

• 临床检验研究 •

## 强直性脊柱炎患者外周血淋巴细胞亚群分析

何元虎<sup>1,2</sup>, 吴雪梅<sup>1,2</sup>, 吴丽娟<sup>1△</sup>

(1. 成都军区总医院检验科/成都军区检验医学中心, 成都 610083;

2. 泸州医学院医学检验系 2007 级, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 了解强直性脊柱炎患者外周血淋巴细胞亚群变化规律,探讨患者体内的免疫功能状态。方法 采用三色流式细胞学检测技术分析 75 例患者及 50 例健康对照的外周血 T 细胞亚群、B 细胞与 NK 细胞水平,并对其结果进行比较分析。结果 强直性脊柱炎组总 T 细胞、T<sub>H</sub> 细胞、T<sub>S</sub> 细胞的百分含量依次为 (65.74±9.99)%、(35.70±6.92)% 和 (23.02±5.35)%; T<sub>H</sub>/T<sub>S</sub> 比值 1.70±0.51,总 T 细胞、T<sub>H</sub> 细胞、T<sub>S</sub> 细胞的绝对含量依次为 (1.25±0.63)、(0.47±0.27) 和 (0.31±0.19)×10<sup>9</sup>/L。B 细胞和 NK 细胞的百分含量分别为 (11.84±4.50)% 和 (15.43±6.28)%; B 细胞和 NK 细胞的绝对含量分别为 (0.22±0.15) 和 (0.27±0.15)×10<sup>9</sup>/L。与健康对照组比较,患者总 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞绝对含量增加 (P<0.01 或 P<0.05),但各淋巴细胞亚群的百分含量无明显改变 (P>0.05)。与腰背痛组、B27<sup>+</sup> 无临床症状组、B27<sup>+</sup> 非强直组比较,各淋巴细胞亚群的百分含量和绝对含量均略有增高,但差异无统计学意义 (P>0.05)。结论 强直性脊柱炎患者机体免疫功能存在一定程度的紊乱,且以总 T 细胞、B 细胞、NK 细胞功能亢进为特点。临床腰背痛患者、B27<sup>+</sup> 无症状者、B27<sup>+</sup> 非强直患者均表现出与临床强直患者相似的免疫功能紊乱。

**关键词:** 脊柱炎; 淋巴细胞亚群; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0141-02

## Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood in patients with ankylosing spondylitis

He Yuanhu<sup>1,2</sup>, Wu Xuemei<sup>1,2</sup>, Wu Lijuan<sup>1△</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China;

2. Medical Laboratory, Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000, China)

**Abstract:** **Objective** To study the alteration regularity of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with ankylosing spondylitis (AS), and investigate their immune functional status. **Methods** Peripheral blood lymphocyte subsets were detected by 3-color flow cytometry in 75 patients (AS group) and 50 healthy subjects (control group). The results were analyzed statistically. **Results** In AS group, the percentages of T lymphocyte, CD4<sup>+</sup> T lymphocyte and CD8<sup>+</sup> lymphocyte as well as the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were (65.74±9.99)%, (35.70±6.92)%, (23.02±5.35)% and 1.70±0.51, and the absolute quantities of T lymphocyte, CD4<sup>+</sup> T lymphocyte and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte were (1.25±0.63), (0.47±0.27) and (0.31±0.19)×10<sup>9</sup>/L. The percentages of B lymphocyte and NK lymphocyte were (11.84±4.50)% and (15.43±6.28)%, and the absolute quantities of each of them were (0.22±0.15) and (0.27±0.15)×10<sup>9</sup>/L. Compared with the control group, the absolute quantities of T lymphocyte, B lymphocyte and NK lymphocyte in AS group were significantly higher (P<0.01 or P<0.05), but according to percentage of different cells, there was no statistical difference (P>0.05). Compared with lumbodorsal pain group, group positive with B27 but negative with clinical symptom and non-AS group positive with B27, the percentages and absolute quantities of all lymphocyte subsets in AS group were clearly higher, but with no significant difference (P>0.05). **Conclusion** There might be immune function disorder in patients with AS. In lumbodorsal pain patients, patients positive with B27 but negative with clinical symptom and non-AS patients positive with B27, there could be similar immune function disorder.

