

• 论 著 •

克拉玛依地区维吾尔族和汉族健康成人 T 淋巴细胞亚群绝对计数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值研究*

冯 琴¹, 杜 刚², 杨桂英², 张丽娟¹, 袁新荣¹, 朱善军^{1△}

(1. 克拉玛依市第二人民医院, 新疆克拉玛依 834009; 2. 克拉玛依市中心医院, 新疆克拉玛依 834000)

摘 要:目的 调查克拉玛依地区维吾尔族和汉族健康成人的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 计数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 为该地区相关疾病的诊断、治疗及预后指导提供依据。方法 选取 181 例健康成人, 留取静脉全血, 采用细胞芯片定量检测技术检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞, 比较维吾尔族与汉族健康成人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 绝对值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值的参考范围。结果 除了 CD8⁺ 计数均值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值在两族间差异无统计学意义($P>0.05$)外, CD3⁺、CD4⁺ 计数均值在维吾尔族和汉族间差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 CD4⁺ 诊疗标准的设立应重视地域和生活环境的差异, 按种族设立不同正常参考值范围对诊断疾病有较大意义。

关键词: CD3⁺; CD4⁺; CD4⁺/CD8⁺ 比值; 维吾尔族; 汉族

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)22-3227-03

Investigation on T-lymphocyte subsets absolute counting and CD4⁺/CD8⁺ ratio in healthy adults of Uygur and Han nationalities in Karamy*

Feng Qin¹, Du Gang², Yang Guiying², Zhang Lijuan¹, Yuan Xinrong¹, Zhu Shanjun^{1△}

(1. the Second People's Hospital of Karamy, Karamy, Xinjiang 834009, China;

2. the Center Hospital of Karamy, Karamy, Xinjiang 834000, China)

Abstract: Objective To built the reference range of peripheral blood T-lymphocyte subsets including CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio in healthy adults of Uygur and Han nationalities and to provide basis for the diagnosis, therapy and prognosis of disease. **Methods** A total of 181 blood samples were collected from healthy adults. The cell chip quantitative detection technology was used to detect CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺, CD3⁺, CD4⁺ absolute value, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio were compared between Uygur and Han nationalities. **Results** CD8⁺ absolute counting and CD4⁺/CD8⁺ ratio had no significant difference between Uygur and Han nationalities($P>0.05$), while the CD3⁺, CD4⁺ absolute counting had significant difference($P<0.05$). **Conclusion** The discrepancy of territory and living environment should be taken into account for building a reference values of CD4⁺.

Key words: CD3⁺; CD4⁺; CD4⁺/CD8⁺ ratio; Uygur nationality; Han nationality

T 淋巴细胞是人体免疫防御系统中最重要的组成部分, 机体内多种免疫反应都是由细胞免疫主导, 临床及时了解 T 淋巴细胞亚群数值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值可判断机体细胞免疫水平, 对肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病, 特别是对患者免疫功能和艾滋病疗效判断有重要价值。本研究采用细胞芯片(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞)定量检测技术, 应用 BM2000 型全自动可视化细胞检测仪, 对维吾尔族与汉族健康成人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 绝对值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值的参考范围和差别原因进行了初步探索。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1~12 月来本院体检的健康人 181 例, 其中汉族 91 例, 维吾尔族 90 例。年龄 20~60 岁, 平均(37.4±8.0)岁。排除标准: (1) HIV 感染患者; (2) 近期使用过对免疫系统有影响的药物患者。纳入标准: (1) 近期无甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流感病毒等病毒与细菌感染; (2) 无慢性器质性疾病; (3) 血压正常; (4) 无免疫性疾病; (5) 无血液系统疾病、肝肾疾病及肿瘤史; (6) 无接触化学毒物史者; (7) 无心理疾病。

