

biotic therapy: a systematic review and meta-analysis[J]. J Hosp Med, 2013, 8(5): 530-540.

[2] Matthaiou DK, Ntani G, Kontogiorgi M, Poulakou G, et al. Dimopoulos. An ESICM systematic review and meta-analysis of procalcitonin-guided antibiotic therapy algorithms in adult critically ill patients[J]. Inten Care Med, 2012, 38(8): 940-949.

[3] Abiodun EM, Aisha KG. Nucleic acid testing-benefits and constraints[J]. Asian J Transfus Sci, 2014, 8(1): 47-50.

[4] Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79(16): 1605-1608.

[5] 郭卫红, 宋宏先, 安艳芳. 血清降钙素原的测定及在临床中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 123-125.

[6] Hohn A, Schroeder S, Gehrt A, et al. Procalcitonin-guided algorithm to reduce length of antibiotic therapy in patients with severe

sepsis and septic shock[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(2): 158.

[7] Ruiz-Rodríguez JC, Caballero J, Ruiz-Sanmartin A, et al. Usefulness of procalcitonin clearance as a prognostic biomarker in septic shock. A prospective pilot study[J]. Med Inten, 2012, 36(4): 475-480.

[8] Tschakowsky K, Hedwig-Geissling M, Braun GG, et al. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis[J]. J Crit Care, 2011, 26(1): 54-64.

[9] Schuetz P, Maurer P, Punjabi V, et al. Procalcitonin decrease over 72 hours in US critical care units predicts fatal outcome in sepsis patients[J]. J Crit Care, 2013, 17(3): 115-117.

(收稿日期: 2014-06-30)

• 经验交流 •

Th1、Th2 及 Th17 细胞因子谱在 269 例健康儿童中的表达分析

刘 怡, 梁 静, 刘曙光, 张瑞东

(首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心, 北京 100045)

摘要:目的 通过检测健康儿童不同年龄段血清中 7 种细胞因子水平, 从而获得研究不同疾病状态下 7 种细胞因子变化的参照。**方法** 采用流式细胞仪微球芯片(cytometric bead array, CBA)技术和 Th1、Th2 及 Th17 细胞因子 CBA 分析试剂盒检测 269 例健康儿童血清中的 7 种细胞因子(IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN- γ 以及 IL-17A)水平。**结果** Th1 细胞分泌的 IL-2 及 TNF 在婴儿期及学龄期呈高表达趋势, 在学龄前期和青春早期呈低表达趋势, 且 IL-2 表达水平均高于 TNF; Th2 细胞所分泌的 IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN- γ 及 Th17 细胞 IL-17A 在不同年龄段表达水平未见明显变化趋势。只有 IL-10、IFN- γ 的表达在青春早期不同性别存在统计学差异, 其他年龄段不同性别的细胞因子分泌均未见统计学差异。**结论** 采用 CBA 技术同时检测 7 种细胞因子具有所需样本量少、快速、简便的优点。建立健康儿童不同年龄段血清细胞因子谱表达水平, 对于检测儿童疾病状态下细胞因子水平变化的具有重要意义。

关键词: 细胞因子; 流式细胞术; 儿童

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 23. 059

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)23-3275-03

细胞因子是由活化的免疫细胞合成分泌的, 具有广泛调节细胞功能作用的多肽分子, 它们与免疫细胞表面受体结合, 参与细胞及体液免疫。主要包括淋巴因子、干扰素(IFN)、白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)、趋化因子和集落刺激因子等。辅助 T 淋巴细胞中的 Th1 细胞主要分泌 IL-2、TNF- β 、IFN- γ , 参与细胞免疫; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等因子, 参与体液免疫。Th17 细胞是由初始 T 细胞前体分化而来, 分泌 IL-17 细胞因子, 参与介导炎症反应、自身免疫性疾病的发生和发展。细胞因子在疾病中发挥重要调节作用, 它们不仅作用于免疫系统和造血系统, 还广泛作用于神经、内分泌系统, 对细胞间相互作用、细胞的增殖分化和效应功能有重要的调节作用。本研究以 269 例 30 d 至 16 岁健康儿童为研究对象, 进行年龄段细化分组, 应用流式细胞仪微球芯片(CBA)技术, 对其静脉血清中细胞因子水平进行测定, 以期应用快捷简便的方法对儿童细胞因子进行检测, 并为制定适用于不同年龄段儿童细胞因子检测的正常参考值提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 4 月 1 日至 2011 年 8 月 31 日在北京儿童医院儿童保健门诊无感染征象的行健康体检的 269 例儿童, 男 218 例(81.0%), 女 51 例(19.0%), 年龄 30 d 至 16 岁。所有体检儿童外周血常规检查、胸部 X 线、肝肾功均正常。根据年龄分为 5 组: 婴儿组(30 d 至 1 岁)、幼儿组(1~3 岁)、学龄前组(3~7 岁)、学龄组(7~12 岁)、青春早期组(>

