

乙型肝炎患者肝组织中乙型肝炎病毒抗原 与 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞表达的关系及其临床意义

涂远航¹ 荣梅生² 马 勇¹

[摘要]目的:探讨乙型肝炎患者肝组织中乙型肝炎病毒(HBV)抗原与 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞表达的关系及其临床意义。方法:应用免疫组织化学法和核酸原位杂交法检测轻、中、重度乙型肝炎肝组织中 HBV 抗原及核酸的表达,同时应用免疫组织化学法检测肝组织 CD28⁺ T 细胞表达并比较。结果:重度、中度、轻度乙型肝炎中 HBsAg(+) HBcAg(+), HBsAg(+) HBcAg(-), HBsAg(-) HBcAg(+) 和 HBsAg(-) HBcAg(-) 差异无统计学意义($P > 0.05$)。轻度乙型肝炎患者肝组织内 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞水平较对照组低,中度和重度乙型肝炎患者 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞和 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞明显高于对照组($P < 0.05$),且 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞随着炎症分级逐级升高,CD8⁺ CD28⁻ T 细胞却随着炎症分级逐级减低($P < 0.01$)。HBsAg(+) HBcAg(+) 中、重度慢性乙型肝炎患者肝组织中 CD8⁺ CD28⁺ T 淋巴细胞表达低于 HBsAg(+) HBcAg(-), HBsAg(-) HBcAg(+) 和 HBsAg(-) HBcAg(-) 慢性乙型肝炎患者的表达($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。HBV DNA、HBeAg 在不同分级炎症活度中表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:肝组织 HBV 更能准确反映肝组织 HBV DNA 复制情况,是机体免疫状态的间接反映,可作为抗病毒治疗适应证选择及疗效预测因子。CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD28 分子的表达强度与 HBV 的清除密切相关,CD28 高表达可促进肝细胞内 HBV 清除。

[关键词] 肝炎;肝组织;T 淋巴细胞;表达

[中国图书资料分类法分类号] R 575.1

[文献标识码] A

The relationship between the expressions of HBV and CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte in liver tissue of hepatitis B patients and its corresponding clinical significance

TU Yuan-hang¹, RONG Mei-sheng², MA Yong¹

(1. Department of Infectious Diseases, 123rd Hospital of PLA, Bengbu Anhui 233015;

2. Department of Clinical Laboratory, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between the expressions of hepatitis B virus (HBV) antigen and CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte in liver tissue of hepatitis B patients and analyze the corresponding clinical significance. **Methods:** The expressions of HBV antigens and nucleic acid were detected by immunohistochemistry and situ hybridization method in each groups (mild, moderate and severe hepatitis B groups). The expression of CD28⁺ T lymphocyte in liver tissue was determined by immunohistochemistry and the results of each group were compared. **Results:** There was no significant difference in the expressions of HBsAg(+) HBcAg(+), HBsAg(+) HBcAg(-), HBsAg(-) HBcAg(+) and HBsAg(-) HBcAg(-) in the three groups ($P > 0.05$). The expression of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte in mild hepatitis group was lower than in control group, the expressions of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte and CD8⁺ CD28⁻ T lymphocyte were higher in moderate and severe hepatitis B groups than in control group ($P < 0.05$). The expression of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte was increased progressively, while the expression of CD8⁺ CD28⁻ T lymphocyte was decreased progressively with the grade of inflammation ($P < 0.01$). The expression of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte in moderate and severe hepatitis patients with HBsAg(+) HBcAg(+) was lower than in other groups with HBsAg(+) HBcAg(-), HBsAg(-) HBcAg(+) and HBsAg(-) HBcAg(-) ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). There were no significant difference about the expressions of HBV DNA and HBeAg in different levels of inflammation ($P > 0.05$). **Conclusions:** HBV can reflect the replication of HBV DNA in liver tissue more accurately. As an indirect reflection of immune status, it can be used as a selector of anti-viral treatment indication and a predictor of efficacy. The expression of CD28 on the surface of CD8⁺ T lymphocyte is closely related with the clearance of HBV and the high expression of CD28 can promote HBV clearance in liver cells.