**Key words:** myelitis; lymphocyte subsets; flow cytometry

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种多发于青壮年男性的慢性、进行性、临床主要以骶髂关节及中轴关节病变为特征的脊柱关节炎疾病,属自身免疫性疾病类型。该病伴常染色体隐性遗传,有明显的家族聚集发病趋势<sup>[1-2]</sup>,大多起病缓慢而隐匿,致残率甚高。AS 在中国的患病率约为 0.3%,而在全世界的总患病率高达 0.9%<sup>[3]</sup>。曾经 AS 的诊断主要依靠临床症状、体征及 X 线检查,但因与类风湿性关节炎、骨关节炎等疾病的表现十分相似,几乎不能将之与这些疾病鉴别开来。近年来,因发现 AS 与人类白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 具有高度相关性<sup>[1,4]</sup>,目前临床多采取检测 HLA-B27 表达的方式作为早期诊治与鉴别诊断 AS 的依据。为了

探讨 AS 患者的细胞免疫功能,作者采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测 HLA-B27 表达对患者和体检人员进行分组,对 AS 患者、临床腰背痛患者、B27<sup>+</sup> 无临床症状者、B27<sup>+</sup> 非 AS 患者和 B27<sup>-</sup> 健康人群的外周血淋巴细胞亚群进行了测定和分析,拟通过外周血淋巴细胞亚群的变化规律,探讨 AS 患者的免疫功能改变,阐述该疾病可能的免疫发病新机制。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 全部病例共 75 例,均为本院 2009 年 5 月至 2011 年 12 月的门诊及住院患者,其中 AS 组 33 例,男 27 例,女 6 例,年龄 14~48 岁,平均 29.58 岁,患者均有明确的临床症状、体征和 X 线改变;腰背痛组 33 例,男 23 例,女 10 例,年

龄 15~48 岁,平均 32.84 岁,包括单纯腰背痛 20 例,腰背痛合并多部位骨关节炎 13 例;B27<sup>+</sup> 无临床症状组 5 例,男 2 例,女 3 例,年龄 4~40 岁,平均年龄 28.6 岁;B27<sup>+</sup> 非 AS 疾病组 4 例,男 3 例,女 1 例,年龄 22~61 岁,平均年龄 43 岁,包括右眼化学伤、食道癌、多部位骨关节炎和肺癌各 1 例;对照组 50 例为同期健康体检人员,B27 均为阴性,男 23 例,女 27 例,年龄 19~91 岁,平均年龄 45.57 岁。

**1.2 标本采集** 清晨采集静脉血 2~3 mL,EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝(紫头真空采血管),立即检验。

**1.3 流式 T 细胞亚群、B 细胞与 NK 细胞检测** 采用双平台法三色流式细胞术,以 SSC/FSC 设门淋巴细胞,分析总 T 细胞(CD3<sup>+</sup>)、T<sub>4</sub> 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、T<sub>8</sub> 细胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)、B 细胞(CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)、NK 细胞(CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>)的百分含量

和绝对含量,并计算 T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> 细胞比值。全部试剂(如同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5,测定抗体 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5/CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>-PE/CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-PE、标本预处理试剂等)均为美国 BECKMAN-COULTER 公司产品,仪器采用 BECKMAN-COULTER XL4-MCL 型流式细胞仪。具体检测方法参照文献[5]。

**1.4 统计学处理** 所有统计学处理均采用 SPSS13.0 软件进行,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,百分数的组间比较采用方差分析,计量资料组间比较采用 *t* 检验。

