

• 临床检验研究论著 •

以流式细胞术建立幼儿 T 淋巴细胞亚群参考范围*

何志雄¹, 李木兰^{2△}, 袁才佳², 蒋显勇², 易艳军²
(1. 湖南省郴州市第一人民医院检验医学中心, 湖南郴州 423000;
2. 湘南学院预防医学与医学检验系, 湖南郴州 423000)

摘要:目的 建立健康幼儿外周静脉血 T 淋巴细胞亚群的参考范围。方法 收集 60 例不同性别健康幼儿(1~3 岁)静脉全血标本, 用三色流式细胞术检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞绝对数值、百分率和 CD4⁺/CD8⁺ 比值。结果 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的绝对计数的中位数分别为 2 664、1 486 和 961 个/ μ L, CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的百分率的中位数为 55.9% 和 38.4%, CD4⁺/CD8⁺ 比值的中位数为 1.46。各参数值在不同年龄、性别间的分布差异无统计学意义。结论 本研究成功建立了 1~3 岁健康幼儿 T 淋巴细胞亚群正常参考范围, 为本地区儿科医生提供了有价值的参考依据。

关键词: T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 参考值
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.006 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2014)02-0142-03

The establishment of reference ranges of peripheral blood T-lymphocyte subsets for healthy young children based on flow cytometry*
He Zhixiong¹, Li Mulan^{2△}, Yuan Caijia², Jiang Xianyong², Yi Yanjun²

(1. Laboratory Medicine Center, the First People's Hospital of Chenzhou City, Chezhzhou, Hunan 423000, China;
2. Department of Preventive Medicine and Clinical Laboratory, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

Abstract: **Objective** To establish the reference ranges of peripheral blood T-lymphocyte subsets in healthy young children. **Methods** A total of 60 whole blood samples were collected from 1—3 years old healthy young children. Absolute counts and percentage of T-lymphocyte subsets of blood samples were counted by three color flow cytometric. **Results** The median values of the T-lymphocyte subsets were 2 664 cells/ μ L for CD3⁺, 1 486 cells/ μ L for CD4⁺ and 961 cells/ μ L for CD8⁺, and the median values of the percentage of T-lymphocyte subsets were 55.9% for CD4⁺ and 38.4% for CD8⁺, and a ratio of 1.46 for CD4⁺/CD8⁺. The results showed no significant differences were observed at different age and gender groups. **Conclusion** The reference ranges of peripheral blood T-lymphocyte subsets values are proposed by the current study for healthy young children aged 1—3 year old, which can offer more clinical information for pediatrician.

Key words: T-lymphocyte subsets; flow cytometry; reference values

在人体生长、发育、成熟和衰老的过程中,免疫系统的功能和特性不断发生变化。淋巴细胞免疫表型与机体免疫功能相关,淋巴细胞亚群的检测对评估身体的免疫状态,监控疾病的发生,了解疾病的机制,指导免疫治疗有着重要的意义。为满足器官移植的监测、艾滋病等的临床诊断需要,国际上逐渐开始采用绝对值报告来反映患者的免疫功能状态。国内外已有不少不同疾病状态下淋巴细胞亚群状态改变的研究报道,但关于健康幼儿淋巴细胞亚群的正常参考值的调查报道并不多。本研究以流式细胞术检测郴州地区 1~3 岁健康幼儿外周血淋巴细胞亚群的分布情况,建立了健康幼儿 T 淋巴细胞亚群正常参考值范围,现总结报道如下。

1 资料与方法

- 1.1 一般资料 60 例幼儿静脉血液标本取自 2010~2012 年郴州市第一人民医院体检者,年龄 1~3 岁,体格检查健康,心、肝、肾功能正常,血细胞计数正常,无血液系统疾病,无过敏症,艾滋病(HIV)、乙型肝炎、丙型肝炎和梅毒血清学指标阴性。其中男性 35 例,女性 25 例。
- 1.2 标本采集 采集研究对象外周静脉血 1~2 mL,用 EDTA-K₂ 抗凝,2 h 内检测。
- 1.3 主要仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD

公司),Multiset 三色试剂:CD3PerCP/ CD4 FITC / CD8PE,标准数量微球的 TruCOUNT 绝对计数管,四色荧光标准微球、FACS 溶血素(10 $\times$),以上试剂均为美国 BD 公司产品。