[Key words] hepatitis B; liver tissue; T lymphocyte; expression

[收稿日期] 2011-06-07

[作者单位] 1. 中国人民解放军第 123 医院 传染科, 安徽 蚌埠 233015; 2. 蚌埠医学院 医学检验系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 涂远航(1975-) 男 主治医师。

[通讯作者] 马 勇, 硕士研究生导师, 教授。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起人类急、慢性肝炎最常见的病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科。全球约有 20 亿人已感染 HBV,每年约有 100 万人死于 HBV 感染慢性化所致肝衰竭、肝硬化和原

发性肝细胞癌^[1-3]。目前,主要采取检测患者外周血 HBV 含量和 T 淋巴细胞表达的方法来反映患者机体免疫状态,指导临床治疗,但多局限于外周血。据报道^[4-5]在肝组织损伤之前,HBV 已经在肝内复制增殖;HBV 病毒抗原,如 HBsAg、HBcAg、HBeAg 均可诱导机体产生抗原特异性 T 细胞免疫反应,产生大量特异性 CD8⁺T 淋巴细胞,并在肝内浸润。检测外周血不能准确地反映患者机体实际病情。根据 CD8⁺T 细胞上 CD28 分子表达与否,可将 CD8⁺细胞分为 CD8⁺CD28⁺细胞(细胞毒性 T 细胞,CTL)和 CD8⁺CD28⁻细胞 2 种细胞^[1-2]。而 CD28 的表达在 T 淋巴细胞活化过程中起着极其重要的作用,其表达状态与 HBV 感染者的预后密切相关。本试验应用免疫组织化学和核酸原位杂交方法检测乙型肝炎患者肝组织中 HBV 抗原、HBV DNA 的表达与 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达水平,探讨它们之间的关系,旨在为乙型肝炎患者病情、临床治疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例选自 2009 年 5 月至 2011 年 5 月蚌埠医学院第一附属医院和解放军第 123 医院乙型肝炎住院患者 60 例,男 45 例,女 15 例;年龄 32~64 岁。对照组 10 例,由蚌埠医学院病理学教研室提供。参照 2000 年西安会议,中华医学会传染病与寄生虫病和肝病分会学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的慢性乙型肝炎(CHB)诊断标准^[6],其中重度、中度、轻度 CHB 各 20 例。均排除其他肝炎病毒感染和应用激素药物影响免疫功能者。

1.2 试剂 鼠抗-HBsAg 单克隆抗体、兔抗-HBcAg 多克隆抗体、免疫组织化学 PV-9000 试剂盒购自北京中衫生物技术有限公司,兔抗人 CD8(CTL/Ts)单克隆抗体购自无锡博慧斯生物医药科技有限公司,小鼠抗大鼠 CD28 FITC 荧光单克隆抗体购自上海雷浩信息科技有限公司,免疫组织化学标记试剂盒为美国 Zymed 公司产品,免疫组织化学染色的过氧化物酶标记选用链霉卵白素试剂盒为美国 Maxin Biotech Inc 产品。

1.3 标本采集 在超声引导下肝穿刺获得 60 例 CHB 患者肝组织。肝组织经 4% 甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,行 4 μm 厚连续切片,分别做常规苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色和原位杂交。

1.4 方法

1.4.1 免疫组织化学染色 标本石蜡切片使用二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水。每张切片使用 50 μl 过氧化物酶阻断溶液消除内源性过氧化物酶活性 10 min。使用柠檬酸盐缓冲液高压抗原修复,分别滴加兔抗人-CD8 抗体和鼠抗-CD28 抗体(1:1:50),鼠抗-HBsAg 单克隆抗体(1:100),兔抗-HBcAg 多克隆抗体(1:100) 4℃ 冰箱过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,加入过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 25 min,每张切片加入 NBT 显色、AEC 显色、DAB 显色,最后苏木精复染,树胶封片。

