DOI:10.16016/j.1000-5404.1982.01.022

肝硬化及原发性肝癌的外周血淋巴细胞酸性α⁻醋酸萘酯酶测定

第一附属医院内科消化组

袁爱力 刘为纹 晋华源 门荣甫 罗元辉 李光瑶 廖福权

目前临床常用玫瑰花结试验来测定循环中的T、B淋巴细胞数，做为判断机体细胞免疫功能状态的检测手段。但该方法较繁杂，未能普遍推广应用。1975年Mueller[1]提出酸性α⁻醋酸萘酯酶染色（ANAE染色）可识别T淋巴细胞，国内于1980年有该染色法的详细介绍。本文对肝硬化及肝癌患者进行外周血ANAE染色以了解其细胞免疫功能状态，现报告如下：

材料及方法

一、正常值：男、女各25例，均为本院健康工作人员，年龄17～68岁。

二、肝硬化组：33例，为本院内科住院病人，经临床诊断证实。

三、原发性肝癌组：18例，为本院住院病人，均符合全国肝癌会议拟定的原发性肝癌诊断标准。

四、染色方法：按南京铁道医学院组胚教研室[2]报导的方法略加改良[3]，其步骤如下：取耳血推片，空气中自然干燥，福尔马林薰气固定2分钟，染液内含M/15，pH7.6磷酸盐缓冲液89毫升，六偶氮付品红液6毫升，2.5%α⁻醋酸萘酯2.5毫升，调pH至5.8，于37℃孵育1小时，流水冲洗，干燥后2%甲苯胺兰复染30分钟，冲洗，干燥，镜检。镜下观察可见中性粒细胞胞核呈深兰色，胞浆淡兰色，无颗粒。单核细胞胞浆中可见均匀一致的红色细小颗粒，分布于整个胞浆中。淋巴细胞胞核呈深兰色，胞浆呈淡兰色，ANAE阳性细胞的胞浆中有大小不等的红色或红棕色颗粒，数目通常为1～2个，亦有2个以上者，少数ANAE阳性细胞的胞浆中显云雾状的细小颗粒，不凝结成团。油镜下计数100～200个淋巴细胞，算出ANAE阳性细胞及ANAE阴性细胞的百分率。

结果

一、正常值：以ANAE阳性细胞代表T淋巴细胞，ANAE阴性细胞代表B淋巴细胞，50例正常人T淋巴细胞平均值为72.76±5.68%（表一），男、女性别间无明显差别。按平均值-2SD计，T淋巴细胞在62%以下判为异常。

二、肝硬化及原发性肝癌ANAE染色结果：

从表2中可见肝硬化及原发性肝癌的ANAE平均值比正常人均有明显的降低（$P<0.01$），肝硬化及肝癌组之间比较无显著差异（$P>0.05$）。若以T淋巴降至62%以下判为阳性，则肝硬化组之阳性率占66.7%，肝癌组之阳性率83.3%，二组之间$P>0.05$，无显著差异。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 正常人T淋巴细胞计数

性别	例数	平均值	标准差	标准误
男	25	70.70	6.44	1.29
女	25	74.70	4.91	0.98
共计	50	72.70	5.68	1.14

表2 肝硬化及肝癌的T淋巴细胞计数

病名	例数	平均值±标准差	异常阳性率
肝硬化	33	59.02±10.93%	66.7% (22/33)
肝癌	18	54.72±11.97%	83.3% (15/18)