12 岁)。

1.2 仪器、试剂 双激光四色多参数流式细胞仪(BD FACS-Calibur)。Th1/Th2/Th17 细胞因子 CBA 分析试剂盒(美国 BD 公司)。

1.3 方法 流式细胞仪微球芯片技术检测健康儿童血清中 7 种细胞因子水平: 不抗凝血液 2 mL, 待血液凝固后, 3 000 r/min, 离心 5~10 min, 得到血清。制备人 Th1/Th2/Th17 细胞因子标准品: 将标准品小球放入流式管中, 加入 2 mL 分析稀释液制备成原液, 轻轻混匀, 静置 15 min。取 9 支流式管作为标准曲线, 每管加入 300 μ L 分析稀释液, 取原液 300 μ L 加入 1 号管中, 依次进行倍比稀释。混合人 Th1/Th2/Th17 细胞因子捕获微球: 确定实验管数, 为保证每个实验管都含有 7 种微球, 每种捕获微球需各取 10 μ L, 将 7 种微球混在一起。标本染色孵育: 所有实验管每管各加入 50 μ L 混合好的捕获微球, 加入 50 μ L 人 Th1/Th2/Th17 PE 检测试剂; 标准曲线管中每管加入 50 μ L 梯度稀释好的标准品; 样本管中每管加入 50 μ L 待测样本。所有实验管室温避光孵育 3 h 后, 每管加入 1 mL 洗液(F 液), 1 500 r/min, 离心 5 min。弃去上清液, 每管加 300 μ L 洗液(F 液)准备上机。用流式细胞仪调整微球做仪器条件设置: 取 3 个试管(A、B、C), 分别向管中各加入 50 μ L 仪器调整微球; B 管中加入 FITC 阳性对照 50 μ L, C 管中加入 PE 阳性对照 50 μ L。将上述 3 管避光 30 min, A 管加入洗液 450 μ L, B、C 管加入洗液 400 μ L。应用 BD CellQuest 软件和 CBA

获取模板,分别应用 A、B、C 管调节获取状态。获取标准品、样本及数据分析;在调节好的获取状态下获取标准品曲线,将标准品浓度和对应的荧光强度做定量标准曲线,进而根据样本检测的荧光强度得到检测浓度。满足标准曲线相关系数 $r^2 \geq 0.999$,这样最大限度的保证了定量分析结果的准确性。在同等获取条件下检测样本并进行数据分析。

1.4 统计学处理 两组间均数比较采用独立样本 t 检验。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 269 例不同年龄组不同性别健康儿童分组情况见表 1。

表 1 269 例正常儿童分组情况

年龄分组	n	性别	
		男	女
婴儿组	18	11	7
幼儿组	64	56	8
学龄前组	115	93	22
学龄组	41	35	6
青春期组	31	23	8

2.2 各年龄组不同性别细胞因子表达水平比较见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。青春期组男女儿童 IL-10 和 IFN- γ 表达水平 P 值分别为 0.049 和 0.033,差异有统计学意义,其他年龄组不同性别所表达细胞因子差异均无统计学意义。

2.3 不同性别各年龄组细胞因子表达进行组间比较见表 3、4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。除女童组 IL-4、IL-6、TNF、IL-17A 未见统计学差异外,男童和女童多个细胞因子在多个年龄组间差异有统计学意义,但未见明显规律性变化。