1.2 试验方法 (1) 标本采集, 分别将 3 支试管编号, 抗凝全

血 2 mL(乙二胺四乙酸钠抗凝), 第一管立即进行白细胞计数与分类。第二管 6 h 内取血 20 μ L 加于 380 μ L 磷酸盐缓冲液中, 即刻混匀, 制成待检测的稀释血, 避光保存待用, 第三管做质控。(2) 标本处理, 将孵育盒置于水平工作台, 加入温水至湿盒底部被完全覆盖, 取出芯片, 将包被面朝上, 做好标记后将芯片置于湿盒支架上(勿使玻片接触到水)。吸取 5 μ L 稀释血, 滴入芯片方框区域中央。确认没有血样流出, 且框内无气泡, 盖紧盒盖, 室温(20~30 $^{\circ}$ C)孵育 40 min。之后将芯片浸入磷酸盐缓冲液中, 旋转提拉直至无色透明, 洗去多余的血细胞。洗净后将芯片即刻浸入过氧化酶染色液中, 静置 1 min。1 min 内将 1 mL 2.5%~3.5% 过氧化氢溶液加入预先盛有水的专用缸中, 搅拌均匀后制成新鲜工作溶液。将沥干的芯片转入新鲜过氧化氢工作溶液中, 静置 4 min。将芯片转入 75% 乙醇(400 mL)专用缸中, 旋转提拉至干净, 提出后振去多余乙醇, 进行干燥。放入复染液中, 静置 1 min。转入纯水(500 mL)专用缸中, 静置 30 s, 其后根据玻片数量不等提拉相应次数, 提出后振去多余水分, 干燥。对最终目的细胞进行染色, 有利于肉眼或系统软件进行观察和计数。(3) 标本检测, 将芯片放入自动计数系统中, 完成进样-自动识别检测芯片类型-对芯片全自

* 基金项目: 克拉玛依市科研基金资助项目(JK2014-11)。 作者简介: 冯琴, 女, 主任技师, 主要从事临床医学检验研究。 △ 通讯作者: E-mail: z101202303@163.com。

动聚焦-精准分析焦面-高速线型扫描-细胞图形分析-数据分析等一系列自动识别后,输入最终的图文报告。

1.3 质量控制 (1)所用仪器均经校准合格。阴性对照:Opticlone IgG 抗体阴性、阳性对照;上述抗凝全血标本,平行操作。同时,随机选取健康人汉族(18 例)、维吾尔族(15 例)共 33 例,与流式细胞法检测结果进行相关性的分析,相关性均在 0.95 以上,以验证 BM2000 型全自动可视化细胞检测仪检测结果的准确性。(2)取样代表性验证^[1]。随机选取上述的抗凝全血标本,将同一抗凝全血标本先后两次测定相关数据。同时进行配对资料 *t* 检验,差异无统计学意义($P>0.05$),表示本试验重复性良好。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

表 1 维吾尔族健康人 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值、白细胞、淋巴细胞计数结果

细胞亚群	均数	标准差	中位数	最小值	最大值	95 %范围
白细胞绝对值(个/微升)	7.50	1.98	7.05	4.80	16.90	5.20~14.86
淋巴细胞(%)	26.88	7.32	23.45	12.40	45.90	15.26~43.16
CD3 ⁺ 绝对值(个/微升)	1 279.00	446.00	1 226.00	416.00	2 828.00	494.00~2 194.00
CD4 ⁺ 绝对值(个/微升)	674.00	246.00	658.00	132.00	1 432.00	195.00~1 226.00
CD8 ⁺ 绝对值(个/微升)	535.00	221.00	516.00	176.00	1 212.00	236.00~1 130.00
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.35	0.46	1.31	0.31	2.72	0.47~2.43

表 2 汉族健康成人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值结果

细胞亚群	均数	标准差	中位数	最小值	最大值	95 %范围
白细胞绝对值(个/微升)	7.44	1.97	7.10	4.30	16.70	4.86~12.61
淋巴细胞(%)	33.21	7.50	32.60	12.90	50.50	16.58~48.80
CD3 ⁺ 绝对值(个/微升)	1 142.00	380.00	1 071.00	256.00	2 164.00	382.00~2139.00
CD4 ⁺ 绝对值(个/微升)	592.00	193.00	542.00	152.00	1 324.00	184.00~1 040.00
CD8 ⁺ 绝对值(个/微升)	486.00	193.00	439.00	96.00	1 124.00	171.00~992.00
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.29	0.37	1.28	0.68	2.89	0.72 ~2.60

表 3 维吾尔族、汉族各项指标比较($\bar{x}\pm s$)

民族	<i>n</i>	CD4 ⁺ (个/微升)	CD8 ⁺ (个/微升)	CD3 ⁺ (个/微升)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
维吾尔族	91	674±246	535±221	1 279±446	1.35±0.46
汉族	90	592±193	486±193	1 142±380	1.29±0.37
<i>t</i>	—	2.500	1.589	2.214	1.031
<i>P</i>	—	0.013	0.114	0.028	0.304