1.4.2 HBV DNA 原位杂交 使用地高辛标记 HBV 原位杂交试剂盒及 NBT/BCIP 显色试剂盒,操作按说明进行。HBV 探针稀释度为 1:50~1:100,阳性信号为紫色颗粒。

1.5 结果判断标准 (1)应用 EnVision 二步法对病理切片进行 HBsAg、HBcAg 免疫组织化学检测:无明显 HBsAg 阳性细胞为阴性(-);HBsAg 阳性细胞数 < 25% 为阳性(+);25%~50% 为中度阳性(2+);> 50% 为强阳性(3+)。(2)肝组织内 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞染成蓝黑色和红色,HBsAg 阳性细胞为细胞膜或细胞质染成棕黄色,HBcAg 阳性细胞的胞质或胞核见棕黄色或细胞核阳性着色,HBV DNA 原位杂交阳性信号为紫色颗粒。每张切片随机选取 5 个高倍视野,计算其阳性数,取平均值。

1.6 统计学方法 采用方差分析、*q* 检验、*t* 检验、 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 轻、中、重度 CHB 患者肝组织中 HBsAg、HBcAg 检测比较 HBsAg 阳性细胞呈散在或弥漫分布;HBcAg 阳性细胞为细胞质或细胞核见棕黄色,或伴有细胞核阳性着色,常呈混合性分布(见图 1~2)。60 例中 HBsAg(+) HBcAg(+) 38 例,HBsAg(+) HBcAg(-) 10 例,HBsAg(-) HBcAg(+) 9 例,HBsAg(-) HBcAg(-) 3 例。HBsAg(+) HBcAg(+) 患者,以中度和重度为主(72.97%);HBsAg(-) HBcAg(-) 为 4 例,其中轻度 2 例。各炎症间 HBsAg 和 HBeAg 检测结果差异均无统计学意义($P > 0.05$) (见表 1)。

2.2 轻、中、重度 CHB 患者肝组织中 HBV 抗原表达与 HBV DNA、HBeAg 检测比较 60 例患者中,HBV DNA 阳性 54 例,阴性 6 例,各炎症之间 HBV DNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);60 例

CHB 患者中 HBeAg 阳性 42 例, 阴性 18 例, 各炎症之间 HBeAg 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2 及图 3)。

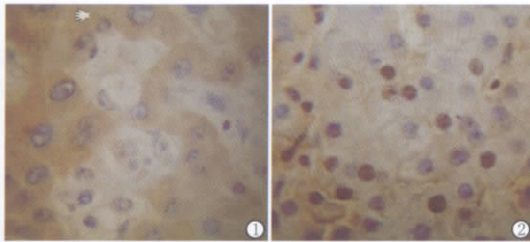


图1 HBsAg阳性细胞(免疫组织化学DAB染色)

图2 HBeAg阳性细胞(免疫组织化学DAB染色)

表 1 轻中、重度 CHB 患者肝组织中 HBV 抗原表达比较 (n)

分组	n	HBsAg(+)		HBsAg(-)		Hc	P
		HBcAg(+)	HBcAg(-)	HBcAg(+)	HBcAg(-)		
重度	20	13	5	2	0		
中度	20	14	2	2	2	2.33	>0.05
轻度	20	10	3	5	2		
合计	60	37	10	9	4		

表 2 轻、中、重度 CHB 患者肝组织中 HBV DNA、HBeAg 检测结果比较 (n)

分组	n	HBV DNA		HBeAg	
		阳性	阴性	阳性	阴性
重度	20	18	2	13	7
中度	20	19	1	15	5
轻度	20	17	3	14	6
合计	60	54	6	42	18
Hc	—	1.09		0.48 [△]	
P	—	>0.05		>0.05	