2.4 各年龄组 Th1、Th2 细胞以及 Th17 细胞相关细胞因子谱表达水平变化趋势见图 1。经分析显示:IL-2 表达水平在 4~16 pg/mL 之间,各年龄段的表达普遍高于其他阶段细胞因子,且在婴儿期及学龄期表达分别在 16~18 pg/mL 及 14~16 pg/mL。从幼儿期到学龄前期及青春期均呈下降至 4~6 pg/mL。IFN 表达范围在 2~4 pg/mL 之间,也存在婴儿期及学龄期表达水平增高,学龄前期及青春期呈下降的特点,这 2 种细胞因子均有 Th1 细胞所分泌。其他细胞因子变化趋势:IL-4、IL-10 及 IL-17A 均在 0.8~4.0 pg/mL 范围内;IL-6、IFN- γ 在 0.7~2.0 pg/mL 范围内。

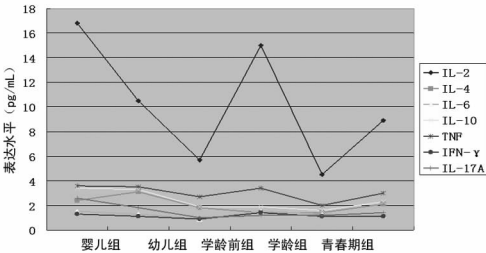


图 1 各年龄组健康儿童 Th1、Th2 细胞以及 Th17 细胞相关细胞因子谱表达水平趋势图

2.5 鉴于细胞因子表达在各年龄组间显著差异,在不同性别间差异未见明显规律性,故整理正常儿童不同年龄段细胞因子

表达参考值见表 5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

本研究采用的是流式细胞仪微球芯片 (cytometric bead array, CBA) 技术。其原理是利用流式细胞仪通过已知大小和荧光强度的微球捕获单个或多个可溶性分析物,达到样本中多种可溶性蛋白同时定量检测的目的。此种技术相的优势是有:7 种分析物同时检测,样品用量少,操作简便,节省时间;微球捕获分析物的方法,检测误差小,精密度高;标准曲线自动检测,软件自动计算,检测范围广;使用灵敏的荧光强度检测方法,没有酶-底物背景干扰。

近年来细胞因子的研究成为医学领域的热点。机体内各种免疫细胞维持正常免疫功能,尤其是 T 淋巴细胞亚群间依靠相互制约以维持动态平衡。根据辅助 T 淋巴细胞所分泌的不同种类的细胞因子,可分为 Th1 和 Th2。Th1 细胞主要分泌的因子有:白介素 2(IL-2)、干扰素 (IFN) 和肿瘤坏死因子 β (TNF- β),主要功能是促进调控细胞的活化、分化和增殖,参与细胞免疫调节功能,并对机体内抗肿瘤免疫反应发挥着重要的作用^[1-3]。同时 Th1 细胞还能有效地刺激和介导巨噬细胞活化以及迟发性超敏反应,可清除细胞内寄生菌的感染。Th2 细胞主要分泌:IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等因子,参与体液免疫应答,其中 IL-4 促进 B 细胞分化成熟和增殖, IgE 的分泌参与变态反应。Th17 细胞是由初始 T 细胞前体分化,具有独立的分化和发育调节机制,分泌 IL-17 细胞因子,介导炎症反应,在自身免疫性疾病、肿瘤和移植排斥等疾病的发生、发展中发挥重要调节作用。正常情况下 Th1 和 Th2 细胞因子之间有互相制约和协调的作用,在两者之间只有保持动态平衡的状态下才能完成正常的免疫应答。若发生 Th1、Th2 的平衡失控, Th1 向 Th2 偏移时,机体免疫状态发生改变,而造成免疫状态异常,从而导致包括肿瘤细胞的发生及生长^[4-5],以及其他多种疾病的产生。近年来众多研究显示, Th1、Th2 的失衡与多种疾病,如白血病^[6]、多种肿瘤^[7]、感染相关性疾病^[8]、自身免疫性疾病^[9]、变态反应性疾病^[10] 的发病机制相关。

