

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.017

激光共聚焦显微镜在肿瘤免疫治疗检测中的应用*

李秀丽¹ 平家奇² 薛丽¹ 刘洋¹ 赵彩凤¹ 姜晓峰^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 检验科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 上海柯莱逊生物技术有限公司 上海 200000)

摘要 目的:通过激光共聚焦显微镜对肿瘤生物治疗后患者的外周血淋巴细胞进行亚群计数,为生物治疗后外周血淋巴细胞无法分群的肿瘤患者提供新的监测免疫功能状态的方法。**方法:**收集 35 例肿瘤生物治疗后患者的外周血标本,通过激光共聚焦显微镜和流式细胞仪两种方法分别对患者外周血淋巴细胞亚群进行分类计数。**结果:**流式细胞仪和激光共聚焦显微镜同时分类计数的患者外周血细胞标本 30 例,两种方法在检测 CD3⁺、CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺、CD3⁺/CD16⁺56⁺、CD3⁺/CD19⁺ 细胞时均无统计学差异(P 值>0.05);5 例流式细胞仪无法将患者外周血淋巴细胞分群的样本,通过激光共聚焦显微镜可以进行分类计数。**结论:**激光共聚焦显微镜亦可以用于外周血淋巴细胞的分类计数。

关键词:激光共聚焦显微镜;淋巴细胞分类计数;生物治疗患者

中图分类号:R730.2;R730.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3270-04

Application of Laser Scanning Confocal Microscope in the Detection and Immunotherapy of Tumors*

LI Xiu-li¹, PING Jia-qí², XUE Li¹, LIU Yang¹, ZHAO Cai-feng¹, JIANG Xiao-feng^{1Δ}

(Department of Clinical Biochemistry Laboratory, The 4th affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Shanghai Ke Lessing Biological Technology Co. Ltd., Shanghai, 200000, China)

ABSTRACT Objective: Through count the sub-groups of peripheral blood lymphocyte of tumor patients after biological treatment by laser scanning confocal microscope (LSCM), a new method developed to test immune state of unable to object tumor patients. **Methods:** Collected 35 Peripheral Blood (PB) samples of tumor patients after biological treatment, and counted the sub-groups of their peripheral blood lymphocyte by LSCM and flow cytometry (FCM). **Results:** 30 PB samples were counted by both LSCM and FCM, and there was no significant difference between LSCM and FCM. 5 PB samples which can not be counted by FSM, can be counted by LSCM. **Conclusions:** LSCM can be used for counting the sub-groups of peripheral blood lymphocyte.

Key words: Laser scanning confocal microscope (LSCM); Counting the sub-groups of lymphocyte; Patients of biological treatment

Chinese Library Classification(CLC): R730.2; R730.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3270-04

前言

肿瘤的发生、发展与机体的免疫监视机制密切相关,T 淋巴细胞介导的细胞免疫以及不需抗原刺激即可直接发挥抗肿瘤效应的 NK 细胞一直被认为在机体抗肿瘤过程中起重要作用^[1,2]。

肿瘤生物治疗是一种新兴的、具有显著疗效的肿瘤治疗模式,其利用机体自身免疫系统修复、刺激和提高机体对肿瘤的反应直接或间接杀伤肿瘤细胞,从而达到治疗肿瘤的目的,这是继手术、放疗和化疗之后的第四大肿瘤治疗技术^[3,4]。

目前,对于肿瘤生物治疗后监测免疫功能状态,主要采用流式细胞术检测肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞情况^[5]。

在临床上一部分肿瘤患者进行生物治疗后会发现患者外周血淋巴细胞无法分群,其机制尚不清晰。可能与细胞自身非

特异荧光增强,引起各荧光通道检测时交叉干扰有关。我们通过使用激光共聚焦显微镜分析了 35 例肿瘤生物治疗后患者的外周血淋巴细胞各亚群计数与流式细胞仪检测结果相比较;分析两种检测方法对患者外周血淋巴细胞亚群的分类是否存在差异,以期待为生物治疗后外周血淋巴细胞无法分群的肿瘤患者提供新的监测免疫功能状态的方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

35 例生物治疗后的肿瘤患者均为哈尔滨医科大学肿瘤内科住院患者,其中 5 例患者外周血淋巴细胞亚群使用流式细胞仪无法分群。

1.2 主要试剂与仪器

Calibrite 三色校准微球:货号 3303605 荧光抗体:BD Simultest™ IMK-Lymphocyte* 包括同型对照 IgG1/IgG2a、