△示 χ^2 值

2.3 轻、中、重度 CHB 患者和对照组肝组织 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达比较 轻、中、重度 CHB 组与对照组中 CD8⁺CD28⁺T 细胞、CD8⁺CD28⁻T 细胞表达比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。轻度 CHB 患者肝组织内 CD8⁺CD28⁺T 细胞较对照组减少 ($P < 0.05$), 中度及重度患者 CD8⁺CD28⁺T 细胞较对照组增加 ($P < 0.01$), 且 CD8⁺CD28⁺T 细胞随着炎症分级逐级升高, CD8⁺CD28⁻T 细胞却随着炎症分级逐级减低 ($P < 0.01$) (见表 3 及图 4)。

2.4 不同表达的肝组织中 HBV 抗原轻、中、重度 CHB 患者 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达比较 HBsAg(+)/HBeAg(+) 中, 重度 CHB 患者肝组织中 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达均低于 HBsAg(+)/HBeAg(-)、HBsAg(-)/HBeAg(+) 患者 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 而中度患者仅明显低于 HBsAg(-)

HBeAg(-) 患者的表达 ($P < 0.01$) (见表 4)。

表 3 轻、中、重度 CHB 组和对照组 CD8⁺CD28⁺和 CD8⁺CD28⁻T 细胞表达的比较 (个/HP)

分组	n	CD8 ⁺ CD28 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ CD28 ⁻ T 细胞
重度	20	33.3 ± 9.2	16.1 ± 5.4
中度	20	24.6 ± 5.9 ^{**}	24.4 ± 6.9 ^{**}
轻度	20	5.98 ± 9.6 ^{##}	34.8 ± 3.8 ^{##}
对照组	10	12.6 ± 2.8 ^{##*} △	10.1 ± 2.3 ^{##*} △△
F	—	45.38	67.22
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	61.987	26.979

q 检验: 与重度组比较 * $P < 0.01$; 与中度组比较 ## $P < 0.01$; 与轻度组比较 △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

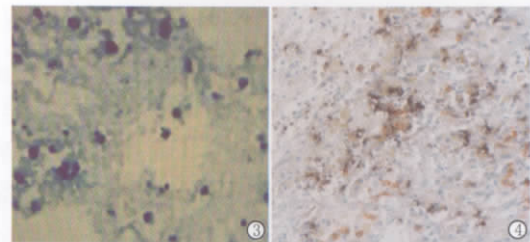


图3 HBV DNA原位杂交阳性(免疫组织化学染色)

图4 CD8⁺CD28⁺T细胞(免疫组织化学双标记法)

表 4 肝组织 HBV 抗原不同表达的轻、中、重度 CHB 患者的 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达比较 ($\bar{x} \pm s$; 个/HP)

分组	n	重度	n	中度	n	轻度
		CD8 ⁺ CD28 ⁺ T		CD8 ⁺ CD28 ⁺ T		CD8 ⁺ CD28 ⁺ T
HBsAg(+)/HBeAg(+)	13	18.6 ± 3.9	14	18.5 ± 2.7	10	4.8 ± 9.4
HBsAg(+)/HBeAg(-)	5	23.5 ± 2.5 [*]	2	20.7 ± 2.2	3	6.2 ± 4.6
HBsAg(-)/HBeAg(+)	2	35.1 ± 5.7 ^{**}	2	24.2 ± 3.4	5	10.2 ± 2.8
HBsAg(-)/HBeAg(-)	0	—	2	29.7 ± 7.8 ^{**2}		13.8 ± 1.6
F	—	17.68	—	7.83	—	1.18
P	—	<0.01	—	<0.01	—	>0.05
MS _{组内}	—	14.118	—	10.751	—	54.468

q 检验: 与 HBsAg(+)/HBeAg(+) 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HBsAg(+)/HBeAg(-) 组比较 ## $P < 0.01$