1.4 样品检测

- 1.4.1 仪器校正 使用美国 BD 公司四色荧光标准微球校准仪器,使流式细胞仪处于最佳工作状态。
- 1.4.2 检测过程 严格按照试剂盒的说明书操作:在 TruCOUNT 绝对计数管中准确加入 20 μ L Multiset 三色试剂和 50 μ L 全血,充分混匀后避光放置 15 min。再加入 450 μ L FACS 溶血素(10 $\times$),充分混匀后避光放置 15 min。标本制备后立即上机运行 Multiset 程序检测,分析总 T 淋巴细胞(CD3⁺),辅助性 T 淋巴细胞(CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻),细胞毒性 T 淋巴细胞(CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺)的绝对含量和百分率,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

1.5 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件对结果进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用百分位数法获得 95% 可信区间建立各检测项目的参考范围,进行 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 不同性别健康幼儿 T 淋巴细胞亚群检测结果 将受试

* 基金项目:湘南学院科研课题项目(2011YY45);湖南省精品课程项目(2009-252);湘南学院十二五重点学科项目(XNU125KD022)。
作者简介:何志雄,男,主管检验师,主要从事临床检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: lml9741@163.com。

对象按性别分组,比较不同性别之间的差异,结果显示不同性别健康幼儿间 T 淋巴细胞亚群各项指标的差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 不同年龄健康幼儿 T 淋巴细胞亚群检测结果 将受试对象按年龄分为两组:1~2 岁组,>2~3 岁组比较两年龄组之间健康幼儿外周血 T 淋巴细胞亚群分析结果,差异无统计学意义($P>0.05$)。用百分位数法获得的 60 例受试对象外周血 T 淋巴细胞亚群绝对计数的 95% 置信区间作为本实验室的参

考范围。用 FACSCalibur 测定郴州市健康幼儿外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞绝对数值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值的中位数分别为 2 664、1 486、961 个/ μ L 和 1.46,CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的百分率中位数分别为 55.9% 和 38.4%。CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞绝对数值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值正常参考范围分别为 2 588~3 083、1 454~1 791、921~1 110 个/ μ L 和 1.46~1.68。

表 1 健康幼儿外周血 T 淋巴细胞亚群分析结果及参考范围

淋巴细胞亚群	平均值	标准差	中位数	最小值	最大值	95%可信区间
绝对数(个/ μ L)						
CD3 ⁺	2 813.36	955.96	2 661.50	1 103.00	5 488.00	2 588.87~3 083.80
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	1 606.57	661.23	1 486.00	607.00	3 480.00	1 454.86~1 791.81
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1 009.04	364.01	961.00	396.00	1 747.00	921.00~1 110.86
相对数						
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	56.19	6.26	55.91	43.78	69.33	54.80~58.04
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	37.44	5.63	38.42	27.22	45.57	35.80~38.70
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.56	0.42	1.46	0.93	2.55	1.46~1.68

3 讨 论

T 淋巴细胞亚群的测定对细菌感染、病毒感染、移植排斥反应、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、恶性肿瘤、再生障碍性贫血等疾病的诊断具有重要价值。3 岁以内的小孩自身免疫功能尚未完善,免疫功能差,容易被细菌或病毒感染,发病率高。由于不同地域、种族间的差异,以及使用流式细胞术调查外周血中淋巴细胞亚群正常参考值的成本较高等因素,目前对于外周血淋巴细胞亚群国内尚未有建立统一的参考值,只有为数不多的实验室建立了自己的参考值。大多数实验室使用的都是国外的参考值,这显然不能完全适合中国人的疾病诊断和治疗。报道成年人淋巴细胞亚群计数的文献较多^[1-2],关于婴幼儿及儿童的淋巴细胞亚群计数的研究报道较少^[3-4]。

本研究按美国临床实验室标准化协会(CLSI)C28-A3 文件收集年龄为 1~3 岁的健康幼儿外周血标本 60 例,用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)及配套试剂进行 T 淋巴细胞亚群的检测,获得郴州地区健康幼儿 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞绝对数值和 CD4⁺/CD8⁺ 比值中位数和参考值范围。与国外发表的健康幼儿的 T 淋巴细胞亚群参考值范围比较发现:各参数值与冈比亚^[5]、尼日利亚^[6]的调查结果比较接近,与荷兰^[7]、沙特阿拉伯^[8]等国家的调查结果存在差异。本研究 CD3⁺、CD8⁺ 淋巴细胞绝对计数的结果比杨碧峰等^[9]的研究高,但 CD4⁺/CD8⁺ 比值比其低,CD4⁺ 淋巴细胞绝对计数值与其接近。肖婧等^[10]的研究表明,在婴儿组、幼儿组不同性别间的差异有统计学意义($P<0.05$)。李蓓等^[11]的研究表明儿童 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞的百分率和绝对值比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