* 基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项基金项目(2011YQ040087)

作者简介:李秀丽(1989-),硕士,研究方向:肿瘤免疫相关治疗

Δ 通讯作者:姜晓峰(1962-),博士,教授,研究方向:免疫学、哮喘、分子诊断

(收稿日期:2016-12-11 接受日期:2016-12-30)

CD3-FITC/CD4-PE、CD3-FITC/CD8-PE、CD3-FITC/ CD19-PE、CD3-FITC/ CD16+56+PE 抗体(货号:340182)。

10× FACS Lysing Solution 货号:340503。

以上所有试剂均购自美国 BD 公司。

淋巴细胞分离液货号:LTS1077 天津灏洋生物制品科技有限公司。

DAPI 染料:Sigma 公司。

流式细胞仪:BD FACScalibur;

激光共聚焦显微镜:光谱共聚焦显微镜 HUE-SCM232。

1.3 检测方法与步骤

1.3.1 血样制备 取流式细胞上样管 5 支,分别命名为同型对照管 A (IgG1/IgG2a)、实验管 B (CD3FITC/CD4PE)、C (CD3FITC/CD8PE)、D (CD3FITC/CD19PE)、E (CD3FITC/CD16⁺56⁺PE),每管中均加入混匀的外周血 50 μ L,然后分别加入 20 μ L 同型对照抗体、CD3FITC/CD4PE、CD3FITC/CD8PE、CD3FITC/CD19PE、CD3FITC/CD16⁺56⁺PE 抗体充分混匀,避光室温孵育 20 min;每管加入 10 倍稀释的 1× FACS Lysing Solution 1 mL,混匀避光孵育 10 min;300× g 离心 5 min,弃上清,加入 2 mL PBS 重悬细胞,300× g 离心 5 min,弃掉上清,每管加 500 μ L 鞘液,充分混匀,进行流式细胞仪检测。

取 EDTA-Na2 抗凝新鲜静脉血 2 mL,分离外周血淋巴细胞(按说明书操作)。按 1.3.1 方法制备血样标本 300× g 离心 5

min,弃上清加入 500 ng/mL 的 DAPI 染料 100 μ L,室温避光孵育 15 min,加入 2 mL PBS 重悬细胞,300× g 离心 5 min,弃掉上清,沉淀涂片,加盖盖玻片镜检。

1.3.2 流式细胞仪的设定与检测 应用 CELLQuest Pro 软件进行流式细胞仪检测,在 FSC / SSC 双参数点图中圈出淋巴细胞群设门,每份标本收集门内 10000 个细胞,在不同散点图中计数细胞,分析 CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺、CD3/CD16⁺56⁺、CD3/CD19⁺ 淋巴细胞的表达情况,并根据所占总淋巴细胞的百分比分析结果。

1.3.3 激光共聚焦显微镜的设定与检测 打开总电源开关,并打开计算机主机;打开激光器(358 nm, 488 nm, 552 nm)按钮开关,将开关钥匙拨至 Standby 位置,激光器预热十分钟;打开滤光轮、汞灯开关;打开共聚焦显微镜观测软件,系统将自动进行初始化至此显微镜进入待机状态;取待测样品置于载物台上,根据样品染色情况选择适当二向色镜,使用适当倍率物镜进行目视观察,找到目标区域后,切换至共聚焦实时扫描模式进行观察;在共聚焦显微镜 358 nm 吸收波长观察 DAPI 染料在细胞核的着色找到淋巴细胞,转至其它通道 (488 nm, 560 nm 波长)观察该细胞的两种荧光染色情况,根据不同抗体标记将淋巴细胞进行分类计数。图 1 为通过激光共聚焦显微镜观察到的淋巴细胞示意图。