—:无数据。

3 讨 论

美国疾病控制中心规定:成人 CD4⁺ 计数正常值为(844±247)个/微升。如果 CD4⁺ 绝对计数小于或等于 500 个/微升,可开始进行抗病毒治疗^[2]。《中国国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册(第 3 版)》规定:世界卫生组织任何 HIV 分期 CD4⁺ T 淋巴细胞计数小于 350 个/微升即可进行抗病毒治疗^[3]。相关研究显示,上海健康成人 CD4⁺ 计数为(726.99±255.21)个/微升;湖北地区成年健康人群 CD4⁺ 计数平均值为(681±

2.1 维吾尔族 T 淋巴细胞检测结果 维吾尔族外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 结果中位数分别为 1 226、658、516 个/微升,参考值范围分别为(494~2 194)个/微升、(195~1 226)个/微升和(236~1 130)个/微升,CD4⁺/CD8⁺ 绝对数比值中位数为 1.31,参考值范围为 0.47~2.43。见表 1。

2.2 汉族 T 淋巴细胞检测结果 克拉玛依地区汉族外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 中位数分别为 1 071、542、439 个/微升,参考值范围分别为(382~2 139)、(184~1 040)、(171~992)个/微升,CD4⁺/CD8⁺ 绝对数比值中位数为 1.28,参考值范围为 0.72~2.60。见表 2。

2.3 维吾尔族与汉族 T 淋巴细胞检测结果比较分析 CD8⁺ 计数平均值、CD4⁺/CD8⁺ 比值平均值汉族与维吾尔族间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);CD3⁺、CD4⁺ 计数均值维吾尔族均比汉族高,且差异有统计学意义($P<0.05$)。两组人群经方差分析,白细胞计数差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

21)个/微升^[4]。本研究结果表明,克拉玛依地区成年汉族健康人群 CD4⁺ 计数为(592±193)个/微升。CD4⁺ 计数与上海、湖北等地区健康成人 CD4⁺ 计数相比约低 100 个/微升,因此,在 HIV 抗病毒治疗时参照的 CD4⁺ 计数值是否也相应下降值得磋商。

本研究中,克拉玛依地区健康成人汉族 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 计数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值参考范围值,与徐晓琴等^[5]调查江苏成人比较,除了 CD4⁺/CD8⁺ 比值差异无统计学意义($P>0.05$)外,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 差异均有统计学意义($P<0.05$)。可能是地域不同的差异。本研究中克拉玛依地区维吾尔族 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 计数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值参考范围值与张琰等^[6]调查的新疆地区维吾尔族参考值范围相比较,CD4⁺/CD8⁺ 比值差异无统计学意义($P>0.05$)。

本研究结果显示,维吾尔族 CD3⁺、CD4⁺ 计数平均值均高于汉族,差异有统计学意义($P<0.05$);CD8⁺ 计数均值和 CD4⁺+/CD8⁺ 差异无统计学意义($P>0.05$)。与梁君等^[7]的调查结果一致。CD3⁺、CD4⁺ 均具有抵抗病(下转第 3231 页)

表明 GAPDH 质粒扩增产物的 T_m 值为 $(84.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 所有产物溶解曲线均为单一峰型, 表明无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的 PCR 扩增产物, 见图 4。

3 讨 论

RT-PCR 的设想是由 Higuchi 等^[8]于 1992 年最早提出。所谓 RT-PCR 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术结合了 RT-PCR 仪、实时荧光定量试剂、通用电脑和自动分析软件, 构成 PCR-DNA/RNA 实时荧光定量检测系统。

与普通 PCR 相比, RT-PCR 优势在于可以对目的基因表达水平进行准确的绝对定量或者相对定量分析, 因此被广泛用于病毒学研究中, 如病毒的快速诊断、定量检测、毒力鉴别、致病机理等研究^[9-12]。

本研究采用 SYBR Green I 染料进行检测, 不需合成荧光探针。相比探针法, 具有较高的灵敏性和试验稳定性。由于非特异性扩增和引物二聚体同样会产生荧光信号, 因此在 PCR 结束后立即进行溶解曲线分析, 非特异性扩增与特异性扩增产物吸收峰 T_m 值存在差异, 可以进行区分。而本研究的溶解曲线显示每一条扩增曲线均为特异性单峰, 无非特异性扩增, T_m 值符合要求。

本研究检测人 GAPDH 基因的灵敏度从 10^1 拷贝数量级延伸到 10^7 数量级, 灵敏度高, 范围宽。每个稀释度三个复孔重复性良好, CV 值均低于 1%, 且多次试验基本无差别, 体现了良好的稳定性。