**2 结 果**

外周血淋巴细胞亚群的百分含量检测结果,见表 1。外周血淋巴细胞亚群绝对含量检测结果,见表 2。

表 1 外周血淋巴细胞亚群的百分含量检测结果(% , $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	B27 <sup>+</sup>	B27 <sup>+</sup> MnX	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub>	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> / CD56 <sup>+</sup>
A	32	79.82±19.87	7.30±2.50	65.74±10.00	35.69±6.92	23.02±5.35	1.70±0.51	11.84±4.70	15.43±6.28
B	32	10.07±9.72	1.61±0.41	70.62±8.10	36.85±9.86	25.68±4.91	1.53±0.54	10.42±3.27	14.89±6.68
C	5	93.26±3.40	7.18±1.48	64.78±7.09	30.75±2.35	28.15±3.60	1.12±0.17	11.63±5.33	16.15±8.82
D	6	79.30±10.40	5.60±3.44	63.74±3.80	31.38±4.97	22.18±2.59	1.50±0.48	7.46±2.31	26.16±8.41
E	50	4.94±4.93	1.41±0.36	0.79±0.36	35.81±7.53	0.21±0.11	1.69±0.71	10.01±3.21	17.18±5.94

A:AS 组,B:腰背痛组,C:B27<sup>+</sup> 非 AS 组,D:B27<sup>+</sup> 非 AS 组,E:B27<sup>-</sup> 对照组,B27<sup>+</sup> MnX 为淋巴细胞表达 HLA-B27 的荧光强度值。

表 2 外周血淋巴细胞亚群绝对含量检测结果( $\times 10^9/L$ , $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	B27 <sup>+</sup>	B27 <sup>+</sup> MnX	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub>	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> / CD56 <sup>+</sup>
A	32	0.91±0.50	7.30±2.50	1.23±0.62	0.47±0.27	0.31±0.19	1.70±0.51	0.22±0.15	0.27±0.15
B	32	0.13±0.14	1.61±0.41	1.13±0.41	0.43±0.20	0.30±0.15	1.53±0.54	0.16±0.07	0.23±0.13
C	5	1.38±1.00	7.18±1.48	1.50±1.00	0.47±0.34	0.45±0.37	1.50±0.48	0.21±0.11	0.37±0.29
D	6	0.74±0.14	5.60±3.44	1.00±0.27	0.32±0.14	0.20±0.03	1.12±0.17	0.10±0.01	0.38±0.15
E	50	0.03±0.03	1.41±0.36	0.79±0.36	0.30±0.16	0.21±0.11	1.69±0.71	0.21±0.11	0.19±0.11

A:AS 组,B:腰背痛组,C:B27<sup>+</sup> 非 AS 组,D:B27<sup>+</sup> 非 AS 组,E:B27<sup>-</sup> 对照组,B27<sup>+</sup> MnX 为淋巴细胞表达 HLA-B27 的荧光强度值。

将 AS 组与腰背痛组比较,AS 组总 T 细胞、T<sub>4</sub> 细胞、T<sub>8</sub> 细胞百分含量略为下降,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> 比值略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );总 T 细胞、T<sub>4</sub> 细胞和 T<sub>8</sub> 细胞绝对含量均略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );B 细胞、NK 细胞百分含量与绝对含量均略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。将 AS 组与 B27<sup>+</sup> 无临床症状组比较,AS 组总 T 细胞、T<sub>4</sub> 细胞、T<sub>8</sub> 细胞百分含量与绝对含量均略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> 比值略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );B 细胞百分含量与绝对含量略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );NK 细胞绝对含量略为降低,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),NK 细胞百分含量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。将 AS 组与 B27<sup>+</sup> 非 AS 疾病组比较,AS 组总 T 细胞、T<sub>4</sub> 细胞百分含量与绝对含量均略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>8</sub> 细胞百分含量略为降低,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>8</sub> 细胞绝对含量略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> 比值略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );B 细胞百分含量与绝对含量均略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );NK 细胞百分含量与绝对含量均略为降低,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。将