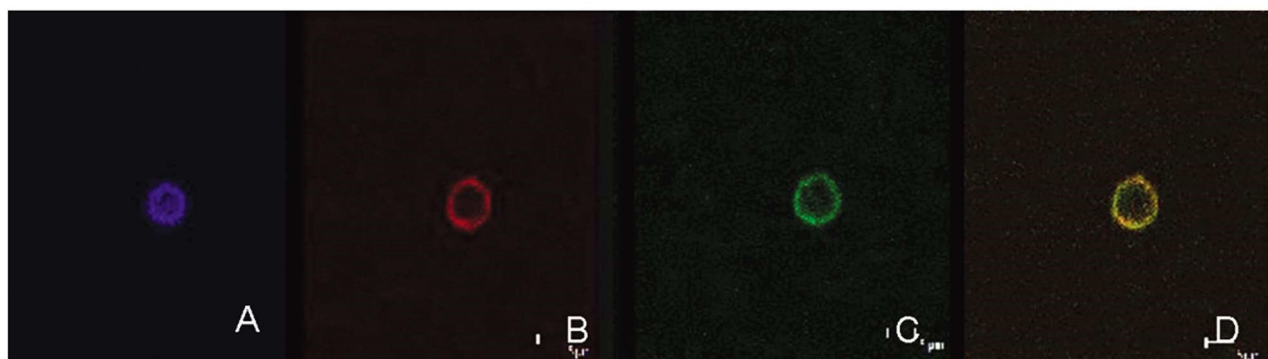


图 1 通过激光共聚焦显微镜观察到的淋巴细胞

A. DAPI 染色,40×;B.PE 荧光染色;C.FITC 染色;D.为 PE 和 FITC 合并图。

Fig.1 The lymphocytes observed by LSCM

A. lymphocytes stained by DAPI; B. PE staining; C. FITC staining. D. Merge of PE and FITC staining. 40×.

1.4 统计分析

统计学方法使用 SPSS 17.0 统计学软件处理数据,采用配对资料 t 检验进行比较,数值用均值和标准差(Mean± S.M)表示,P<0.05 有统计学意义。

2 结果

两种检测方法对生物治疗后患者外周血标本 CD3、CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺、CD3-CD16⁺56⁺/CD3/CD19⁺5 项免疫指标检测结果进行分析。其中,流式细胞仪能够将患者外周血淋巴细胞分群的样本 30 例,这些标本同样使用激光共聚焦显微镜进行分类计数,两种检测方法差异无统计学意义,结果如表 1(图 2)所示。

表 1 流式细胞仪可分群的外周血淋巴细胞分类与激光共聚焦显微镜下细胞计数分类相比较

Table 1 The comparison of peripheral blood lymphocytes classification and cell counts applied by flow cytometry and LSCM(n=30, Mean± S)

Detection Methods	Lymphocyte subsets(%)				
	CD3	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3/CD16 ⁺ 56 ⁺	CD3/CD19 ⁺
Flow cytometry	65.6± 13.7	27.6± 8.72	34.3± 12.76	21.9± 13.4	10.46± 4.54
LSCM	66.2± 13.7	28.2± 9.34	34.6± 12.96	22.5± 13.3	10.54± 4.31
P-Value	0.136	0.09	0.392	0.11	0.851

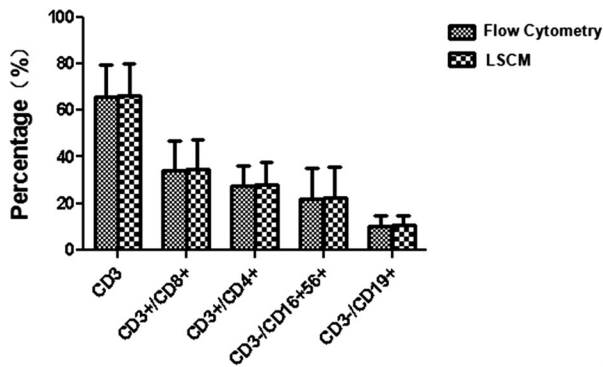


图2 两种检测方法对淋巴细胞亚群分类的比较

Fig.2 The comparison of peripheral blood lymphocytes classification and cell counts applied by flow cytometry and LSCM

5 例流式细胞仪无法将患者外周血淋巴细胞分群的样本,通过激光共聚焦显微镜可以进行分类计数,结果见表 2。

表 2 流式细胞仪无法分群的外周血淋巴细胞在激光共聚焦显微镜下细胞计数分类结果

Table 2 Peripheral blood lymphocytes clustered by LSCM

Samples	Lymphocyte subsets(%)				
	CD3	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ /CD16 ⁺ 56 ⁺	CD3 ⁺ /CD19 ⁺
1	71	37	28	13	9
2	79	24	51	5	9
3	71	29	36	19	5
4	73	26	25	15	10
5	60	34	25	27	7