不同的研究结果有差异,有研究认为不同性别间淋巴细胞亚群值有差异,而有些研究认为淋巴细胞亚群值在不同性别间分布差异无统计学意义^[12]。导致这些研究结果差异的原因可能是因为不同研究人群在种族、年龄、地理环境、生活习惯等方面存在差异。此外,不同的实验条件和方法也可能导致结果存在差异。本研究按不同年龄、性别分组进行比较,结果表明,在

1~3 岁的健康幼儿外周血 T 淋巴细胞亚群的绝对值与百分率差异无统计学意义($P>0.05$)。与国内儿童外周血淋巴细胞亚群分析的相关报道比较,本研究的年龄段范围小,样本更具代表性。

本研究采用流式细胞术建立了郴州地区健康 1~3 岁幼儿外周血 T 淋巴细胞亚群正常值参考范围,对临床幼儿群体疾病诊断及治疗疗效评价有一定的参考价值。

参考文献

[1] 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):122-126.
[2] 叶艾竹,袁军,刘水和,等.贵阳地区成人外周血淋巴细胞亚群及活化正常参考值[J].贵阳医学院学报,2010,35(1):64-65.
[3] 赵宏,焦顺昌,张国庆,等.不同年龄、性别的健康成年人 21 项淋巴细胞亚群分析[J].标记免疫分析与临床,2011,18(2):99-102.
[4] 魏田力,候安存,卢炎.不同年龄组健康儿童外周血淋巴细胞亚群的变化[J].实用儿科临床杂志,2010,25(17):1357-1358.
[5] Lisse IM, Aaby P, Whittle H, et al. T-lymphocyte subsets in West African children: Impact of age, sex, and season [J]. J Pediatr, 1997, 130(1):76-84.
[6] Emmanuel OI, Rosemary AA, Edna O, et al. T-lymphocyte subsets in apparent healthy Nigreian children[J]. Int J Pediatr, 2010, 28(1):1-7.
[7] Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood [J]. J Pediatr, 2008, 130(3):388-393.
[8] Shaabuddin S, Al-Ayed I, Gad El-Rab MO, et al. Age-related changes in blood lymphocyte subsets of Saudi Arabian healthy children[J]. Clin Diag Lab Immunol, 2009, 5(5):632-635.
[9] 杨碧峰,卓广超,周劲峰,等.学龄前儿童外周血淋巴细胞亚群特点分析[J].浙江临床医学,2004,6(8):699-670.
[10] 肖婧,申丹,刘永革,等.以流式细胞术建立中国汉族健康儿童外周血淋巴细胞亚群相对计数的正常参考值[J].中国循证儿科杂志,2010,5(4):245-250.

(下转第 145 页)

1.3 统计学处理 所有数据记录在 EXCEL 表中。计算各指标的各时间段的敏感度,采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

本实验在发病 2~<6 h 采血检测肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白的有 42 例;在发病 6~12 h 采血检测的有 47 例。两时间段的肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白的灵敏度分别为 35.7%、64.3%、52.4%和 48.9%、85.1%、76.6%,在发病早期的 12 h 内,CK-MB 和肌红蛋白的灵敏度较肌钙蛋白 I 高($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 种心肌标志物单独及联合检测在 AMI 早期不同时间段的灵敏度 [% (n/n)]

组别	n	肌钙蛋白 I	CK-MB	肌红蛋白	三者联合
发病 2~<6 h	42	35.7(15/42)	64.3(27/42)	52.4(22/42)	69.0(29/42)
发病 6~12 h	47	48.9(23/47)	85.1(40/47)	76.6(36/47)	89.4(42/47)
对照组	70	4.3(3/70)	10.0(7/70)	17.1(12/70)	17.1(12/70)

3 讨 论

AMI 是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,可导致全身病理反应,若处理不及时,病死率较高。一般认为,在发病 3~6 h 进行溶栓或介入治疗效果最好,最迟不应超过 12 h。因此,在 AMI 早期处理的黄金窗口期,对早期心肌标志物诊断效能认识对疾病的预后非常重要。