儿童从婴幼儿到青春期处于生长发育阶段,其免疫状态亦不同。目前国内尚无有关健康儿童不同年龄段细胞因子表达的研究。本研究显示:Th1 细胞所分泌的 IL-2 表达水平具有明显的年龄变化趋势,在婴儿期及学龄期呈现高峰趋势。从幼儿期到学龄前期及青春期均呈下降趋势。IFN 亦有此特点,但其总体表达水平低于 IL-2。其他各细胞因子变化趋势略有不同,总体表达未见明显趋势变化。本研究通过应用流式细胞仪微球芯片技术,分析不同年龄段健康儿童 Th1、Th2 和 Th17 细胞因子的表达水平,以求将此技术应用于临床来探讨细胞因子在各种儿童疾病中所发生的改变,更有效地为临床提供实验依据。

参考文献

[1] Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9(4): 532-562.

[2] Becker Y. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers-a review, hypothesis and implications[J]. Anti-cancer Res, 2006, 26(11): 1113-1114.

[3] Lan Q, Zheng T, Rothman N, et al. Cytokine polymorphisms in the Hh1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma[J]. Blood, 2006, 107(40): 4101-4108.

[4] 许承斌,柴晓文. Th1/Th2 细胞的免疫功能变化与抗肿瘤免疫[J]. 现代诊断与治疗,2009,20(3):162.

[5] Yothda P, Mintz P, Grigoriadou K, et al. Analysis of T-cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Exper Hematol, 1999, 27(12):1375-1383.

[6] Nakase K, Kita K, Shirakawa S, et al. Induction of cell surface interleukin-2 receptor alpha chain expression on immature acute myelocytic leukemia cell[J]. Leuk Res, 1994, 18(8):855-859.

[7] 胡永生,张庆林,田志刚,等. 脑胶质瘤 Th1/Th2 类细胞因子的漂移及意义[J]. 中华外科杂志,2001,39(1):92.

[8] 胡章勇,章廉,文维,等. 慢性乙型肝炎病人 Th1/Th2 细胞因子应答状况[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2001,21(1):8.

[9] 王国兵,李成荣,李长钢,等. 儿童急性 ITP Th1/Th2 细胞功能状态初步研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2008,13(2):156-160.

[10] Grutta SL, Richirsa P, Pizzolanti G, et al. CD4⁺ IL-13⁺ cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopidermatitis in children[J]. Allergy, 2005, 60(3):391-395.

(收稿日期:2014-06-03)

• 经验交流 •

EDTA-K₂ 抗凝剂依赖性血小板减少的分析与解决方案

刘爱华

(泰州市姜堰区城中社区卫生服务中心检验科, 江苏泰州 225500)

摘要:目的 对临床 EDTA 依赖性血小板假性减少症(EDTA-PTCP)样本采用不同的方法进行检测,为 EDTA-PTCP 寻找一种可靠的检测血小板的方法,从而寻找一种 EDTA-PTCP 的有效的处理方法和手段,为实验室工作提供依据。方法 针对检验工作中遇到的 EDTA-PTCP 样本,分别采用手工法、EDTA-K₂、枸橼酸钠、EDTA-K₂ + 氟化钠(NaF)方法对 EDTA-PTCP 进行检测,分析比较 3 种方法的检测效果。结果 临床检验工作中,部分血小板减少是由于 EDTA-K₂ 导致血小板聚集引起的。针对临床血小板减少的样本需进行复查,复查方法可采用手工法、枸橼酸钠、EDTA-K₂ + 氟化钠(NaF)方法均可,如果采用枸橼酸钠抗凝复检时,需在 10 min 内完成检测。结论 各实验室可针对具体情况选择适合的复查方法。

关键词:乙二胺四乙酸二钾; 抗凝剂; 血小板减少

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 23. 060 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)23-3277-03

血小板计数是临床常规检测项目,其对临床疾病的诊断、疗效观察有着非常重要的指导价值。在临床检验中,血小板假性降低常造成临床的误诊、误治,给患者及其家庭造成极大的精神和经济的负担。