AS 组与 B27<sup>-</sup> 健康对照组比较,AS 组总 T 细胞百分含量、T<sub>4</sub> 细胞绝对百分含量与绝对含量、T<sub>8</sub> 细胞百分含量与绝对含量略有改变,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> 比值略为升高,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但总 T 细胞绝对含量明显升高且差异有统计学意义( $P<0.05$ );B 细胞百分含量略为升高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),NK 细胞百分含量略为降低,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但 B 细胞绝对含量明显升高,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),NK 细胞绝对含量也明显升高,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。上述结果表明,AS 患者体内存在明显的免疫功能紊乱,表现出总 T 细胞、B 细胞、NK 细胞绝对含量的增加,提示机体细胞免疫功能增强。

**3 讨 论**

近年来,AS 发病机制的研究进展越来越提示人们该病与患者自身免疫功能的异常密切相关<sup>[1,5]</sup>,但是截至目前人们仍然不清楚究竟是怎样的免疫异常导致了 AS 的发生。以患者外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达水平对 AS 及临床常见与之相关的疾病进行分类,分别回顾性统计了患者及健康人群外周血淋巴细胞亚群的流式检测结果,对数据的比对研究发现 AS 患者外周血总 T 细胞、B 细胞绝对含量明显增(下转第 145 页)

其绝对含量保持正常;也可以是百分含量正常,绝对含量升高或降低;还可以是百分含量与绝对含量同时升高或降低。因此,只有同时检测淋巴细胞亚群的百分含量和绝对含量才能全面、客观反映机体的免疫功能状态。为此,作者建议一个规范的流式淋巴细胞亚群检验报告,必须先同时报告淋巴细胞亚群的百分含量和绝对含量。

流式单平台绝对计数法是指技术上只依赖流式细胞仪一个分析平台而完成的细胞定量分析,流式双平台绝对计数则是指需要依赖流式细胞仪和血细胞计数仪两个分析平台才能完成的细胞定量分析。单平台法定量的原理在于向反应体系中加入已知浓度的标准荧光微球,单位时间内流式细胞仪计数的标准荧光微球与计数的待测细胞数量之间存在确定的比例关系,根据标准荧光微球的浓度即可计算出待测细胞的浓度<sup>[3]</sup>。双平台法则利用血细胞计数仪在全血有核细胞计数(白细胞计数)上的成熟技术优势和成熟质量控制措施,首先测定全血标本中有核细胞(白细胞计数)的绝对含量,再利用流式细胞仪在细胞分群上的技术优势,获得待测细胞群在全部有核细胞中的百分比,计算待测细胞的绝对含量。由于流式细胞术目前还未实现全程自动化,还需要用手工方法加样试剂、血液标本并做上机前的红细胞裂解操作等,手工加样和处理环节多,误差较难掌控。双平台法在全血有核细胞绝对计数阶段实现了全程自动化,无手工操作环节,而流式检测阶段只需提供细胞的百分含量的这种“比例性”指标,加样量的多与少并不影响比例的测定,于是规避了单平台法的误差,结果反而更加稳定和精密。本文结果表明,双平台法和单平台法虽然在检测结果的统计学比较上并无差异,但是其检测数据的变异系数均较单平台法低,有力证实了双平台法优于单平台法的事实。但是,流式双平台法分析淋巴细胞亚群绝对含量的变异系数仍然较高,除 SP-T 细胞外,其余项目的变异系数在 4.5%~9.0%,说明流式分析的方法学还有很大改进空间,还达不到精细分析的要求(一般地,要求检验分析的变异系数在 5.0%以内,精细分析的变异系数在 2.0%以内)。同时,流式检验这种“高复杂性实验

(上接第 142 页)