本研究成功设计了能特异扩增人 GAPDH 基因保守区片段的引物, 来自人体 PBMC 细胞的总 RNA 样品中能扩增到 105 bp 大小的特异性片段, 并成功构建 pMD18-T-GAPDH 重组质粒, 建立了基于 SYBR Green 染料技术的人 GAPDH 基因荧光定量 RT-PCR 方法。所建立的方法快速, 检测线性范围广, 灵敏度高等特点, 为 GAPDH 作为内参基因对人相关基因 mRNA 水平的 RT-PCR 分析及病原基因表达的定量分析提供了方法学借鉴。

参考文献

[1] Yang C, Pan H, Liu Y, et al. Selection of reference genes for expression analysis using quantitative real-time PCR in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphididae)[J]. PLoS One, 2014, 9(11):110454.

[2] Zhao LM, Zheng ZX, Zhao X, et al. Optimization of reference

genes for normalization of the quantitative polymerase chain reaction in tissue samples of gastric cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(14):5815-5818.

[3] Pugnale P, Latorre P, Rossi C, et al. Real-time multiplex PCR assay to quantify hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Virol Methods, 2006, 133(2):195-204.

[4] Collins C, Patel MV, Colvin J, et al. Identification and evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in the whitefly *Bemisia tabaci* (Asia D) by reverse transcription quantitative realtime PCR[J]. J Insect Sci, 2014, 14(5):63.

[5] Ji X, Wang Q, Gao Y, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of dicer in *G. gallus* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(5):630-636.

[6] Julian GS, de Oliveira RW, Perry JC, et al. Validation of house-keeping genes in the brains of rats submitted to chronic intermittent hypoxia, a sleep apnea model[J]. PLoS One, 2014, 9(10):109902.

[7] Wang E, Wang K, Chen D, et al. Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5):9998-10015.

[8] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology, 1993, 11(9):1026-1030.

[9] Dai M, Feng M, Liu D, et al. Development and application of SYBR Green I real-time PCR assay for the separate detection of subgroup J Avian leukosis virus and multiplex detection of avian leukosis virus subgroups A and B[J]. Virol J, 2015, 12(1):52.

[10] Alsahebhosoul F, Salehi R, Hosseini AZ, et al. Evaluation of SNP rs763361 on Gly307Ser gene in multiple sclerosis patients compared to healthy subjects[J]. Mult Scler Relat Disord, 2015, 3(6):744.

[11] Lee SA, Kim KJ, Kim H, et al. Hepatitis B virus preS1 deletion is related to viral replication increase and disease progression[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(16):5039-5048.

[12] Blake DJ, Graham J, Poss M. Quantification of Feline immunodeficiency virus (FIV_{pco}) in peripheral blood mononuclear cells, lymph nodes and plasma of naturally infected cougars[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 4):967-975.

(收稿日期:2015-07-18)

(上接第 3228 页)

毒和调节免疫系统的作用, 说明维吾尔族抵抗病毒和调节免疫系统的能力比汉族强, 这可能与维吾尔族长期大量食用羊肉、洋葱和胡萝卜以及维吾尔族人好动性格有关。

本研究对 181 例克拉玛依地区健康成人维吾尔族和汉族人群 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 计数及 $CD4^+/CD8^+$ 比值正常值参考范围进行分析, 为本地区的实验室提供了参考依据, 将有助于诊疗各类细胞免疫功能紊乱导致的疾病, 以及指导 HIV 的诊断、治疗及预后。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. WS/T 360-2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.

[2] Lebranchu Y, Thibault G, Degenne D, et al. Abnormalities in $CD4^+$ T lymphocyte subsets in patients with common variable im-

munodeficiency[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1991, 61(4):83-92.

[3] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 3 版. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 2012.

[4] 严亚军, 桂希恩, 陈铁龙, 等. 湖北地区城镇与农村健康人群 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数调查[J]. 中国艾滋病性病, 2010, 16(5):773-775.

[5] 徐晓琴, 陈国红, 刘晓燕, 等. 江苏地区健康汉族人 T 淋巴细胞免疫表型参考值的建立[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 11(32):1616-1620.

[6] 张琰, 温浩, 张朝霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血液淋巴细胞免疫表型参考值范围的调查[J]. 中国试验血液学杂志, 2006, 14(1):133-136.

[7] 梁君, 陶钧, 张辉, 等. 我国部分省市及民族健康人 T 淋巴细胞亚群参考值范围的研究[J]. 中国病毒病杂志, 2013, 3(2):122-127.

(收稿日期:2015-08-08)