

• 论 著 •

健康成年人 and 儿童外周血淋巴细胞亚群参考区间的建立

吴士及, 徐丽娟, 黄 劲, 殷波涛, 何虹燕, 段金玉, 朱 琴, 黄 敏

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030)

摘要:目的 建立健康成年人和儿童外周血淋巴细胞亚群百分率参考区间。方法 使用荧光抗体, 分别对 100 例不同年龄、性别健康成年人和 100 例健康儿童外周血淋巴细胞亚群进行标记, 采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 型流式细胞仪进行检测并分析结果, 使用 SPSS17.0 进行统计学处理。结果 1~5 岁健康儿童总调节性 T 淋巴细胞(总 Treg)、天然调节性 T 淋巴细胞(天然 Treg)、诱导调节性 T 淋巴细胞(诱导 Treg)、活化总 T 淋巴细胞(活化总 T)、活化杀伤性 T 淋巴细胞(活化 Ts)、纯真辅助性 T 淋巴细胞(纯真 Th)、记忆辅助性 T 淋巴细胞(记忆 Th)、CD8⁺CD28⁺/CD8⁺、CD4⁺CD28⁺/CD4⁺、B1 淋巴细胞(B1)、转化 B 淋巴细胞(转化 B)的 95% 参考范围分别为 (3.41±0.81)%、(1.59±0.48)%、(1.80±0.47)%、(8.05±3.61)%、(13.81±6.86)%、(70.19±6.35)%、(29.90±6.36)%、(76.48±11.45)%、90.90%~100.00%、(10.05±3.76)%、(3.59±1.70)%。对 18~65 岁健康成年人分别按年龄性别制订了相应的参考范围。结论 在相同地域, 相同种族, 可以建立健康成年人和儿童外周血淋巴细胞亚群的正常参考区间。

关键词: 淋巴细胞亚群; 参考值范围; 流式细胞仪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)05-0593-03

Establishment of reference intervals of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults and children

WU Shiji, XU Lijuan, HUANG Jin, YIN Botao, HE Hongyan, DUAN Jinyu, ZHU Qin, HUANG Min

(Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To establish the percentage reference intervals of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults and children. **Methods** Peripheral blood lymphocyte subsets in 100 different sexes and ages of healthy adults and 100 healthy children were collected and labeled by fluorescent antibody, and the detection and analysis were performed by the FACSCalibur flow cytometry. The statistical processing was conducted by SPSS 17.0 software. **Results** The 95% reference ranges of total Treg, nature Treg, inductive Treg, activated T lymphocytes, active Ts, naive Th, memory Th, CD8⁺CD28/CD8⁺, CD4⁺CD28⁺/CD4⁺, B1 lymphocytes, transformed B lymphocytes in healthy children aged 1-5 years old were (3.41±0.81)%, (1.59±0.48)%, (1.80±0.47)%, (8.05±3.61)%, (13.81±6.86)%, (70.19±6.35)%, (29.90±6.36)%, (76.48±11.45)%, 90.90% - 100.00%, (10.05±3.76)% and (3.59±1.70)% respectively. The corresponding reference ranges in healthy adults aged 18-65 years old were respectively formulated. **Conclusion** The normal reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and healthy children may be established in the same area and the same race.

Key words: lymphocyte subsets; normal reference range; flow cytometry

在许多疾病, 如免疫缺陷病、自身免疫性疾病、白血病、病毒性肝炎、肝硬化等, 患者的外周血淋巴细胞亚群会出现异常改变^[1]。检测淋巴细胞亚群的变化, 对早期发现和控制这些疾病, 指导临床治疗, 评估机体免疫状态有非常重要的意义。由于不同地域、年龄患者的淋巴细胞亚群百分率的正常参考范围不同, 所以建立某一地区的正常参考范围有着非常重要的意义。本研究选取了华中地区健康成年人和健康儿童标本各 100 例, 旨在通过分析其外周血淋巴细胞亚群初步建立武汉地区健康成年人和健康儿童的淋巴细胞亚群的参考范围。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 100 例同济医院体检中心的体检者和 100 例湖北省武汉市儿童医院的儿童体检者纳入本研究。上述成年人和儿童均经过体检确定无人类免疫缺陷病毒感染、近期无微生物感染、无慢性器质性疾病、未接触化学毒物、近期未使用药物治疗、无药物过敏史及手术史、无高血压心脏病、体质指数(BMI)正常。成年人中, 男女各 50 例, 年龄 18~65 岁; 儿童中, 男女各 50 例, 年龄 1~5 岁。将成年人按性别和年龄分为

4 组。男性 18~50 岁为组 1, >50~65 岁为组 2; 女性 18~50 岁为组 3, >50~65 岁为组 4。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 FACSCalibur 型流式分析仪。抗体为 BD 公司的配套荧光抗体和溶血素。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 清晨安静状态下空腹采集纳入研究者外周静脉血 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝, 6 h 内检测。