本文根据心肌标志物释放时间曲线和治疗时间窗,设计两个时间段发病 2~<6 h 和 6~12 h,对心肌标志物肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白进行研究,探讨三者对 AMI 的临床价值。实验发现,在发病 2~<6 h 测定的肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白三者的阳性率与刘希宏等^[3]的报道基本一致。阳性率较低可能与它们的释放时间和半衰期不同有关。肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白三者单独检测的阳性率与对照组比较,均高于对照组($P<0.05$)。发病 6~12 h 三者单独及联合检测的阳性率均比 2~<6 h 的高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在发病 12 h 内,CK-MB 的阳性率始终比肌钙蛋白 I、肌红蛋白的高,与其他报道有差别,可能与肌钙蛋白 I 开始升高时间、肌红蛋白的降解速度、胶体金检测技术有关^[4]。考虑到三者自身存在的缺点,如在一些疾病如骨骼肌损伤、非心脏手术、电伤和心肌炎时常有血清 CK-MB、肌红蛋白增高,会造成假阳性^[5],而肌钙蛋白 I 开始升高的时间较晚,并且持续时间较长,虽然对后期诊断较有价值,但不利于早期再梗的判断^[6]。因此,综合以上因素,使用胶体金免疫层析诊断试剂盒技术将三者(肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白)组合在一起进行同时测定可以起到互补的效果,并且在发病过程中可以根据三者结果判定患者病情

发展情况^[7-9]。实验结果显示,三者联合测定时 AMI 的诊断阳性率较单独测定时高。在诊断明确后,对于早期患者,因肌红蛋白是一种低分子量蛋白,发生心肌梗死时最早升高,虽然特异性差,但是因为其半衰期短、检测方便,肌红蛋白阴性时有助于排除心肌梗死或在 AMI 发病早期通过再次检测有助于了解有无再梗死或梗死扩大,以及了解溶栓治疗中判断有无再灌注^[10-12]。因此,在早期(12 h 内)溶栓治疗中检测 CK-MB、肌钙蛋白 I 临床价值较大。

综上所述,胶体金免疫层析技术心肌标志物三合一检测试剂盒,将肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白三者的检测组合在一起,实现了指标的统一测定,简化了检测步骤,并提高了诊断的灵敏度,适用于临床急诊对 AMI 的辅助诊断,在 AMI 早期能及时给临床诊断提供依据,以便临床做出及时、正确的治疗,降低患者的病死率以及改善患者预后。

参考文献

[1] Lipshultz SE, Simbre VC, Hart S, et al. Frequency of elevations in markers of cardiomyocyte damage in otherwise healthy newborns [J]. *Cardiology*, 2008, 102(6): 761-766.

[2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10.

[3] 刘希宏, 李怡, 钟永根. 肌钙蛋白 I 与 CK-MB 联合检测对急性心肌梗死的诊断价值[J]. *临床医学*, 2005, 25(1): 11-13.

[4] 龚国忠, 何理华, 黄刚, 等. CK、CK-MB、hs-cTnT 与急性心肌梗死梗死面积的关系[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(6): 533-534.

[5] 周剑波, 陆忠明, 俞静文, 等. cTnI MB 和 CK-MB 联合检测在急性心肌梗死诊断中的临床应用[J]. *职业与健康*, 2011, 7(20): 2388-2389.

[6] Shave R, George K, Gaze D. The influence of exercise upon cardiac biomarkers: a practical guide for clinicians and scientists[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(13): 1427-1436.

[7] 刘宇, 周荣斌. 胶体金免疫层析法检测心肌标志物在诊断急性心肌梗死中的应用[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(18): 1903-1904.

[8] 敬华, 李丹, 王晓菲, 等. 几种心肌损伤标志物对急性心肌梗死的诊断效率[J]. *中国实验诊断学*, 2006, 10(3): 258-261.

[9] 龚国忠, 唐川苏, 蒲泽晏, 等. 3 项指标动态变化对急性心肌梗死的临床价值[J]. *检验医学与临床*, 2012, 24(28): 3046-3047.

[10] 王兰兰. 心肌标志物的分类和临床应用[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(5): 385.

[11] 方捷, 吴飞, 秦保, 等. 心肌标志物的床边检测技术在急性心肌梗死患者中的应用价值[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(3): 444-447.

[12] 朱健. 心肌标志物检测对急性心肌梗死的快速诊断价值[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2010, 18(8): 1117.

(收稿日期: 2013-08-25)

(上接第 143 页)

[11] 李蓓, 陆军, 李志敏. 80 例健康儿童淋巴细胞亚群参考范围的调查分析[J]. *广州医药*, 2010, 41(1): 22-25.

[12] Huenecke S, Behl M, Fadler C, et al. Age-matched lymphocyte subpopulation reference value in childhood and adolescence: appli-

cation of exponential regression analysis [J]. *Euro J Haematol*, 2008, 80(4): 532-539.

(收稿日期: 2013-08-14)