2.5 轻、中、重度 CHB 患者肝组织中 HBV DNA、HBeAg 与 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达比较 乙型肝炎肝内无论 HBV DNA 和 HBeAg 是否阳性, 在同一炎症级别的 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 5)。

3 讨论

HBV 感染引起的肝组织病变, 并不是 HBV 本身对肝脏细胞的破坏, 而是通过诱导 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应损伤肝脏组织来实现的。CD8⁺T 细胞介导的细胞毒作用对肝细胞的损伤和

表5 乙型肝炎肝内 HBV DNA、HBeAg 与 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞在不同分级炎症活动中表达比较(个/HP)

观察项目	n	CD8 ⁺ CD28 ⁺ T 细胞		
		重度	中度	轻度
HBV DNA(+)	54	34.2 ± 9.1	24.4 ± 6.3	3.9 ± 9.6
HBV DNA(-)	6	36.8 ± 8.7	26.7 ± 8.9	4.6 ± 5.8
t	—	0.67	0.81	0.17
P	—	>0.05	>0.05	>0.05
HBeAg(+)	42	32.6 ± 6.5	23.9 ± 9.5	3.8 ± 8.6
HBeAg(-)	18	33.5 ± 4.9	25.2 ± 3.2	4.2 ± 9.7
t	—	0.53	0.79 [△]	0.16
P	—	>0.05	>0.05	>0.05

△示 t 值

病毒的清除尤其重要^[7]。CD28 是 CD8⁺T 细胞初始活化的不可缺少的第二信号,对诱导和维持 T 细胞介导的免疫应答有重要作用^[4]。在病毒感染初期,T 细胞在活化信号的作用下克隆增殖,CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞增多,为 T 细胞清除病毒做准备。

本研究对 60 例 CHB 患者肝组织病变进行炎症分级后观察,CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞在各级之间有明显差异。轻度 CHB 患者的肝组织内 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞数量明显低于对照组,提示 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD28 的表达水平下降,B7/CD28 共刺激通路异常,使 CD8⁺T 淋巴细胞活化低下,使机体对 HBV 难以清除,处于相对免疫耐受状态^[8-9]。因此,临床上轻度 CHB 患者对抗病毒药物所起免疫反应有限,效果相对较差。与轻度 CHB 患者不同,中度及重度患者肝组织内 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞数量明显多于对照组,并随着炎症加重而逐渐增多。在临床实践中,这部分患者抗病毒效果优于轻度患者^[10]。这说明肝组织内 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD28 分子的表达强度与 HBV 的清除密切相关。

60 例 CHB 患者肝组织中有 37 例(61.67%)表达 HBsAg(+) HBeAg(+),其中中、重度患者占 72.97%;4 例肝组织为同时表达 HBsAg(-) HBeAg(-),中、轻度患者各有 2 例。这表明 HBsAg 和 HBeAg 的表达对提示肝脏是否被 HBV 诱导的 T 淋巴细胞免疫损伤以及免疫损伤的程度有着重要的临床诊断意义。

本研究结果显示,HBsAg(+) HBeAg(+) CHB 患者,中、重度患者肝组织的 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞表达低于 HBsAg(+) HBeAg(-)、HBsAg(-) HBeAg(+) 和 HBsAg(-) HBeAg(-) 患者的表达,

CD8⁺CD28⁺T 细胞的表达高低与 HBsAg、HBeAg 表达强弱有一定关系。据报道^[11-12],HBsAg 的滴度与 HBV DNA 阳性率之间呈正相关关系。感染初期 HBV 活跃复制,CD8⁺CD28⁺T 细胞表达低,肝组织病变轻微;随感染的持续,CD8⁺CD28⁺T 细胞表达增强破坏 HBV 感染的肝细胞,肝组织病变加重,HBV 复制水平降低。肝组织 HBV 载量与肝组织炎症活动度呈反向关系,肝组织 HBV DNA 低者,炎症活动度较重,这与既往报道^[13-14]一致,也符合慢性 HBV 感染的自然病程。因此,肝组织 HBV DNA 水平在某种程度上间接反映机体免疫状态,可作为抗病毒治疗适应证选择及疗效预测因子。