目前,临床检验工作中,最常用的血小板计数为仪器法,国际血液学标准委员会(ICSH)推荐使用的抗凝剂是乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)。在一些特殊情况下,EDTA-K₂ 可以引起血小板的聚集,从而导致血小板检测结果的偏低,即 EDTA 依赖性血小板假性减少症(EDTA-dependent pseudothrombocytopenia, EDTA-PTCP)。EDTA-PTCP 的出现,如果检验科不能很好的处理,会给临床造成很大的困扰^[1-2]。

EDTA-PTCP 的发生原因极其复杂,据报道肿瘤、自身免疫疾病、败血症、抗血小板治疗的患者以及样本在低温环境下,均可能发生 EDTA-PTCP^[3]。EDTA-PTCP 发生率极低,临床报道发生率大约为 0. 09%~0. 20%^[4], EDTA-PTCP 发生本身并无任何病理学意义,但一旦发生极易造成误诊、误治,给临床诊治带来很大的麻烦,甚至有的严重患者会出现不必要的 PLT 输注。因此,及时发现 EDTA-PTCP,与其他原因引起的小血小板减少进行鉴别,并及时处理,为临床提供准确的检测结果,非常重要。

在我国使用 EDTA-K₂ 抗凝血分析血常规时间还不长,对 EDTA 依赖性血小板假性减少的原因分析和解决办法的相关报道约 50 多篇,多为个案报道。而选择的处理方法也较多,有采用枸橼酸钠抗凝重新检测,有的在 EDTA-K₂ 抗凝剂中加入 NaF 的方法重新检测,得到结论也不一致。有报道认为 EDTA-PTCP 用枸橼酸钠抗凝后,有 72% 的病例还存在血小板聚集^[5]。也有部分报道认为枸橼酸钠抗凝对血小板检测结果无影响^[6-7]。徐志明等^[8]认为,对 EDTA-PTCP 可采用在 EDTA-K₂ 抗凝剂中加入 NaF 的方法加以处理,可达到较好的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年血常规检测工作中发现的血小板减少样本共计 26 例,通过血涂片分析,有血小板聚集的样本 6 例,将定为 EDTA-PTCP,其中 4 例为健康体检人员,男女各 2 例,查其病史,均无血小板减少症病史,皮肤黏膜均无出血症状。另 2 例为住院患者,1 例为女性,65 岁,病案号 20130169,诊断为慢支肺气肿。1 例为男性,74 岁,病案号 20130495,诊断为糖尿病。2 例均无临床出血倾向。涂片中未出现聚集的样本 20 例,定为非 EDTA-PTCP 样本。20 例血小板减少患者中有 8 例为门诊患者,12 例为住院患者,20 例患者均有引起血小板减少的各种病史。

1.2 仪器与试剂 迪瑞 BF6800 全自动血细胞分析仪,EDTA-K₂ 抗凝真空管和枸橼酸钠抗凝真空管均由湖南省浏阳市医用器具厂生产。迪瑞 BF6800 血细胞分析仪配套试剂,全血质控品由长春迪瑞公司生产,各批次检测的室内质控结果均在控。

氟化钠配制:将氟化钠 0. 5 g 溶于 10 mL 双蒸馏水,过滤后取 100 μL 置于 EDTA-K₂ 真空管中,使其在血中的终浓度为 5 g/L。草酸胺稀释液配制:按照第 3 版《全国临床检验操作规程》配制^[9]。

1.3 方法 由于病例血小板值已达危急值,立即联系临床医生沟通病情,并将抗凝血进行瑞氏染色镜检,排除分析前多种因素影响,重新规范采集标本进行复检。复检方法如下:

仪器全血法:采静脉血 2 mL 分别置于含 EDTA-K₂ 抗凝管、枸橼酸钠抗凝、EDTA-K₂ + NaF 管中振荡、混匀,上机检测。

手工法:同时取静脉血 20 μL,加到装有 0. 38 mL 的草酸胺稀释液试管中振荡、混匀,待 5 min 完全溶血后,再次混匀,冲池、计数。