flow cytometry, T lymphocyte subset

(Original article on page 334)

Clinical Study on Treatment of Endometriosis with TCM

Liu Jin-xing (刘金星), et al

Chengdu College of TCM, Chengdu (610075)

46 endometriotic patients were treated by the method of removing Blood Stasis and resolving Phlegm, softening and resolving the Lump (RBS-RP-SRL). The total effective rate was 91.3%. Among them, the effective rate of dysmenorrhea was 97.6%, that of anal tenesmic was 94.3%, that of intercourse pain 86.7%, and 86.7% diminished in size of mass or nodule, 6 of 10 infertility patients became pregnant. It was showed by the laboratory assay that the cases were in the abnormal condition of nail bed microcirculation and hemorheology, which could be significantly improved after treatment. The results revealed that it was effective in treating endometriosis with the method of