1.3.2 通道设计 为每例标本检测准备 4 支试管, 分别加入针对以下抗原的抗体: 管(1)CD45RA、CD127、CD4、CD25, 管(2)CD8、CD28、CD3、CD4, 管(3)HLA-DR、CD8、CD45、CD3, 管(4)CD5、CD10、CD45、CD19。每管中的 4 种抗体的荧光标记物质依次为 FITC、PE、PerCP 和 APC, 用量分别是 5、5、5、3 μL。

1.3.3 标本检测 在专用试管内加入抗凝全血 50 μL 及上述荧光标记抗体, 振荡混匀后在室温下避光孵育 30 min, 加入溶血素 2 mL, 混匀, 避光溶血 15 min, 离心后倒掉上清, 用 2 mL PBS 洗涤, 离心倒掉上清, 加 450 μL PBS 待测。离心设置为

1 200 r/min, 5 min。用以上步骤平衡设置阴性对照和阳性对照,用校准品校准光路,使变异系数(CV)<2%。

1.3.4 设门方案 根据荧光组合和散射信号划分相应的淋巴细胞亚群并得到百分率。根据管(1)圈出总调节性 T 淋巴细胞(总 Treg, CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}),天然调节性 T 淋巴细胞(天然 Treg)为 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} CD45RA⁺, 诱导调节性 T 淋巴细胞(诱导 Treg)为 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} CD45RA⁻, 纯真辅助性 T 淋巴细胞(Th)为 CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁺, 记忆 Th 为 CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁻;管(2)检测 CD4⁺ CD28⁺ (CD3⁺ CD4⁺ CD28⁺) 和 CD8⁺ CD28⁺ (CD3⁺ CD8⁺ CD28⁺) 亚群;管(3)的检测,活化总 T 淋巴细胞(活化总 T)为 CD3⁺ CD45⁺ HLA-DR⁺, 活化杀伤性 T 淋巴细胞(活化 Ts)为 CD3⁺ CD8⁺ CD45⁺ HLA-DR⁺;管(4)的检测, B1 淋巴细胞(B1)为 CD45⁺ CD5⁺ CD19⁺, 转化 B 淋巴细胞(转化 B)为 CD45⁺ CD10⁺ CD19⁺。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件对结果进行统计分析,经正态性检验,在所得结果中儿童 CD4⁺ CD28⁺、成年人 CD4⁺ CD28⁺ 和 B1 细胞 3 项数据不符合正态分布,这 3 项结果以百分位数法进行表示,其他以 $\bar{x} \pm s$ 表示,得到各项指标的参考范围。组间比较采用 *t* 检验和方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 儿童 男童按性别分组进行比较,淋巴细胞亚群百分率中,仅 CD8⁺ CD28⁺ 差异有统计学意义(*P*<0.05),制订的本实验室淋巴细胞亚群的学龄前男儿童的正常 95% 参考范围见表 1。

2.2 成年人 方差分析显示,在淋巴细胞亚群百分率的组间两两比较中,CD4⁺ CD28⁺、CD8⁺ CD28⁺ 和记忆 Th 的差异均

无统计学意义(*P*>0.05)。活化总 T、活化 Ts、天然 Treg:组 1 与其他 3 组比较差异均有统计学意义(*P*<0.05);诱导 Treg:组 1 与组 3,组 3 与组 4 比较差异有统计学意义(*P*<0.05);总 Treg:组 1 与其他 3 组差异均有统计学意义(*P*<0.05),组 3 与组 4 比较差异均有统计学意义(*P*<0.05);纯真 Th:组 1 与组 3 比较差异有统计学意义(*P*<0.05);B1:组 1 与组 2,组 1 与组 3,组 2 与组 4,组 3 与组 4 比较差异均有统计学意义(*P*<0.05);转化 B:组 1 与组 4,组 2 与组 4 差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 儿童淋巴细胞亚群百分 95% 参考范围 (% , $\bar{x} \pm s$ 或 $P_{2.5} \sim P_{97.5}$)

项目	儿童	男童	女童
活化总 T/L	8.05±3.61	8.22±4.04	8.19±3.90
活化 Ts/Ts	13.81±6.86	14.29±7.15	13.93±8.37
天然 Treg/L	1.59±0.48	1.53±0.47	1.67±0.55
诱导 Treg/L	1.80±0.47	1.74±0.48	1.84±0.46
总 Treg/L	3.41±0.81	3.26±0.80	3.52±0.85
纯真 Th/Th	70.19±6.35	70.98±6.01	69.13±6.78
记忆 Th/Th	29.90±6.36	29.11±6.03	30.97±6.78
CD4 ⁺ CD28 ⁺ /CD4 ⁺	90.90~100.00	91.16~100.00	87.08~100.00
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺	76.48±11.45	73.30±13.82*	79.38±8.95
B1/L	10.05±3.76	10.54±3.78	9.57±3.83
转化 B/L	3.59±1.70	3.58±1.60	3.86±2.46