讨论

一、ANAE染色法的原理及临床意义：

本染色法的原理是T淋巴细胞胞浆中含有非特异性的α-醋酸萘酯酶(α-naphthyl acetate esterase, ANAE)，该酶是一种溶酶体酶，电镜观察该酶位于溶酶体的位置上。它能将α-醋酸萘酯水解，生成α-萘酚和醋酸离子，然后α-萘酚与六偶氮付品红偶联，在细胞浆中酯酶所在部位生成不溶性的红棕色沉淀物，而B淋巴细胞则无此种反应。因此，ANAE阳性细胞基本上代表T淋巴细胞。目前通常用E-玫瑰花结形成试验及EAC-玫瑰花结形成试验分别检测T淋巴及B淋巴细胞，但该方法操作流程较复杂，不能普遍推广使用。自Muellerr提出用ANAE染色可检测T淋巴细胞后，引起了广泛的兴趣，为了解ANAE染色法的可靠性，有的作者同时进行玫瑰花结形成及ANAE染色，结果证明80%以上的E花结形成细胞为ANAE（+）细胞，如Ferrari[4]将E花结及ANAE联合检查，结果89.68% ANAE阳性细胞作E花结形成试验同样阳性，15.53% E花结阳性细胞作ANAE染色为阴性，该氏认为ANAE染色法可作为一个简单的，可靠的T淋巴计数法。近年来有的作者进一步指出，ANAE染色法还可以进一步鉴别T淋巴细胞亚型。Grossi等[4] 1978年提出Tu细胞和Tr细胞的ANAE活性产物有区别，Tu细胞的反应产物为局灶性大颗粒，数目常为一个，有时多个；Tr细胞较大，活性染色为弥漫性的小颗粒。本文初步观察到正常人血片中有少数T淋巴细胞表现为弥漫性的云雾状细颗粒，其百分率大致在10～15%之间，但鉴别Tr及Tu亚型要求染色条件稳定，质量高，开始鉴别缺乏经验时，最好同时进行淋巴细胞亚型测定，以互相对照。

二、肝硬化及肝癌的细胞免疫功能改变：

在肿瘤的发生中免疫监视是一个很重要的机制，它能识别自身突变或带有肿瘤抗原的细胞，并将其杀灭之。具有免疫监视作用的淋巴细胞有T淋巴及NK细胞（自然杀伤细胞）。不少作者均发现慢性肝病及肝硬化患者有T淋巴减少，众所周知，肿瘤患者的细胞免疫功能亦常有降低。Thoma[5]检查各型慢性肝病，结果E-花结实验有明显降低。慢性肝病患者的血液经胸腺素处理后E-花结的数量可以增加，说明慢性肝病病人血中未成熟的T淋巴细胞增多，而成熟的T淋巴细胞减少，这种未成熟的T淋巴有人认为系Null细胞。关于慢性肝病时T淋巴细胞减少的机制是很复杂的，目前存在多种解释，有待进一步研讨。Morizane[6]测定

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

21例肝硬化及25例原发性肝癌之T淋巴细胞，结果均比正常人降低。国内余新生等[7]采用活性花结和酯酶染色双标记法检查，发现肝癌患者E-花结内出现ANAE（－）细胞，而肝炎、肝硬化及正常人不出现。本文用ANAE染色检查肝硬化及肝癌，T淋巴细胞数均明显降低。其中肝癌之T淋巴细胞降低阳性率大于肝硬化组，说明这两种疾病在细胞免疫功能障碍的程度上是存在一些差别的。肝硬化及原发性肝癌二者之间关系密切，以上结果提示在肝硬化转变为肝癌的过程中细胞免疫功能降低起着重要的作用。关于慢性肝病及肝癌患者的淋巴细胞亚型的改变研究得还不多。Williams[8]检查慢性肝病T淋巴细胞有明显减少，其中主要是Tu细胞的减少。肿瘤患者一般多有Tr细胞的增加，老年人易患癌肿与Tr细胞明显增多有关。根据本文检查发现肝硬化及肝癌患者的ANAE阳性细胞中胞浆显弥漫性小颗粒的细胞（可能为Tr细胞）亦比正常人增多。

小　　结

目前普遍认为外周血淋巴细胞酸性α⁻醋酸萘酯酯酶测定是一个简单而适用的检测T淋巴细胞的方法。本文测得正常值为72.76±5.68%，T淋巴细胞在62%以下判为异常。肝硬化及原发性肝癌之平均值各为59.02±10.93%及54.72±11.97%，异常阳性率各为66.7%及88.3%。肝癌及肝硬化患者的T淋巴细胞与正常人相比均有显著降低，但在发生机制及这两种疾病在免疫学上的互相关系；以及ANAE染色法对鉴别淋巴细胞亚型的价值等方面目前了解得还不多，尚须深入研究。

参 考 文 献

1. Mueller J, Eur J Immunol 5:270, 1975
2. 南京铁道医学院组胚教研室：中华医学检验杂志 3:6 1980
3. 张　捷：酸性α⁻醋酸萘酯酯酶染色法的体会。内部资料
4. Ferrari FA, Clin Exp Immunol 41:358, 1980
5. Thomas HC, Clin Exp Immunol 26:222, 1976
6. Morizane T, Gastroenterologia Japonica 15:226. 1980
7. 余新生：上海医学 p46,1980年2月
8. Williams RC, Clin Immunol Immunopathol 15:616. 1980

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net