[12]。CIK 细胞是将人的外周血单个核细胞与多种细胞因子在体外共同培养一段时间后,得到一类表达 CD3 和 CD56 双阳性的细胞群,既具有 T 淋巴细胞和 NK 细胞强大的抑制肿瘤作用,又有 NK 细胞的非 MHC 限制性杀伤肿瘤的优点[6,13,14]。

由于癌症患者生物治疗后,体内淋巴细胞的数量和百分比同时发生变化[15],同时外周血淋巴细胞的数量与癌症患者的免疫功能状态相关。这也为免疫治疗后监测机体免疫状态提供依据。目前,对于肿瘤患者进行细胞生物治疗后判断细胞转化效率、评价免疫功能,主要通过流式细胞检测技术将外周血细胞标记不同荧光抗体检测外周血淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、NK 细胞及 B 细胞,即 CD3⁺/CD4⁺ 细胞、CD3⁺/CD8⁺ 细胞、CD3⁺/CD16⁺56⁺ 细胞、CD3⁺/CD19⁺ 细胞[5]。

近年来流式细胞技术在临床的应用受到越来越多的重视,其通过检测免疫细胞变化来确定机体免疫功能状态已经广泛应用于临床生物治疗的患者[16,17]。但由于流式细胞仪在检测 2 个以上荧光染色时,不同荧光素光谱之间存在相互重叠,引起各荧光通道之间出现交叉干扰的现象。同样,普通荧光显微镜也存在这种干扰,而激光共聚焦显微镜的分辨率远非普通荧光显微镜所能及,这也是国际上共聚焦显微镜大为流行的原因之一[18];并且对于多色的荧光染色,通过补偿设置,激光共聚焦显微镜能通过消除荧光串色的影响,最大限度的减少了样品荧光信号的损失;可观察被染上荧光的物质在细胞里的分布,例如,是在细胞膜上还是在细胞核里。我们在临床上发现一部分肿瘤患者进行生物治疗后外周血淋巴细胞通过流式细胞仪检测无法分群,这样临床上很难判断细胞转化效率,以及机体的免疫

3 讨论

生物治疗作为一种新的细胞免疫治疗方法,通过在细胞因子刺激条件下体外扩增肿瘤特异效应细胞,再回输患者体内已达到治疗的目的[6,7]。

随着生物治疗技术的发展许多免疫效应细胞被用于癌症的治疗或清除手术后残存的肿瘤细胞,目前广泛研究的细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞,淋巴因子活化的杀伤细胞(lymphokine-activated killer cells, LAKs),肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs),自然杀伤细胞(natural killer cells, NKs),和细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte cells, CTLs)等备受关注[8,9],其中 CIK 细胞是目前抗肿瘤细胞免疫治疗最有效的方案[10,11]。研究表明细胞因子可以作用于肿瘤细胞,促进靶细胞凋亡或使其失去恶性增殖的特性

功能,给临床医生的治疗带来困难。目前其发生机制尚不清晰,可能由于机体细胞经细胞因子刺激后正向下一个成熟阶段转化使细胞自身非特异荧光增强而干扰细胞自身的荧光表达或细胞表面抗原表达普遍增强或降低,导致各荧光通道之间出现交叉干扰有关;有学者认为 Fc 片段通常能引起一些非特异性的结合,对抗体检测的应用不利。没有 Fc 区域的抗体片段具有能够减少非特异性结合的优点[19]。我们所检测标本的非特异荧光可能与 FcR 介导的与抗体 Fc 段非特异结合有关;T 细胞、B 细胞和 NK 细胞表面均表达 FcR[20],可能细胞因子刺激后的淋巴细胞 FcR 与抗体 Fc 段非特异结合增强,使细胞染色后出现假阳性荧光,其发生机制有待进一步研究。

由于激光共聚焦显微镜能彻底消除荧光串色的干扰。因此,实验中我们选择使用共聚焦显微镜进行检测,并且细胞的分类计数是临床常规的检测方法在临床实验室已经广泛应用。我们的试验结果显示两种检测方法对外周血淋巴细胞的分类计数差异无统计学意义($P>0.05$),激光共聚焦显微镜同样可以用于外周血淋巴细胞的分类计数。本实验尚存一定局限性,实验中我们所检测的标本例数有限,并且这种现象的发生机制尚不清晰,以期待激光共聚焦显微镜用于临床免疫功能的监测得到更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] De Visser K, Coussens L. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development [J]. Contrib Microbiol, 2006, 13: 118-137
- [2] Choi D, Kim TG, Sung YC. The past, present, and future of adoptive T