注:与女童比较,* *P*<0.05;L 表示外周血总淋巴细胞。

表 2 成年人淋巴细胞亚群百分 95% 参考范围 (% , $\bar{x} \pm s$ 或 $P_{2.5} \sim P_{97.5}$)

项目	成年男性		成年女性	
	组 1	组 2	组 3	组 4
活化总 T/L	10.15±6.92	22.55±4.50	16.81±8.78	16.84±7.72
活化 Ts/Ts	21.29±12.02	52.86±19.04	36.77±17.97	46.70±23.58
天然 Treg/L	0.74±0.51	3.80±0.59	3.16±1.26	3.82±0.94
诱导 Treg/L	2.14±0.75	2.03±0.43	1.66±0.63	2.31±0.95
总 Treg/L	2.86±1.03	5.83±0.47	4.81±1.68	6.20±1.61
纯真 Th/Th	38.18±11.06	42.81±11.42	46.74±10.33	43.21±14.76
记忆 Th/Th	61.87±11.07	57.35±11.22	54.30±11.91	56.95±14.78
CD4 ⁺ CD28 ⁺ /CD4 ⁺	87.03~99.94	96.06~99.96	83.58~100.00	84.47~98.59
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺	64.75±20.09	52.47±13.07	64.94±1.85	56.81±13.07
B1/L	0.46~5.81	0.39~2.19	0.61~4.56	0.93~4.33
转化 B/L	0.68±0.46	0.77±0.59	0.99±0.68	1.45±0.58

注:L 表示外周血总淋巴细胞。

3 讨 论

淋巴细胞根据其表型和功能特征可分为不同类别,如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞等。成熟 T 淋巴细胞是高度不均一的细胞群体,根据功能特点可将其分为 Th、Ts、Treg 等;根据表型特征,活化状态及在免疫应答中所起作用,可将 T 淋巴细胞分为初始、效应和记忆性 T 淋巴细胞。

Treg 是近年来陆续发现的一类具有免疫抑制作用的细胞,特征是其本身缺乏增殖能力,可抑制 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 淋巴细胞的活化和增殖,并能抑制初始 T 淋巴细胞和记忆 T 淋巴细胞功能。诱导 Treg 并非天然存在,而是在抗原诱导下生成^[2]。Treg 细胞在自身免疫病和移植排斥等免疫相关疾病中可能具有广泛应用前景^[3]。本次实验结果显示,Treg 细胞的百分率体现了年龄和性别引起的差异,18~50 岁成年男性的

总 Treg 和天然 Treg 百分率低于其他组别的成年人。

记忆 Th 遇抗原刺激后以产生效应分子为主,如细胞因子等,对抗原反应强烈,能辅助 B 淋巴细胞产生抗体;纯真 Th 细胞遇抗原刺激后以活化增殖为主,主要发挥免疫调理作用,直接或者通过 CD8⁺T 淋巴细胞抑制免疫应答的发生,同时其表面表达的 CD45RA 也逐渐转变为 CD45RO^[4]。本次实验结果显示,记忆 Th 细胞百分率在各个组别间不存在差异,而纯真 Th 细胞在 18~50 岁的男性和女性间存在差异,且男性高于女性。

CD28 与其配体结合为 T 淋巴细胞提供活化所必需的共刺激信号,即第二信号。CD28 在风湿性关节炎(RA), Graves 病,冠心病患者 T 淋巴细胞中表达减少,可能与自身免疫反应细胞组织损伤活性增强有关^[5]。CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞属于细胞毒 T 淋巴细胞,与靶细胞直接接触通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒物质,溶解靶细胞,同时还可能通过释放一些细胞因子诱导靶细胞的凋亡^[6]。有研究表明在喘息性肺炎患儿可以出现 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞的升高和 CD4⁺CD28⁺T 淋巴细胞的降低^[7],CD4⁺CD28⁺T 淋巴细胞在带状疱疹病毒感染时增高。本研究显示,男女童的 CD8⁺CD28⁺细胞百分率差异有统计学意义,而成年人各组间差异无统计学意义。

HLA-DR 是 MHC-II 类抗原,是 T 淋巴细胞晚期活化的标志,根据 HLA-DR 的表达情况,可以得知活化 Ts 细胞和活化的总 T 淋巴细胞的比值。本次实验结果显示,18~50 岁成年男性的活化 Ts 和活化 T 总均低于其他组别成年人。