高,同时患者外周血 NK 细胞绝对含量也明显增高,表明强直性脊柱炎患者存在不同程度的以 T 细胞、B 细胞数量增高为特点的特异性细胞免疫功能亢进和以 NK 细胞数量增高为特点的非特异性免疫功能增强。是 AS 患者淋巴细胞高表达 HLA-B27 引起体内免疫功能紊乱进而导致患者脊柱关节炎改变,还是体内免疫功能的先期异常引起淋巴细胞对 HLA-B27 表达的异常应答,进而导致患者脊柱关节炎改变,目前尚不能推断,也无合适的证据加以鉴别。此外,还发现临床腰痛患者存在与 AS 患者相似的免疫异常情况,B27<sup>+</sup>无症状者免疫功能也已经开始出现一定的免疫异常。遗憾的是 B27<sup>+</sup>非 AS 组各项测定值与 AS 组比较时差异无统计学意义,推测可能与观察病例数太少有关,还需要增加病例数以鉴别。

另外,流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群、B 细胞和 NK 细胞即可作为 AS 患者免疫功能检测的手段,也可用于病情判断和疗效监测。对不同临床分期的 AS 患者进行大规模外周血淋巴细胞亚群检测,动态分析患者淋巴细胞亚群的变迁规律,适时掌握患者体内的免疫功能状态,仍然是十分必要的。

参考文献

[1] Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylar-

测试类别”,对技术人员的技术水平和培训也提出了更高要求,只有推行严格的标准化操作才能缩小不同医院、不同检验员对检验结果带来的影响<sup>[5]</sup>。

另外,单平台法需要购买标准荧光微球,该类试剂价格昂贵,单人份成本是血常规检验成本的数倍,经济上很不合算。临床上,医师在申请淋巴细胞亚群检测时往往都同时申请了血常规检验,本室统计发现,流式淋巴细胞亚群检测标本中没有同时申请血常规检验的标本仅占 20.0%~30.0%。从临床的角度出发,同时检测血常规和流式淋巴细胞亚群,医师既掌握了白细胞的总体情况,又了解了淋巴细胞亚类的变化,病情掌握会更准确。

总之,单平台和双平台流式淋巴细胞亚群绝对计数检测均可用于临床检验;对于综合性医院检验科,建议尽量采用双平台法;对于实验室或研究室,由于缺乏血常规分析平台的支持,可以采用单平台法。

参考文献

[1] Cherian S, Levin G, Lo WY, et al. Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(5): 319-328.  
 [2] Lovvorn AE, Patnaik P, Walker CJ, et al. Variations in CD4 cell counts among HIV-uninfected and infected women in Uganda and Zimbabwe[J]. *Int J STD AIDS*, 2010, 21(5): 342-345.  
 [3] Nantakomol D, Nuchnoi P, Noulstri E, et al. Enumeration of the absolute CD4 T-lymphocyte count by cell-bead assay[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 260-266.  
 [4] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010;81,86-87,121,126.  
 [5] 吴丽娟,许东升. 流式细胞术表型分析的质量控制[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 389-394.

(收稿日期:2011-08-11)

thro pathiesin HLA B27 positive and negative-blood donors[J]. *Arthrits Rheum*, 1998, 41(1): 58-67.

[2] Santos FP, Bastos E, Ligeiro D, et al. Genetic basis of ankylosing spondylitis[J]. *Acta Reumatol Port*, 2007, 32(3): 243-252.  
 [3] 刘进子,马春梅,董淑婷,等. 强脊壮督颗粒联合抗炎药治疗强直性脊柱炎 102 例临床观察[J]. *河北医药*, 2008, 30(12): 1997-1998.  
 [4] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:491-493.  
 [5] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:78-88.  
 [6] Olivieri I, D'Angelo S, Cutro MS, et al. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis may give the typical postural abnormalities of advanced ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(11): 1709-1711.

(收稿日期:2011-12-08)