- cell therapy[J]. Immune Netw, 2012, 12(4): 139-147
- [3] Hans Martin Singh, Guy Ungerechts, et al. Gene and cell therapy for pancreatic cancer, Scand [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2015, 15(4): 505-516
- [4] Andreesen R, Hennemann B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives [J]. Journal of leukocyte biology, 1998, 64(4): 419-426
- [5] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors[J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368
- [6] Wu C, Jiang J, Shi L, et al. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2008, 28 (6B): 3997-4002
- [7] Hoffman D, Gitlitz BJ, Beldegrun A, et al. Adoptive cellular therapy [J]. In: Seminars in oncology: 2000, 221
- [8] Choi D, Kim TG, Sung YC. The past, present, and future of adoptive T cell therapy[J]. Immune Netw, 2012, 12(4): 139-147
- [9] Sangiolo D, Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors[J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368
- [10] Rutella S, Iudicone P, Bonanno G, Fioravanti D, Procoli A, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells generated with a new good manufacturing practice-grade protocol [J]. Cytotherapy 2012, 14(7): 841-850
- [11] Hontscha C, Borck Y, Zhong H, et al. Clinical trial on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 305-310
- [12] 董坚. 肿瘤生物治疗在肿瘤治疗发展中的地位 [J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(004): 1-3
- Dong Jian. Status in the development of tumor biological therapy in cancer treatment [J]. Journal of Kunming Medical College, 2010, 31 (004): 1-3
- [13] Linn Y, Lau L, Hui KI^{VI}. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts[J]. British journal of haematology, 2002, 116(1): 78-86
- [14] Hui D, Qiang L, Jian W, et al. A randomized, controlled trial of post-operative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma [J]. Digestive and Liver Disease, 2009, 41(t): 36-41
- [15] 龚非力主编. 医学免疫学[M]. 北京科学出版社, 2000: 6
- Gong Fei editor. Medical immunology [M]. Science press of Beijing, 2000: 6
- [16] Fahmi T, Esendagli G, Yilmaz G, et al. Immune compartmentalization of T cell subsets in chemically-induced breast cancer [J]. J Immunol, 2010, 172(4): 339
- [17] Matter MS, Claus C, Ochsenbein AF. CD4⁺T cell help improves CD8⁺T cell memory by retained CD27 expression[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(7): 1847
- [18] 霍霞, 吕建勋, 杨仁东, 等. 激光共聚焦显微镜与光学显微镜之比较[J]. 激光生物学报, 2001, 10(1): 76-78
- Huo Xia, Lv Jian-xun, Yang Ren-dong, et al. Comparison of laser confocal microscope and optical microscope[J]. Journal of laser biology, 2001, 10(1): 76-78
- [19] Goldstein G. Overview of the development of Orthoclone OKT3: monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation [J]. Transplant Proc, 1987, 19: 1-6
- [20] Xinrui L, Andrew W Gibson, Robert P Kimberly. Human FcR Polymorphism and Disease[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 382: 275-302
- PLoS One, 2014, 9(7): e102148
- [19] Sims MW, Winter J, Brennan S, et al. PKC-mediated toxicity of elevated glucose concentration on cardiomyocyte function [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(4): H587-597
- [20] Mehta KD. Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: A brief overview[J]. World J Diabetes, 2014, 5(3): 385-392
- [21] Su Z, Yin J, Wang T, et al. Up-regulated HMGB1 in EAM directly led to collagen deposition by a PKC β /Erk1/2-dependent pathway: cardiac fibroblast/myofibroblast might be another source of HMGB1 [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(9): 1740-1751
- (上接第 3237 页)
- [16] Yang M, Stowe DF, Udoh KB, et al. Reversible blockade of complex I or inhibition of PKC β reduces activation and mitochondria translocation of p66Shc to preserve cardiac function after ischemia[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113534
- [17] Mehta NK, Mehta KD. Protein kinase C-beta: An emerging connection between nutrient excess and obesity [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(10): 1491-1497
- [18] Deres L, Bartha E, Palfi A, et al. PARP-inhibitor treatment prevents hypertension induced cardiac remodeling by favorable modulation of heat shock proteins, Akt-1/GSK-3 β and several PKC isoforms [J].