B1 是具有自我更新能力的长寿细胞,参与对多种细菌的抗感染免疫,属固有免疫效应细胞,另外,B1 也可能通过产生 IgM 类自身抗体而参与某些自身免疫病发生^[8]。本研究显示,成年人各个组别间的 B1 百分率差异有统计学意义,即 B1 百分率体现了性别和年龄的差异。

CD10 分子是一种中性内肽酶,可以水解刺激 B 淋巴细胞分化的肽类物质,从而使 B 淋巴细胞的分化发生下调。在 B 前体细胞分化发育过程中,CD10 从阴性转为强阳性再转为阴性。因此,CD10 可以反映 B 前体细胞分化发育过程^[9]。本研究显示,18~50 岁成年女性转化 B 的百分率高于其他组成成年人。

我国大部分淋巴细胞亚群百分率参考范围都是参考国外相关文献制订的。但是淋巴细胞免疫分型参考值受到种族类别、生活环境、经济水平等因素影响,所以使用国外参考范围会造成对临床诊断判断的不准确。本研究建立的参考范围较国外参考范围能更准确地反映武汉地区人群的淋巴细胞亚群分布,对于医生准确判断本地区患者病情有重要意义。

男童和女童淋巴细胞亚群百分率中,仅 CD8⁺CD28⁺/CD8 差异有统计学意义。由此可制订本实验室淋巴细胞亚群的男女童的 95% 正常参考区间。由于儿童的年龄分布跨越不大,故未对儿童进行不同年龄区间两两比较。

本实验用方差分析比较同性别不同年龄阶段和同年龄段不同性别的成年人淋巴细胞亚群百分率,结果显示,仅 CD4⁺CD28⁺,CD8⁺CD28⁺和记忆 Th 在各组间比较差异无统计学意义,其他项目差异均有统计学差异。由此可制订本实验室淋巴细胞亚群的男女成年人的正常 95% 参考范围。目前淋巴细胞的测定用于多方面的研究,而通常都是将监测结果与健康人群相比较,以判断被检测者疾病状况。由于健康人外周血淋巴细胞亚群表型稳定,故所得结果基本上能够反映武汉地区健康成年人和儿童外周血淋巴细胞亚群的水平,能够作为正常参考范围,为临床疾病的诊断和治疗提供参考依据。

参考文献

[1] 刘尧娟,欧超伟,钟琼.健康人外周血 T 细胞亚群参考区间的建立[J]. 检验医学与临床,2010,7(7):596-597.
 [2] 张炬,陈万军.CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞在免疫耐受及自身免疫病中的作用基础[J]. 医学与临床,2005,25(9):785-788.
 [3] 刘莉,丁乾.恶性肿瘤患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞的检测及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2005,10(4):342-345.
 [4] 陈军浩,欧阳健.系统性红斑狼疮患者 CD4⁺T 淋巴细胞 CD45RO/CD45RA 的表达[J]. 现代检验医学杂志,2002,17(4):3-4.
 [5] 赵进良,王勤,张学光,等.类风湿关节炎患者 CD4⁺T 淋巴细胞亚群 4-1BB 和 CD28 分子的表达及临床意义[J]. 江苏医药,2009,35(10):1179-1180.
 [6] 韩琳,裴毅.肿瘤患者 CD8⁺T 细胞中 CD28 表达的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2007,7(9):1402-1404.
 [7] 柴少卿,季伟.喘息性肺炎患儿外周血中共刺激分子 CD28 及淋巴细胞亚群的变化[J]. 内蒙古医学杂志,2010,42(12):1425-1428.
 [8] 龚非力.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2000:77-78.
 [9] 陈愉,赵彤,蔡庆发,等.弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 bcl-2、bcl-6、CD10 蛋白表达及其在亚分类中的意义[J]. 肿瘤防治研究,2008,35(8):563-565.

(收稿日期:2016-08-26 修回日期:2016-10-18)

(上接第 592 页)

[6] Zhao H, Li S, Cao L, et al. Surveillance of mycoplasma pneumoniae infection among children in Beijing from 2007 to 2012[J]. Chin Med J, 2014, 127(7):1244-1248.
 [7] Xin DL, Mi ZH, Han X, et al. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of mycoplasma pneumoniae from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5):2158-2159.
 [8] Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, et al. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae clinical isolates obtained in Japan[J]. Antimi-

crobiol Agents Chemother, 2004, 48(12):4624-4630.
 [9] Uh Y, Hong JH, Oh KJ, et al. Macrolide resistance of mycoplasma pneumoniae and its detection rate by Real-Time PCR in primary and tertiary care hospitals[J]. Ann Lab Med, 2013, 33(6):410-414.
 [10] Liu Y, Ye X, Zhang H, et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae and its macrolide-resistance mutation by Cycleave PCR[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(4):333-337.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-14)