综上,从 HBV 侵入机体开始,肝组织内 HBV 抗原与 CD8⁺CD28⁺T 细胞表达有密切关系,CD8⁺CD28⁺T 细胞表达增强时,肝组织病变加重,HBV 复制水平降低,机体清除病毒能力强;反之,CD8⁺CD28⁺T 细胞表达低下时机体清除 HBV 的能力表现较低时,肝内病毒载量则较高。肝组织穿刺检测 HBV 抗原、HBV DNA 和 CD8⁺CD28⁺T 细胞的表达,更能准确判断 CHB 患者肝组织 HBV DNA 复制情况和肝组织的炎症损伤程度,为指导临床乙型肝炎抗病毒治疗和免疫治疗提供一个参考依据。

[参 考 文 献]

- [1] Rapice M, Ferrari C, Levrero M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection [J]. J Med Virol 2002, 67(3): 454-457.
- [2] Morovic M. Treatment of chronic hepatitis B [J]. Acta Med Croatica 2005, 59(5): 429-432.
- [3] 赵婷婷, 杨智清, 郭波, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群 CD27 和 CD28 的表达 [J]. 中华消化外科杂志 2006, 5(6): 439-442.
- [4] 郝峰, 方芳, 李艳, 等. 乙肝患者外周血 T 淋巴细胞上 CD28 表达及临床意义 [J]. 中华民康医学 2007, 19(10): 826-827.
- [5] Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, et al. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2009, 12(4): 561-578.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病分会. 病毒性肝炎治疗方案 [J]. 中华传染病杂志 2001, 19(1): 56-62.
- [7] 蔡洁, 刘源, 韩亚萍, 等. 慢性乙肝患者外周血淋巴细胞表面 CD28 的表达 [J]. 放射免疫学杂志 2008, 21(5): 467-468.
- [8] 安萍, 尹波, 卞丽, 等. 乙型肝炎病毒携带者 T 淋巴细胞 CD28 与免疫耐受的关系 [J]. 中国全科医学 2007, 10(20): 1694-1696.
- [9] 周光炎. 免疫学原理 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 157.

(下转第 1379 页)

表 2 血液病组血液标本室温存放不同时间血细胞参数的测定结果 ($n=20; \bar{x} \pm s$)

存放时间	RBC	Hb	PLT
20 min	2.15 ± 0.37	75.0 ± 10.2	48.0 ± 6.8
8 h	2.09 ± 0.31	72.4 ± 9.8	45.7 ± 6.2
9 h	2.01 ± 0.30	73.1 ± 9.7	44.2 ± 6.2
10 h	2.12 ± 0.28	72.3 ± 9.5	42.5 ± 5.8*
11 h	2.10 ± 0.22	71.1 ± 9.1	41.2 ± 5.6**
12 h	2.08 ± 0.20*	71.6 ± 9.0	38.7 ± 4.9**
24 h	1.87 ± 0.19*	69.1 ± 8.9*	30.9 ± 4.1**
F	2.36	0.74	19.2
P	<0.05	>0.05	<0.01
MS _{组内}	0.075	89.634	32.706

q 检验: 与 20 min 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的影响具有不确定性。对此, 本文探讨了室温下存放血标本 8 ~ 24 h 的不同时间点对血细胞分析结果重复性的影响。

实验结果分析显示, 室温下血标本存放 24 h 后主要检测指标如 WBC、RBC、Hb、RDW、HCT 等仍可保持稳定, 测定数据与新鲜标本检测结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 PLT 随标本存放时间延长呈下降趋势, 且 24 h 更显著, 与 PLT 的结构和易破碎、易发生聚合变性等特性有关, 也可能由于长时间放置 PLT 聚集导致计数减低^[5]。室温放置 12 h 内, WBC 分类较为稳定, 测定结果差异不明显, 原因可能是在加入溶血素后 WBC 膜溶解, 细胞质部分溢出, 细胞体积缩小, 仅留下细胞核和部分颗粒, 如果在保存期内细胞核和颗粒不发生明显变性, 则对缩小后的细胞体积影响不大^[4]。本研究结果发现, 健康人群血标本室温存放 24 h 时, WBC 分类发生明显改变, N% 降低, M% 增高, 可能与放置时间过久, 中性粒细胞核固缩或肿胀, 细胞内颗粒发生变性, 易被仪器识别为单核或淋巴细胞有关; 另外, 久置后血

细胞粘连明显也会严重影响到 WBC 的分类。

病理状态下, 血标本随存放时间的延长, RBC、PLT 计数呈下降趋势, 且时间越长, 降低越显著, 较正常水平而言, 结果重复性更加不稳定。分析原因, 可能是因为贫血、血小板减少性疾病等病理情况不仅可以导致血细胞计数结果较正常健康人水平低, 而且 RBC 或 PLT 的稳定性也较正常水平差, 因此, 长时间室温放置更易导致血细胞的破碎、PLT 的聚集, 从而影响检测结果的重复性。由于其他血液疾病如白血病患者细胞分类情况复杂, 不易分析, 故没有比较 WBC 分类等指标。

综上所述, 标本存放时间是复查分析前质量控制的重要环节, 采用日本光电 MEK8222K 型全自动血细胞分析仪, 检测室温保存血标本不同时间点检测结果的重复性, 有利于提供可靠的复查依据。对于正常水平或是部分病理水平, 标本放置 10 h 内对标本的各项参数影响均在质量控制范围内, 可以满足临床需要, 时间较长则影响测定结果的可靠性, 建议临床重新采集血样复查。

[参 考 文 献]

- [1] Alsina MJ, Alvarez V, Barba N *et al*. Preanalytical quality control program—an overview of results (2001–2005 summary) [J]. Clin Chem Lab Med 2008, 46(6): 849–854.
- [2] 罗春丽, 刘体会. 临床检验基础 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 56.
- [3] 林军, 刘玉秀, 孟泽. 标本保存时间和温度对 Beckman Coulter STKS 测定结果的影响 [J]. 医学研究生学报, 2002, 15(1): 32–35.
- [4] 姜坚江. 全血细胞计数标本保存时间对检测结果的影响 [J]. 浙江实用医学, 2010, 15(4): 321–323.
- [5] 温小梅, 李乐. 标本保存时间、温度及采集量对 Coulter HMX 血细胞分析仪检测结果的影响 [J]. 福建医药杂志, 2008, 30(5): 87–89.

(本文编辑 刘畅)

(上接第 1376 页)

- [10] 杨尚琪, 唐孝达, 顾晓, 等. 共刺激后淋巴细胞产生 Th1/Th2 细胞因子的变化及免疫抑制剂的影响 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2008, 29(5): 337–341.
- [11] 张文杰, 毛维武, 田淑菊, 等. 乙型肝炎病毒标志物定量检测及肝组织病理学检测应用于慢性乙型病毒性肝炎患者的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1507–1509.
- [12] 厉新妍, 雷瑞祥. 248 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝组织 HbsAg/HbcAg 表达的相关性研究 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(2): 98–100.

- [13] 商庆华, 于建国, 安永, 等. 慢性乙型肝炎 1 646 例肝脏组织病理学与血清 HBVDNA 定量关系的研究 [J]. 临床军医杂志, 2005, 33(1): 1–5.
- [14] 任天顺, 牛春燕, 吴方雄, 等. 慢性乙型肝炎患者血清、肝内 HBV DNA 定量及肝组织 HBV DNA 载量与肝组织损害程度的关系 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(10): 886–888.

(本文编辑 刘璐)